artikel_nyeri.pdf

by

Submission date: 29-May-2020 12:50PM (UTC+0700)
Submission ID: 1333933247
File name: artikel_nyeri.pdf (296.55K)
Word count: 6303
Character count: 36241

MEDIA MEDIKA INDONESIANA

Hak Cipta©2008 oleh Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Ikatan Dokter Indonesia Wilayah Jawa Tengah

Nyeri Yang Diprovokasi *Electric Foot Shock*, Daya Bunuh Makrofag dan Penggunaan Imunomodulator BCG pada Mencit Balb/C

Dwi Pudjonarko *, M. Naharuddin Jenie *, Edi Dharmana **

ABSTRACT

Provocated pain by electric foot shock, macrophage killing ability and the use of BCG as immunomodulator in Balb/C mice

Background: *Pain affects immune system through Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) and Symphatetic-adrenal-medullary (SAM) axis. Immunostimulator BCG increase immune system via type I response. The aim of this study is to prove that the decrease of immune response due to pain can be improved by introducing BCG vaccine assessed by macrophage activity.*

Methods: *The study adapts Laboratory Experimental and Post-Test Only Control Group Design. Samples were 24 female Balb/C mice average weight 21.88(SD=1.75) grams and divided into four groups. The control group (C) received no other additional treatment. The BCG group (B) received intra-peritoneal injection of 0.1 ml BCG at day 1st and 11th. The EFS (E) received Electric foot shock 1-3 mA at day 12th to 21st and the BCG+ EFS group (BE) received BCG and EFS as mentioned before. All groups were intravenously injected with 10^{4} live L. monocytogenes at day 21st and sacrificed at day 26th by chloroform anaesthesia. Then, Macrophages Nitrit Oxyde (NO) concentration and liver bacterial count were measured. Data were analyzed by One Way ANOVA, Post Hoc Test Bonferroni and Pearson's product moment supported by computer software SPSS 13.0 (significant if p<0.05).*

Results: *There were significant differences in the macrophages NO production and the liver bacterial count (p<0.05) among the groups. The highest number of bacterial count and the lowest number of NO production was found in the E group. In contrast, there were significant differences on the number of bacterial count and NO production between BE group and E group (p>0.05).*

Conclusions: *Pain provocation causes low NO concentration in macrophages and the introduction of BCG could improve the condition.*

Keywords: *Pain, macrophages, NO, bacterial count*

ABSTRAK

Latar belakang: *Nyeri dapat mempengaruhi imunitas tubuh melalui aksis Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) dan Symphatetic-adrenal-medullary (SAM) dengan menurunkan produksi sitokin tipe 1. Penggunaan imunostimulator BCG terbukti dapat meningkatkan respon imunitas seluler melalui respon tipe I. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan penurunan imunitas seluler yang diakibatkan nyeri dapat diperbaiki dengan pemberian vaksin BCG dengan melihat aktivitas makrofag.*

Metode: *Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan The Post Test – Only Control Group Design yang menggunakan 24 ekor mencit betina strain Balb/C, umur 6-8 minggu. Sampel dibagi menjadi 4 kelompok dan mendapatkan makanan standar. Pada Kelompok Kontrol (K), mencit tidak mendapatkan perlakuan, sedangkan kelompok BCG (B) divaksinasi secara intra peritoneal dengan 0,1cc BCG pada hari ke-1 dan ke-11. Kelompok Nyeri (N), mendapat sensasi nyeri menggunakan Electric Foot Shock mulai hari ke-12 sampai 21 dan kelompok Nyeri + BCG (NB) mendapat kombinasi perlakuan N+B. Pada hari ke-21, semua mencit disuntik 10^{4} Listeria monocytogenes hidup secara intravena. Dilakukan terminasi mencit pada hari ke-26 untuk dilakukan pemeriksaan konsentrasi produksi NO makrofag serta hitung kuman organ hepar. Dilakukan uji beda dengan Oneway ANOVA dan korelasi Pearson's product moment dengan menggunakan software SPSS 13.0.*

Hasil: *Didapatkan adanya perbedaan yang bermakna pada produksi NO makrofag dan hasil hitung kuman organ hepar antar kelompok perlakuan (p<0,05). Pada kelompok Nyeri (N) didapatkan produksi NO makrofag terendah dan jumlah hitung kuman tertinggi. Pada kelompok Nyeri yang mendapat BCG (NB) didapatkan hasil yang berlawanan dan perbedaannya bermakna dalam variabel yang diteliti dibandingkan dengan kelompok Nyeri yang tidak mendapat BCG (N) (p<0,05).*

Simpulan: *Provokasi nyeri menyebabkan rendahnya konsentrasi NO makrofag dan penggunaan BCG dapat memperbaiki keadaan tersebut.*

** Bagian/SMF Ilmu Penyakit Saraf FK UNDIP/RSUP Dr. Kariadi, Jl. Dr. Sutomo No. 18 Semarang*
*** Bagian/SMF Parasitologi FK UNDIP/RSUP Dr. Kariadi, Jl. Dr. Sutomo No. 18 Semarang*

PENDAHULUAN

Secara objektif, nyeri adalah suatu ekspresi dari interpretasi berbagai macam *input* yang masuk ke berbagai pusat di otak.[1] *"The International Association for the Study of Pain"* (IASP), menyepakati definisi nyeri sebagai pengalaman sensorik dan emosional yang tak menyenangkan karena kerusakan jaringan aktual atau potensial, atau digambarkan dalam istilah sebagai kerusakan. Dari definisi tersebut tampaklah bahwa nyeri selalu mempunyai komponen subyektif.[2,3] Masing-masing orang membentuk konstruksi internalnya mengenai nyeri dalam bereaksi terhadap cedera atau kerusakan jaringan. Beberapa ahli menyatakan bahwa pada neonatus, ekspresi terhadap nyeri tidak sesuai persis dengan definisi IASP karena tidak dapat mengeluh.[4,5,6] Nyeri dapat menimbulkan stres, tetapi disisi lain stres belum tentu menimbulkan nyeri. Stres sangat berpengaruh terhadap imunitas tubuh melalui stimulasi sekresi kortisol dan adrenalin dari korteks dan medula adrenal. Juga berpengaruh terhadap pelepasan noradrenalin dari *post*-ganglion simpatik terminal saraf di pembuluh darah dan organ lymfoid. Efek sistemik dari glukokortikoid dan katekolamin ini mempengaruhi pengaturan sitokin tipe 1 dan tipe 2. Stres akan menurunkan produksi sitokin tipe 1 yang dibutuhkan dalam menanggapi infeksi bakterial melalui respon imunitas seluler.[7] Sampai saat ini masih jarang ditemukan referensi penelitian yang menghubungkan nyeri terhadap penurunan respon imunitas seluler. Juga sampai saat ini belum pernah ada penelitian mengenai angka infeksi pada penderita nyeri. Penelitian mengenai nyeri lebih banyak membahas bagaimana nyeri dapat timbul, mengklasifikasikan dan melakukan manajemen terhadap nyeri tersebut. Penggunaan antidepresan dapat mengurangi penderitaan nyeri tetapi belum ada yang mengkaitkannya dengan sistem imunitas tubuh.

Perubahan pada sistem imunitas tubuh akibat nyeri tersebut kemungkinan dapat diintervensi dengan pemberian imunomodulator. Dalam ilmu imunologi dikenal beberapa substrat yang dapat memodulasi sistem imun (imunomodulator). Banyak sekali imunomodulator yang telah diiklankan melalui media masa dan dijual bebas di toko-toko. Tetapi atas dasar pertimbangan kepustakaan dan uji klinis yang ada, maka untuk penelitian ini akan digunakan imunomodulator yang telah memiliki bukti-bukti ilmiah dalam penggunaannya. Salah satu imunomodulator yang bersifat imunopotensiator dan telah banyak dipelajari untuk menambah reaktivitas imunologis adalah *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan yaitu strain *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG).[8,9,10] BCG dapat mengubah beberapa komponen respon imun, mempengaruhi beberapa fungsi sel dan mendorong efek positif (stimulasi) atau efek negatif (inhibisi) tergantung pada sistem imunitas dan bagaimana menggunakannya.[11] Penggunaan dosis BCG yang tepat akan menginduksi respon imunitas seluler melalui respon Type 1.[12] Setelah pemberian BCG didapati peningkatan *Nitrit Oxyde* (NO) yang dihasilkan oleh makrofag alveoler mencit Balb/C selama pemeriksaan yaitu pada hari ke-1, ke-7 dan ke-14.[13] NO yang dihasilkan makrofag digunakan untuk mengorganisasi lesi granulomatosa dan mengontrol pertumbuhan bakteri pada lesi mencit yang diinduksi BCG.[14] NO dan produk-produk reaktifnya dengan radikal oksigen peroksinitrit memegang peranan untuk membunuh BCG pada makrofag alveolar manusia.[15]

Percobaan binatang untuk mengetahui kemungkinan mekanisme dan evaluasi intervensi terapetik mengenai nyeri sudah sering dilakukan. Penggunaan model ini sering digunakan untuk memprediksi potensi dan efikasi agen-agen farmakologi yang bekerja terhadap nyeri pada manusia.[16] Metode *electric foot shock* sudah banyak digunakan untuk penelitian-penelitian terutama menggunakan binatang. Binatang percobaan ditempatkan pada tempat tertentu untuk mendapatkan arus listrik secara langsung. Zhang dkk. menyampaikan bahwa kontak langsung dengan arus listrik pada binatang percobaan dapat menimbulkan stres dan nyeri.[17] Tsuji dkk. memanfaatkan *electric foot shock* untuk menguji ambang nyeri mencit setelah mendapatkan obat-obatan tertentu.[18] Arus listrik sebesar 1-3 mA memberikan persepsi nyeri, 3-10 mA dirasakan sangat nyeri dan 10 mA merupakan ambang terjadinya paralisis otot yang kontak dengan sumber listrik. Arus listrik sebesar 30 mA dapat menimbulkan paralisis pernafasan dan 250 mA telah menimbulkan fibrilasi jantung yang berakibat fatal.[19] Bila serabut aferen tak bermielin diberi rangsang elektrik, maka akan diproduksi suatu zat kimia di ruang ekstraselular. Zat ini dapat mengaktivasi serabut C dan menimbulkan nyeri. Senyawa kimia tersebut adalah Substansi P. Substansi P menyebabkan pelepasan histamin dari sel mast. Histamin juga mengaktivasi nosiseptor dan menimbulkan vasodilatasi serta edema. Pemberian *electric foot shock* juga akan meningkatkan katekolamin adrenal dan pelepasan substansi P. Hal ini terjadi karena *electric foot shock* akan mengaktivasi sel-sel medula adrenal yang mengandung katekolamin dan substansi P.[20] *Electric foot shock* akan mempengaruhi sistem imunitas tubuh melalui mekanisme aksis *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal* (HPA) dan aksis *Symphatetic-adrenal-medullary* (SAM) dengan menurunnya sitokin tipe I. Penelitian kami terdahulu mendapatkan bahwa provokasi nyeri menggunakan *Electric foot shock* 1-3 mA dapat menekan proliferasi limfosit pada mencit Balb/C.[21]

Suseptibilitas terhadap infeksi karena gangguan sistem imunitas tubuh pada penelitian ini akan diuji dengan

melakukan infeksi terhadap individu menggunakan kuman *Listeria monocytogenes.* Dalam eksperimen, induksi infeksi dengan organisme *Listeria monocytogenes* telah banyak dijadikan model untuk mempelajari infeksi bakteri intraseluler. Bakteri ini dapat bertahan hidup di dalam makrofag dan dapat menghindari mekanisme bakterisidal makrofag. Sehingga makrofag merupakan pertahanan utama terhadap organisme ini.[22,23]

Pertumbuhan kuman *Listeria monocytogenes* sangat dipengaruhi oleh kemampuannya untuk bertahan dan tumbuh di dalam makrofag inang. Tetapi secara *invivo* kuman ini mampu masuk sel-sel inang selain makrofag. Sel hepatosit merupakan tempat yang baik untuk pertumbuhan organisme ini. Sehingga untuk dapat dihancurkan oleh makrofag yang teraktivasi, kuman ini perlu dikeluarkan dulu dari sel hepatosit. Pengeluaran dari hepatosit dilakukan dengan menghancurkan sel-sel ini oleh lekosit yang berkumpul disekitar tempat yang terinfeksi dan melakukan degranulasi ekstraseluler. Kemampuan kuman *Listeria monocytogenes* untuk dapat berkembang biak di hepatosit dapat dilihat dari hasil kultur kuman organ hepar.[24]

Melihat hal-hal tersebut di atas, penelitian ini berusaha mengetahui apakah nyeri akan menyebabkan penurunan immunitas seluler melalui mekanisme yang telah diuraikan di atas sehingga terjadi kerentanan terhadap infeksi yang diukur dari konsentrasi produksi NO makrofag dan hitung kuman organ hepar, penelitian juga akan membuktikan apakah pemberian BCG dapat memperbaiki penurunan sistem imunitas seluler tersebut. Keseluruhan penelitian ini dilakukan pada hewan coba mencit Balb/C.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik, dengan pendekatan *the post test–only control group design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai obyek penelitian.[25] Sampel penelitian adalah 24 ekor mencit betina strain Balb/C, umur 6-8 minggu, dengan berat badan rata-rata 21,69 (SD=1,81) gram, yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Sampel dibagi menjadi 4 kelompok percobaan dengan rancangan acak lengkap *(Completely Randomized Design)*, randomisasi sederhana dilakukan menggunakan komputer. Semua mencit mendapatkan makanan standar. Pada Kelompok Kontrol (K), mencit tidak mendapatkan perlakuan, sedangkan kelompok BCG (B) mendapatkan vaksinasi BCG 0,1 ml intraperitoneal pada hari ke-1 dan 11. Kelompok *Electric foot shock* (E) mendapatkan *electric foot shock* sebesar 1-3 mA mulai hari ke-12 sampai 21. Dilakukan pemberian renjatan dalam beberapa sesi dengan interval waktu 4 menit untuk masing-masing sesi. Pada hari ke-12 diberikan 4 renjatan 2 sesi, hari ke-13: 8 renjatan 2 sesi, hari ke-14: 10 renjatan 3 sesi, hari ke-15: 12 renjatan 3 sesi, hari ke-16: 14 renjatan 4 sesi, hari ke-17: 16 renjatan 4 sesi, hari ke-18: 18 renjatan 5 sesi, hari ke-19: 20 renjatan 5 sesi, hari ke-20: 22 renjatan 6 sesi dan hari ke-21: 24 renjatan 6 sesi. Kelompok BCG + *Electric foot shock* (BE) divaksinasi secara intra peritoneal dengan 0,1cc BCG pada hari ke-1 dan ke-11 dilanjutkan *electric foot shock* mulai hari ke-12 sampai 21 sesuai metode yang telah dijelaskan sebelumnya. Pada hari ke-21, semua mencit disuntik secara intravena dengan 10^4 *Listeria monocytogenes* hidup yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Semarang. Semua mencit dibunuh dengan pembiusan kloroform yang dilanjutkan dengan dislokasi leher pada hari ke-26.

Hepar mencit diambil secara aseptis untuk penghitungan kuman dalam *cfu/gram*. Penghitungan dilakukan dengan menghitung koloni yang tumbuh pada media *blood agar* setelah inkubasi gerusan hepar selama 24 jam. Penggerusan hepar dilakukan dengan alat penghancur *(grinder)* dan dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan NaCl 0,9% untuk ditanam dalam media *blood agar*. Penghitungan koloni yang tumbuh dilakukan dengan menggunakan *Colony Counter*.[26]

Pemeriksaan produksi NO makrofag diperoleh dengan mengisolasi makrofag peritoneal mencit. Makrofag kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, dengan kadar CO_2 5% selama 2 jam dalam *plate 96 wells* dengan pengambilan sampel secara triplikat. Setelah diganti medium, makrofag dikultur dalam inkubator pada suhu 37°C, dengan kadar CO_2 5% selama 24 jam. Pemeriksaan konsentrasi produksi NO makrofag dilakukan dengan metode Griess dan dibaca menggunakan *Automated Microplate Reader* SLT Labinstrumens Model 16 570.[27] Analisis terhadap variabel penelitian dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan distribusi normal sehingga dilakukan uji *One Way Anova*, *Post Hoc Test Bonferroni/Tamhane* dan uji korelasi *Pearson's product moment*. Semua analisis statistik tersebut dilakukan dengan menggunakan program komputer SPSS 10.05 for windows.[28,29,30] Nilai kemaknaan pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p<0,05$.

HASIL

Nyeri akut akibat lesi jaringan dapat berlangsung singkat akan tetapi tidak jarang ditemukan adanya nyeri yang berkepanjangan. Hal ini terjadi oleh karena lesi jaringan akan memacu berbagai respon fisiologik. Bahkan respon fisiologik tersebut dapat terjadi pada seseorang yang sedang dalam anestesi. Oleh karena itu pada seseorang penderita nyeri khususnya yang kronik dapat menunjukkan berbagai komplikasi seperti kecemasan,

gangguan tidur, takikardi, hipertensi, dan lain sebagainya.[31,32] Nyeri dapat menimbulkan stres, tetapi disisi lain stres belum tentu menimbulkan nyeri. Baik nyeri dan stres membutuhkan evaluasi dan pengobatan. Stres merupakan salah satu faktor yang dapat memodulasi nyeri selain olahraga (endorfin diproduksi saat berolahraga), akupungtur dan hipnosis.[33]

Meskipun lebih dari 150 penelitian klinis telah dilakukan untuk menunjukkan bahwa stres dapat mengubah fungsi imun dan mempunyai andil pada buruknya kesehatan, tetap saja penelitian pada manusia memiliki keterbatasan untuk menunjukkan hubungan secara lebih jelas karena masalah praktis dan keterbatasan etik. Penelitian pada hewan coba mendukung penemuan-penemuan pada penelitian manusia dan dapat menjelaskan secara luas mekanisme dasar keilmuannya. Penelitian pada binatang memungkinkan pengamatan efek dari berbagai variasi stressor dalam patofisiologinya dan pemberian agen-agen infeksius pada berbagai macam tempat anatomi. Hal-hal seperti ini tentu saja tidak dapat dilakukan pada manusia. Sehingga penelitian dengan model hewan coba dapat digunakan sebagai alat untuk menjelaskan analisis secara komprehensif interaksi neuroendokrin-sistem imun dalam berbagai kondisi eksperimental.[34,35,36,37]

Model penelitian binatang telah digunakan secara luas untuk penelitian dasar nyeri dengan asumsi bahwa model ini dapat memprediksi potensi dan efikasi aksi farmakologi dan dalam beberapa kasus dapat menunjukkan respon molekular atau agen-agen yang berperan pada keadaan nyeri manusia.[38] Berbeda dengan nyeri pada manusia, yang bentuknya polimorfik maka nyeri pada binatang dapat ditaksir dengan memeriksa reaksinya terhadap berbagai rangsang kimia, termal dan mekanik, dengan latensi atau respon alamiah yang berubah karena nyeri.[17] Setelah dilakukan pengukuran maka didapatkan hasil pembacaan konsentrasi NO dari binatang percobaan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil penghitungan konsentrasi produksi NO makrofag dalam mmol

Kelompok percobaan	N	Rerata	SB
Kontrol (K)	6	4,27	1,41
Nyeri (N)	6	0,67	0,64
BCG (B)	6	7,21	1,27
Nyeri + BCG (NB)	6	5,25	1,05

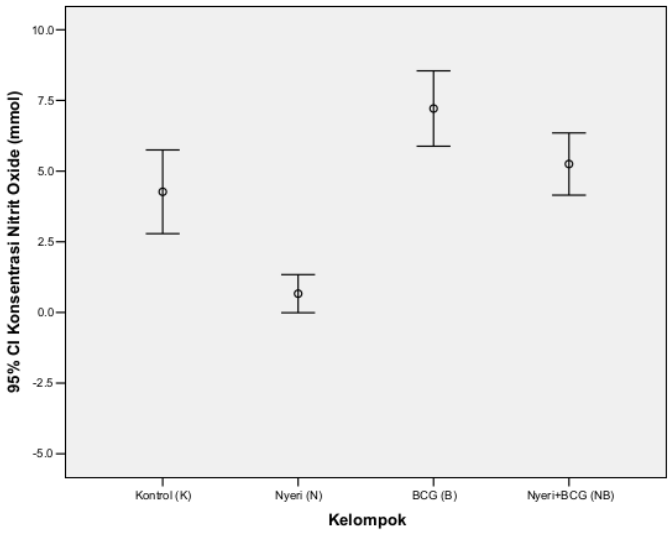
Anova $F=35,309$ $p\leq0,0001$

Pada penelitian ini didapatkan rerata konsentrasi produksi NO makrofag paling rendah pada kelompok mencit yang mendapat stimulus Nyeri yaitu sebesar 0,67 (±0,64) mmol. Kelompok mencit Nyeri yang mendapat BCG memiliki konsentrasi produksi NO makrofag yang lebih besar dibanding kelompok nyeri saja yaitu 5,25 (±1,05) mmol, meskipun hasil ini tidak setinggi kelompok BCG sebesar 7,21 (±1,27). Setelah dilakukan analisis statistik dengan menggunakan uji *One Way Anova*, ternyata terdapat perbedaan yang bermakna ($p\leq0,0001$) pada konsentrasi produksi NO makrofag antar kelompok percobaan yang terdiri dari 4 kelompok. Perbedaan lebih lanjut antar kelompok percobaan dianalisis dengan *Post Hoc Test Bonferroni* seperti tersaji pada Tabel 2 dan variabilitas hasil pengukuran konsentrasi produksi NO makrofagnya terdapat pada Gambar 1.

Apabila konsentrasi produksi NO makrofag kelompok Nyeri dibandingkan dengan Kontrol, maka didapatkan perbedaan yang bermakna *($p\leq0,0001$)* begitu juga bila dibandingkan dengan kelompok BCG *($p\leq0,0001$).* Bila kelompok Nyeri dibandingkan dengan kelompok Nyeri + BCG tampak perbedaan rerata yang cukup besar dan bermakna yaitu -4,585 *($p\leq0,0001$)*.

Aktivasi makrofag akan diikuti oleh aktivasi limfosit T untuk melakukan ekspansi kloning dan menghasilkan sitokin-sitokin yang diperlukan oleh makrofag teraktivasi dalam melakukan tanggapan terhadap patogen asing. Salah satu produk yang dihasilkan adalah IFN-γ. IFN-γ sangat dilperlukan dalam melakukan *killing* patogen intrasel seperti *Listeria monocytogenes* baik melalui jalur *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI) maupun *Reactive Nitrogen Intermediates* (RNI). Dilaporkan bahwa IFN-γ akan menginduksi NO Sintase untuk berikatan dengan molekul *tetrahidrobiopterin* sebagai ko-faktor, dan dengan pacuan TNF akan mengubah *L-Arginin* menjadi *citrulin* + NO dengan bantuan O_2. NO ini bersifat toksik terhadap bakteri dan berguna pada aktivitas *killing*.[39]

NO adalah produk yang dihasilkan makrofag teraktivasi untuk pembunuhan patogen intrasel melalui jalur *Reactive Nitrogen Intermediates* (RNI). Rendahnya produksi NO makrofag pada kelompok mencit yang mendapat stimulus nyeri kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor yang mempengaruhi fungsi makrofag. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya yaitu bahwa limfosit, monosit atau makrofag dan granulosit memiliki reseptor untuk produk-produk neuroendokrin dari aksis HPA dan SAM, seperti kortisol dan katekolamin yang dapat menyebabkan perubahan komunikasi seluler, proliferasi, sekresi sitokin, produksi antibodi dan aktivitas sitolitik.[40] Pemberian katekolamin invitro pada *peripheral blood leukocytes* (PBLs) dapat menekan sintesis IL-12 dan meningkatkan produksi IL-10. Ini dapat menyebabkan pergeseran fenotip T helper CD4+ dari Th_1 yang berfungsi dalam imunitas seluler ke Th_2 yang melibatkan produksi antibodi. Penelitian yang dilakukan Marshall terhadap mahasiswa yang stres karena ujian (stres akademik) menunjukkan bahwa stres psikologis akan menyebabkan pergeseran keseimbangan



Gambar 1. Grafik variabilitas hasil pengukuran konsentrasi NO makrofag.

Tabel 2. Hasil *Post Hoc Test* Bonferroni konsentrasi produksi NO makrofag antar kelompok perlakuan

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Perbedaan Rerata (I-J)	SE	p	Interval Kepercayaan 95%	
					Batas Bawah	Batas Atas
Kontrol (K)	Nyeri (N)	3.60333*	.65315	.000	1.6915	5.5152
	BCG (B)	-2.94500*	.65315	.001	-4.8568	-1.0332
	Nyeri + BCG (NB)	-.98167	.65315	.891	-2.8935	.9302
Nyeri (N)	Kontrol (K)	-3.60333*	.65315	.000	-5.5152	-1.6915
	BCG (B)	-6.54833*	.65315	.000	-8.4602	-4.6365
	Nyeri + BCG (NB)	-4.58500*	.65315	.000	-6.4968	-2.6732
BCG (B)	Kontrol (K)	2.94500*	.65315	.001	1.0332	4.8568
	Nyeri (N)	6.54833*	.65315	.000	4.6365	8.4602
	Nyeri + BCG (NB)	1.96333*	.65315	.042	.0515	3.8752
Nyeri + BCG (NB)	Kontrol (K)	.98167	.65315	.891	-.9302	2.8935
	Nyeri (N)	4.58500*	.65315	.000	2.6732	6.4968
	BCG (B)	-1.96333*	.65315	0.42	-3.8752	-.0515

* *Bermakna*

sistem imun ke Th_2. Data menunjukkan penurunan sintesis sitokin Th_1 termasuk interferon-γ (IFN-γ), dan peningkatan sitokin Th_2 termasuk IL-10, sehingga dipercaya bahwa stres akan menyebabkan penurunan sitokin Th_1 yang akhirnya mengacaukan respon imunitas seluler.[41]

Renjatan secara berulang dilaporkan tidak mempengaruhi jumlah limfosit intraepitelial (=*Intra epithelial lymphocyte=IEL*) dan subset CD3+ IEL, tetapi akan menekan produksi IFN-γ IEL yang diduga akibat naiknya kadar kortikosteron.[17] Tertekannya produksi IFN-γ ini akan mengurangi induksi NO Sintase untuk berikatan dengan molekul tetrahidrobiopterin dalam memproduksi NO yang bersifat toksik terhadap patogen asing. Pemberian vaksinasi BCG pada kelompok mencit nyeri akan menyebabkan rerata konsentrasi produksi NO makrofagnya lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok yang hanya mendapat stimulus nyeri saja sehingga tampaknya BCG dapat mempertahankan konsentrasi produksi NO makrofag yang tertekan akibat nyeri.

Pada penelitian ini, hasil hitung kuman organ hepar dinyatakan dalam 10 log jumlah kuman dalam *cfu/gram*. Didapatkan rerata hitung kuman organ hepar paling tinggi pada kelompok mencit yang mendapat stimulus nyeri sebesar 4,63 (±0,84) *cfu/gram*, sedangkan kelompok mencit Nyeri yang mendapat vaksinasi BCG lebih rendah yaitu sebesar 3,35 (±0,23) *cfu/gram*.

Tabel 3. Hasil penghitungan kuman organ hepar dalam log *cfu/gram*

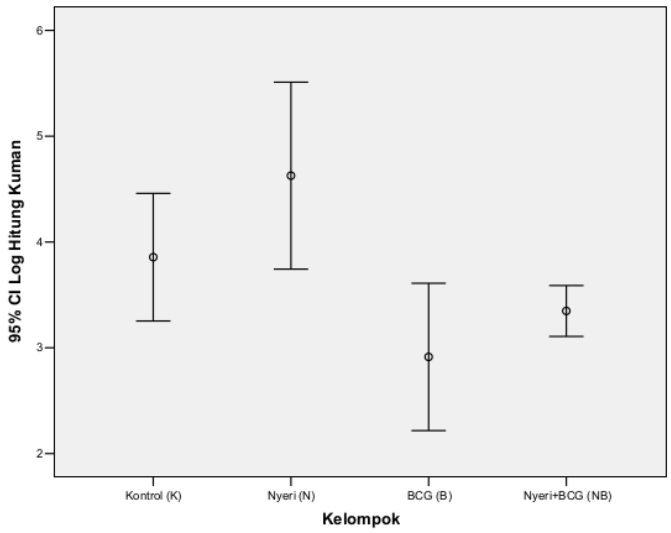
Kelompok Percobaan	N	Rerata	SB
Kontrol (K)	6	3,85	0,57
Nyeri (N)	6	4,63	0,84
BCG (B)	6	2,91	0,66
Nyeri + BCG (NB)	6	3,35	0,23
	Anova	*F = 8,486*	*p=0,001*

Setelah dilakukan analisis statistik dengan menggunakan *One Way Anova*, ternyata terdapat perbedaan yang bermakna *(p=0,001)* pada hitung kuman organ hepar antar kelompok percobaan yang terdiri dari 4 kelompok. Perbedaan lebih lanjut antar kelompok percobaan dianalisis dengan *Post Hoc Test Bonferroni* seperti tersaji pada Tabel 4. Sedangkan variabilitas hasil pengukuran dapat dilihat pada Gambar 2.

Apabila hitung kuman organ hepar kelompok Nyeri dibandingkan dengan kontrol, maka tidak didapatkan perbedaan yang bermakna *(p=0,261)*. Apabila kelompok Nyeri ini dibandingkan dengan kelompok Nyeri + BCG tampak perbedaan rerata yang bermakna yaitu 1,279 *(p=0,011),* apalagi bila dibandingkan kelompok BCG, perbedaan meannya lebih besar dan bermakna yaitu 1,713 *(p=0,001)*.

Peningkatan konsentrasi NO makrofag berkorelasi negatif dengan hitung kuman secara bermakna *(p≤0,0001)* dengan koefisien korelasi sebesar 0,896. Sehingga bila konsentrasi NO makrofagnya semakin tinggi, maka hitung kuman organ heparnya semakin rendah (Gambar 3).

Di sini terlihat bahwa tampaknya BCG mampu mempertahankan respon imunitas tubuh mencit sehingga *Listeria monocytogenes* yang bertahan hidup pada kelompok Nyeri + BCG lebih sedikit bila dibanding kelompok Nyeri yang respon imunitas tubuhnya tertekan. Hal ini didukung penelitian Tsuji dkk yang memanfaatkan *electric foot shock* untuk menguji ambang nyeri mencit setelah mendapatkan obat-obatan. Pemberian *electric foot shock* akan meningkatkan katekolamin adrenal dan pelepasan substansi P. Hal ini terjadi karena *electric foot shock* akan mengaktivasi sel-sel medula adrenal yang mengandung katekolamin dan substansi P, sel-sel ini tidak dapat diaktivasi dengan hipoglikemi yang

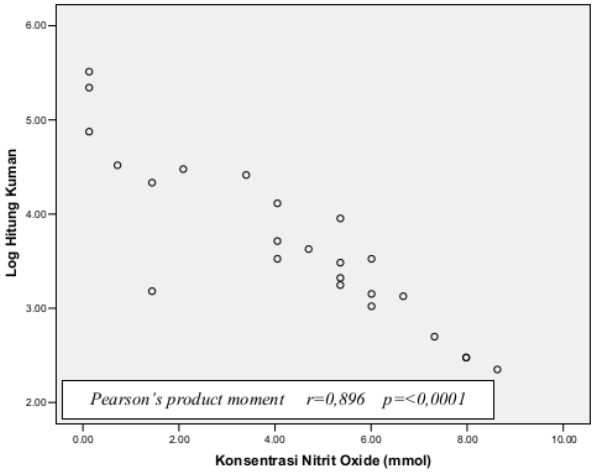


Gambar 2. Grafik variabilitas hasil hitung kuman organ-organ hepar antar kelompok perlakuan

Tabel 4. Hasil *Post Hoc Test* Bonferroni hitung kuman antar kelompok perlakuan

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Perbedaan Rerata (I-J)	SE	p	Interval Kepercayaan 95%	
					Batas Bawah	Batas Atas
Kontrol (K)	Nyeri (N)	-.77040	.35733	.261	-1.8163	.2756
	BCG (B)	.94286	.35733	.095	-.1031	1.9888
	Nyeri + BCG (NB)	.50878	.35733	1.000	-.5372	1.5547
Nyeri (N)	Kontrol (K)	.77040	.35733	.261	-.2756	1.8163
	BCG (B)	1.71326*	.35733	.001	.6673	2.7592
	Nyeri + BCG (NB)	1.27918*	.35733	.011	.2332	2.3251
BCG (B)	Kontrol (K)	-.94286	.35733	.095	-1.9888	.1031
	Nyeri (N)	-1.71326*	.35733	.001	-2.7592	-.6673
	Nyeri + BCG (NB)	-.43408	.35733	1.000	-1.4800	.6119
Nyeri + BCG (NB)	Kontrol (K)	-.50878	.35733	1.000	-1.5547	.5372
	Nyeri (N)	-1.27918*	.35733	.011	-2.3251	-.2332
	BCG (B)	.43408	.35733	1.000	-.6119	1.4800

** Bermakna*



Gambar 3. Grafik korelasi negatif hasil hitung kuman organ hepar dengan konsentrasi nitrit oxide makrofag

diinduksi insulin.[20] *Electric foot shock* akan menyebabkan naiknya kadar kortikosteron plasma pada hari ke-1, 3, 5 dan 7 bila dibandingkan kontrol. Kadar kortikosteron tertinggi dicapai pada hari ke-3. Akibatnya aktivitas sel NK *(Natural Killer)* lien, *Lymphokine-Activated Killer* (LAK) dan aktivitas sel T sitolitik serta reseptor sel NK turun secara bermakna. Inhibisi terhadap sel NK, LAK dan aktivitas sitolitik sel T tersebut terjadi karena *electric foot shock* akan mempengaruhi reseptor sel NK, granzyme dan perforin.[42]

Meskipun hitung kuman merupakan hasil interaksi berbagai respon imun baik respon imun non spesifik, maupun subset sel T CD8+ dan CD4+ tetapi sebagai salah satu sebab tingginya hitung kuman pada kelompok Nyeri kemungkinan besar berhubungan dengan rendahnya produksi NO. Pada penelitian ini didapatkan bahwa semakin tinggi produksi NO makrofag akan berhubungan dengan semakin rendahnya hitung kuman organ hepar. Hal ini menunjukkan kemungkinan bahwa NO dapat mengontrol pertumbuhan bakteri. Konsentrasi NO yang tinggi akan meningkatkan kemampuan *killing* makrofag yang dapat dilihat dari adanya korelasi negatif yang bermakna antara konsentrasi produksi NO makrofag dengan hasil hitung kuman organ hepar *($p \leq 0,0001$)* dengan koefisien korelasi yang besar yaitu 0,896. Dengan demikian semakin tinggi konsentrasi NO akan didapatkan hasil hitung kuman yang rendah.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa BCG mempunyai efek yang positif dalam mencegah tertekannya respon kekebalan tubuh pada nyeri. Respon kekebalan tubuh yang dimaksud adalah respon kekebalan tubuh seluler yang dilihat dari konsentrasi produksi NO makrofag. Hasil dari proses tersebut dikonfirmasi dengan hitung kuman pada organ hepar. Namun demikian penelitian ini masih banyak keterbatasannya. Penelitian ini belum bisa menjawab apakah meningkatnya aktivitas makrofag tersebut terjadi karena respon CD4+nya bergeser ke Th1. Penelitian lebih lanjut juga diperlukan untuk melihat kemampuan fagositosis makrofag untuk menjawab apakah hasil hitung kuman pada penelitian ini diakibatkan oleh aktivitas makrofag setelah melakukan fagositosis.

SIMPULAN

Provokasi nyeri dengan *Electric foot shock* menyebabkan rendahnya produksi NO makrofag sehingga hitung kuman organ heparnya menjadi tinggi. Upaya penggunaan BCG dapat memperbaiki produksi NO makrofag sehingga hitung kuman organ heparnya menjadi rendah.

DAFTAR PUSTAKA

1. Noback CR, Demarest RJ. The human nervous system, basic principles of neurobiology. 2nd ed. New York: McGraw Hill, 1975; p. 155-157.
2. Hoffert MJ. The neurophysiology of pain. In: Pain mechanisms and syndromes, neurologic clinics. London: WB Saunders Co, 1989; p.183-203.
3. Duarte RA. Classification of pain. In: Kanner R, editor. Pain management secrets. Philadelphia: Hanley and Belfus, 1997; p.5-7.
4. Derbyshire SWG. Comment on editorial by Anand and craig [letter]. Pain. 1996; 66: 210-1.
5. Anand KJS, Craig KD. New perspectives on definition of pain [editorial]. Pain. 1996; 67: 3-6.
6. Merskey H. Response to editorial: New perspectives on definition of pain [letter]. Pain. 1996; 66: 209.
7. Elemkov IJ and Chrousos GP. Stress hormones, Th1/th2 paterns, pro/anti-inflamatory cytokines and susceptibility to disease. TEM. 1999;10(9):359-68.
8. Shanahan JF. Bayley and Scott's diagnostic microbiology. 9th ed. Missouri: Mosby Year-book, 1994; p.321-30.
9. Joklik WK, Willet HD, Amos DB, Wilfert CM. Zinsser microbiology. 19th ed. New York: Prentice Hall International; 1993.
10. Male D. Immunology. 2nd ed. London: Gower Medical Publication, 1993; p.49-54.
11. Hennesey LR & Baker JR. Immunomodulator in basic and clinical immunology edited by Stites DP, Terr Al. 8th ed. Conecticut: Appleton and Lange, 1994; p.781-85.
12. Power CA, Wei G, Bretscher PA. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by intravenous, subcutaneous or intradermal route. Infect immun. 1998; 66(12):5743-50.
13. Moura AC, Werneck-Barroso E, Rosas EC, Henriques MG, Cordeiro RS. Opposite cellular accumulation and nitric oxide production in vivo after pleural immunization with *M. leprae* or *M. bovis* BCG. Int J Mol Med. 1999; 3(1): 69-71.
14. Krueger MR, Tames DR, Mariano M. Expression of NO-Synthase in cells of foreign-body and BCG induced granulomata in mice: Influence of L-NAME on the evolution of the lession. Immunology. 1998; 92(2): 278-82.
15. Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K. Mechanism on nitric oxide-dependent killing of Mycobacterium bovis BCG in human alveolar macrophages. Infect Immun. 1997 Sep; 65(9): 3644-7.
16. Eaton Mary. Common animal models for spasticity and pain. Journal of Rehabilitation Research and Development. 2003; 40 (4) Suppl: 41-54.
17. Zhang X, Okutsu M, Kanemi O, Gametchu B, Nagatomi R. Repeated Stress Suppress Interferon-γ Production by Murine Intestinal Intraepithelial Lymphocytes. Tohoku J Exp Med. 2005; 206: 203-12.
18. Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. Modulation of passive avoidance in mice by the 5-HT_{1A} receptor agonist flesinoxan: comparison with the benzodia-zepine receptor agonist diazepam. Neuropsycho-pharmacology. 2003;28:664-74.
19. Dalziel CF and Lee WR. "Reevaluation of lethal electric currents". IEEE Transactions on Industryand General Applications. 1968: 467-76.
20. Vaupel R, Jarry H, Schlomer HT, Wuttkke W. Differential response of substance p–containing subtypes of adrenomedullary cells to different stressors. Endocrinology. 1988;123:2140-5.
21. Dwi Pudjonarko. Pengaruh *electric foot shock* dan penggunaan vaksinasi BCG terhadap proliferasi limfosit (studi eksperimental pada mencit BALB/c). Media Medika Indonesiana. 2007; 42(2): 83-9.
22. Ryan JL. Bacterial disease in basic and clinical immunology edited by Stites DP, Terr Al. 8th ed. Conecticut: Appleton and Lange, 1994; p.627-36.
23. Hokama Y, Nakamura RM. Immunology and immunopathology basic concepts. 1st ed. Boston: Little, Brown and Company; 1982.
24. Conlan JW & North RJ. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *listeria monocytogenes, francisella tularensis* and *salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. J Infect & Immun. 1992 Dec: 5164-71.
25. Pratiknya AW. Dasar-dasar metodologi penelitian kedokteran dan kesehatan. Cetakan IV. Jakarta: CV Raja Grafindo Persada, 2001; p.117-43.
26. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Diagnostic microbiology. 9th edition. St. Louis: Mosby-Year book Inc, 1990; 284-95.
27. Dieterd RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Yen-Jen Sung. Production of reactive nitrogen intermediates by macrophages. In: Burleson GR, Dean JH, Munson AE, editors. Methods in immunotoxicology, Vol. 2. New

York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: A John Willey & Sons Inc, 1995; p.99-117.

28. Elston RC, Johnson WD. Essentials of biostatistics. Singapore: Info Access & Distribution Pte Ltd, 1995; p.225-48.
29. Santoso Singgih. SPSS (Statistical product and service solution). Jakarta: PT. Elex Media Komputindo, 1999; 300-80.
30. Tim Penelitian dan Pengembangan WAHANA KOMPUTER Semarang. Panduan lengkap: SPSS 6.0 for Windows. Semarang: Wahana Komputer & Andi Offset, 1997; 123-88, 380-85.
31. Carr DB, Goudas LC. Acute pain. Lancet. 1999; 2051-8.
32. Turk DC, Okifuji A. Assessment of patients reporting of pain: an integrated perspective. Lancet. 1999; 1784-88.
33. Sherwood L. Human physiology, from cells to systems. 4th ed. Australia: Brooks/Cole, 2001; p.174-183.
34. McCabe PM. Animal models of disease. Physiol Behav. 2000;68: 501–7.
35. Padgett DA. Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. Brain Behav Immun. 1998; 12: 64–73.
36. Teunis MA. Maternal deprivation of rat pups increases clinical symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis adult age. J Neuroimmunol. 2002; 133: 30–8.
37. Dowdell, K.C. et al. Neuroendocrine modulation of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis: a critical role for the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. J Neuroimmunol. 1999; 100: 243–51.
38. Yaksh TL. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. TIPS. 1999;20:329–37.
39. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. Barcelona, Spain: Mosby, 1998; p.17.6-17.7.
40. Madden KS, Livnat S. Catecholamine action and immunologic reactivity. In: Ader R, editor. Psychoneuro-immunology, 2nd ed. Academic Press; 1991.
41. Marshall GD. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical student. Brain behav immun. 1998; 12: 297-307.
42. Li Qing, Liang Zaifu, Nakadai A, Kawada T. Effect of electric foot shock and psychological stress on activities of murine splenic natural killer and lymphokine-activated killer cells, cytotoxic T lymphocytes, natural killer receptors and mRNA transcripts for granzymes and perforin. The International Journal on the Biology of Stress. 2005;8(2): 107-16.

[1] Noback CR, Demarest RJ. The Human Nervous System, Basic Principles of Neurobiology. 2nd ed. New York: McGraw Hill; 1975. p. 155-157

[2] Hoffert MJ. The Neurophysiology of Pain. In: Pain Mechanisms and Syndromes, Neurologic Clinics. London: WB Saunders Co; Vol 7, No 3, May 1989. p. 183-203

[3] Duarte RA. Classification of pain. In: Kanner R, editor. Pain management secrets. Philadelphia: Hanley and Belfus; 1997. p. 5-7.

[4] Derbyshire SWG. Comment on editorial by Anand and craig. Pain 1996; 66: 210-1 (Letter)

[5] Anand KJS, Craig KD. New perspectives on definition of pain (Editorial). Pain 1996; 67: 3-6

[6] Merskey H. Response to editorial: New perspectives on definition of pain (Letter). Pain 1996; 66: 209.

[7] Elemkov IJ and Chrousos GP. Stress hormones, Th1/th2 paterns, Pro/Anti-inflamatory Cytokines and susceptibility to disease. TEM 1999;10(9):359-68.

[8] Shanahan JF. Bayley and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. Missouri: Mosby Year-book, 1994. p.321-30.

[9] Joklik WK, Willet HD, Amos DB, Wilfert CM. Zinsser microbiology. 19th ed. New York Prentice Hall International, 1993.

[10] Male D. Immunology. 2nd ed. London: Gower Medical Publication, 1993. p.49-54.

[11] Hennesey LR & Baker JR. Immunomodulator in Basic and Clinical Immunology edited by Stites DP, Terr Al, 8th ed. Conecticut: Appleton and Lange, 1994. p.781-85.

[12] Power CA, Wei G, Bretscher PA. Mycobacterial dose defines the Th1/ Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by intravenous, subcutaneous or intradermal route. Infect immun 1998 Dec; 66(12): 5743-50.

[13] Moura AC, Werneck-Barroso E, Rosas EC, Henriques MG, Cordeiro RS. Opposite cellular accumulation and nitric oxide production in vivo after pleural immunization with *M. leprae* or *M. bovis* BCG. Int J Mol Med 1999 Jan; 3(1): 69-71.

[14] Krueger MR, Tames DR, Mariano M. Expression of NO-Synthase in cells of foreign-body and BCG induced granulomata in mice: Influence of L-NAME on the evolution of the lession. Immunology 1998 Oct; 92(2): 278-82.

[15] Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K. Mechanism on nitric oxide-dependent killing of Mycobacterium bovis BCG in human alveolar macrophages. Infect Immun 1997 Sep; 65(9): 3644-7.

[16] Eaton Mary. Common animal models for spasticity and pain. Journal of Rehabilitation Research and Development August 2003; 40 (4) Suppl: 41-54

[17] Zhang X, Okutsu M, Kanemi O, Gametchu B, Nagatomi R. Repeated Stress Suppress Interferon-γ Production by Murine Intestinal Intraepithelial Lymphocytes. Tohoku J Exp Med 2005; 206: 203-12.

[18] Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. Modulation of Passive Avoidance in mice by the 5-HT_{1A} Receptor agonist Flesinoxan: Comparison with the Benzodiazepine Receptor Agonist Diazepam. Neuropsycho-pharmacology 2003;28:664-74

[19] Dalziel CF and Lee WR. "Reevaluation of Lethal Electric Currents", *IEEE Transactions on Industryand General Applications*.Vol. IGA-4; Sept-Oct.1968: 467-76.

[20] Vaupel R, Jarry H, Schlomer HT, Wuttkke W. Differential response of substance P – containing subtypes of adrenomedullary cells to different stressors. Endocrinology 1988;123:2140-5.

[21] Dwi Pudjonarko. Pengaruh *electric foot shock* dan penggunaan vaksinasi BCG terhadap proliferasi limfosit (studi eksperimental pada mencit BALB/c). Media Medika Indonesiana 2007; 42(2): 83-9.

[22] Ryan JL. Bacterial disease in Basic and Clinical Immunology edited by Stites DP, Terr Al, 8th ed. Conecticut: Appleton and Lange, 1994.p.627-36

[23] Hokama Y, Nakamura RM. Immunology and Immunopathology basic concepts. 1st ed. Boston: Little, Brown and Company,1982.

[24] Conlan JW & North RJ. Early pathogenesis of infection in the liver with the Facultative Intracellular Bacteria *Listeria monocytogenes, Francisella tularensis* and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. J Infect & Immun 1992 Dec: 5164-71.

[25] Pratiknya AW. Dasar-dasar Metodologi Penelitian kedokteran dan kesehatan. Cetakan IV. Jakatra: CV RajaGrafindo Persada, 2001. p: 117-43.

[26] Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Diagnostic Microbiology, ninth edition. St. Louis: Mosby- Year book. Inc, 1990: 284-95.

[27] Dieterd RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Yen-Jen Sung. Production of Reactive Nitrogen Intermediates by Macrophages. In: Burleson GR, Dean JH, Munson AE eds. Methods in Immunotoxicology, Vol 2. New York - Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore: A John Willey & Sons. Inc, 1995: 99-117.

[28] Elston RC, Johnson WD. Essentials of Biostatistics. Singapore: Info Access & Distribution Pte Ltd, 1995: 225-48.

[29] Santoso Singgih. SPSS (Statistical Product and Service Solution). Jakarta: PT. Elex Media Komputindo, 1999: 300-80.

[30] Tim Penelitian dan Pengembangan WAHANA KOMPUTER Semarang. Panduan Lengkap: SPSS 6.0 for Windows. Semarang: Wahana Komputer & Andi Offset, 1997: 123-88, 380-85.

[31] Carr DB, Goudas LC: *Acute Pain*. Lancet 353, 1999, pp 2051-8

[32] Turk DC, Okifuji A: *Assessment of Patients' Reporting of Pain: an Integrated Perspective*. The Lancet, 1999, pp 1784-88

33 Sherwood L. Human Physiology, from cells to systems. 4thed. Australia: Brooks/Cole; 2001. p. 174-183.

[34] McCabe PM. Animal models of disease. Physiol Behav 2000;68: 501–7

[35] Padgett DA. Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. Brain Behav Immun 1998; 12: 64–73

[36] Teunis MA. Maternal deprivation of rat pups increases clinical symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis adult age. J Neuroimmunol 2002; 133: 30–8

[37] Dowdell, K.C. et al. Neuroendocrine modulation of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis: a critical role for the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. J Neuroimmunol 1999; 100: 243–51

[38] Yaksh TL. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. TIPS 1999;20:329–37.

[39] Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. Barcelona, Spain: Mosby, 1998.p. 17.6-17.7.

[40] Madden KS and Livnat S. Catecholamine action and immunologic reactivity. In: Ader R editor. Psychoneuroimmunology, 2nd ed. Academic Press,1991.

[41] Marshall GD. Cytokine dysregulation associated with exam stress in healthy medical student. Brain behav immun 1998; 12: 297-307.

[42] Li Qing, Liang Zaifu, Nakadai A, Kawada T. Effect of electric foot shock and psychological stress on activities of murine splenic natural killer and lymphokine-activated killer cells, cytotoxic T lymphocytes, natural killer receptors and mRNA transcripts for granzymes and perforin. The International Journal on the biology of Stress, June 2005;8(2): 107-16.

artikel_nyeri.pdf

ORIGINALITY REPORT

24%	21%	19%	14%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

MATCH ALL SOURCES (ONLY SELECTED SOURCE PRINTED)

1%

★ aappolicy.aappublications.org

Internet Source

Exclude quotes	On	Exclude matches	Off
Exclude bibliography	On		

artikel_nyeri.pdf

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

/0

GENERAL COMMENTS

Instructor

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6

PAGE 7

PAGE 8

PAGE 9

PAGE 10

PAGE 11