

KESAN SUNTIKAN INTRAPERITONEAL  
HIDROKSITIRO SOL DOS TUNGGAL  
DALAM MODEL KECEDERAAN  
OTAK TRAUMATIK  
IKAN ZEBRA



HOOI YOONG KHUEN

UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA



UKM-SPKPPP-PT(PdP)-05-AK04-BO07

No. Semakan: 02

Tarikh Kuat Kuasa:  
27/01/2026**BORANG DAN SENARAI SEMAK PENYERAHAN TESIS/DISERTASI  
SELEPAS PEMBETULAN  
FORM AND CHECKLIST OF AMENDED THESIS/DISSERTATION  
SUBMISSION****F. KELULUSAN DEKAN/PENGARAH / APPROVAL FROM DEAN/DIRECTOR**Tandatangan:  
SignatureTarikh: 25/1/2026  
DateNama dan Cap Rasmi:  
Name and Official StampPROFESOR DR DR MARINA MAT BAKI  
MD (UKM), MS ORL-HNS (UKM), PhD (UCL)  
Dekan Fakulti Perubatan  
Pakar Perunding Kanan ORL-HNS  
Universiti Kebangsaan Malaysia**G. PERAKUAN TESIS/ DISERTASI SARJANA / DOKTOR FALSAFAH  
(CERTIFICATION OF MASTER'S / DOCTORAL THESIS / DISSERTATION)**

Nama penuh pengarang (Author's Full Name)	Hooi Yoong Khuen		
No. Pendaftaran Pelajar (Student's Registration No.)	P131417	Sesi Akademik (Academic Session)	2025/2026
Tajuk Tesis / Disertasi (Thesis / Dissertation Title)	Kesan Suntikan Intraperitoneal Hidroksitirozol Dos Tunggal dalam Model Kecederaan Traumatik Ikan Zebra		
Semua tesis/disertasi dan penerbitan berkaitan hasil penyelidikan pelajar adalah tertakluk kepada Dasar Harta Intelek Universiti Kebangsaan Malaysia. <i>All theses/ dissertations and publications relating to the research work of a student are subject to the Intellectual Property Policy of Universiti Kebangsaan Malaysia.</i>			
Saya mengaku bahawa tahap akses tesis/disertasi ini sebagai (*Tandakan ✓ dalam kotak bagi maklumat yang berkaitan; tandakan satu (1) kotak di bawah sahaja): <i>I hereby declare the level of access for this thesis/dissertation as follows (tick ✓ the relevant box below; tick only one option).</i>			
Pilihan Tahap Akses Access Level Selection		Tafsiran Tahap Akses Tesis/Disertasi Definition of Thesis/Dissertation Access Level	
<input type="checkbox"/>	<b>RAHSIA (CONFIDENTIAL)</b>	Mengandungi maklumat rahsia sepertimana yang diperuntukan bawah Akta Rahsia Rasmi 1972. <i>Contains classified information as stipulated under the Official Secrets Act 1972.</i>	
<input type="checkbox"/>	<b>TERHAD (RESTRICTED)</b>	Mengandungi maklumat yang hanya boleh diakses oleh pihak yang mempunyai kebenaran atau keperluan tertentu untuk mengetahuinya yang ditentukan oleh organisasi/ badan di mana penyelidikan dijalankan. <i>Contains information that may only be accessed by parties with specific authorization</i>	



UKM-SPKPPP-PT(PdP)-05-AK04-BO07

No. Semakan: 02

Tarikh Kuat Kuasa:  
27/01/2026

**BORANG DAN SENARAI SEMAK PENYERAHAN TESIS/DISERTASI SELEPAS PEMBETULAN**  
**FORM AND CHECKLIST OF AMENDED THESIS/DISSERTATION SUBMISSION**

		<i>or a defined need to know, as determined by the organization or body where the research is conducted.</i>
<input checked="" type="checkbox"/>	<b>AKSES TERBUKA (OPEN ACCESS)</b>	<p>Tesis/disertasi versi akhir dalam format PDF yang boleh diakses secara percuma secara dalam talian dan bebas dari isu hak cipta dan pelesenan <i>The final version of the thesis/dissertation in PDF format that is freely accessible online and free from copyright and licensing issues.</i></p> <p>Kementerian Pendidikan Tinggi melalui surat bertarikh 27 Mac 2025 memutuskan bahawa kebenaran akses tesis / disertasi dalam borang serahan akses terbuka ditentukan oleh penyelia (bukan pelajar). <i>The Ministry of Higher Education, through a letter dated 27 March 2025, has decided that permission for thesis / dissertation access in the open access submission form shall be determined by the supervisor (not the student).</i></p>
<input type="checkbox"/>	<b>EMBARGO</b>	<p>Tempoh masa di mana akses kepada tesis/disertasi disekat (ditutup) selama dua (2) tahun atas sebab-sebab tertentu sebagai contoh kerahsiaan atau hak cipta. Tesis/disertasi akan berstatus akses terbuka selepas tamat tempoh <i>embargo</i>. <i>The period during which access to the thesis/dissertation is restricted for two (2) years due to specific reasons, such as confidentiality or copyright. The thesis/dissertation will be granted open-access status upon the expiry of the embargo period.</i></p>

PENGESAHAN PELAJAR (STUDENT VERIFICATION)		PENGESAHAN PENYELIA (SUPERVISOR VERIFICATION)	
 <b>TANDATANGAN PELAJAR (STUDENT'S SIGNATURE)</b>		 <b>TANDATANGAN PENYELIA / PENERUSI JK SISWAZAH (SUPERVISOR'S / CHAIRPERSON SUPERVISION COMMITTEE SIGNATURE)</b>	
Nama Pelajar (Student name): Hooi Yoong Khuen No. Pendaftaran Pelajar (Student's Registration No.): P131417  Tarikh: 29/4/2026 (Date)		Nama Penyelia / Pengerusi JK Siswazah (Supervisor's / Chairperson Supervision Committee Name): <b>PROF. MADYA DR. TEOH SEONG LIN</b> B. Biomed Sc (Hons)(UKM), M.Med Sc(Anat)(UKM), Ph.D (Monash) Penolong Dekan (Kualiti & Strategi) Pensyarah, Jabatan Anatomi Fakulti Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia Tarikh: 11 Mei 2026 (Date)	

KESAN SUNTIKAN INTRAPERITONEAL HIDROKSITIRO SOL  
DOS TUNGGAL DALAM MODEL KECEDEeraan OTAK  
TRAUMATIK IKAN ZEBRA



TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH  
SARJANA SAINS PERUBATAN (ANATOMI)

FAKULTI PERUBATAN  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
KUALA LUMPUR

2026

**PENGAKUAN**

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

12 Mei 2026

HOOI YOONG KHUEN  
P131417



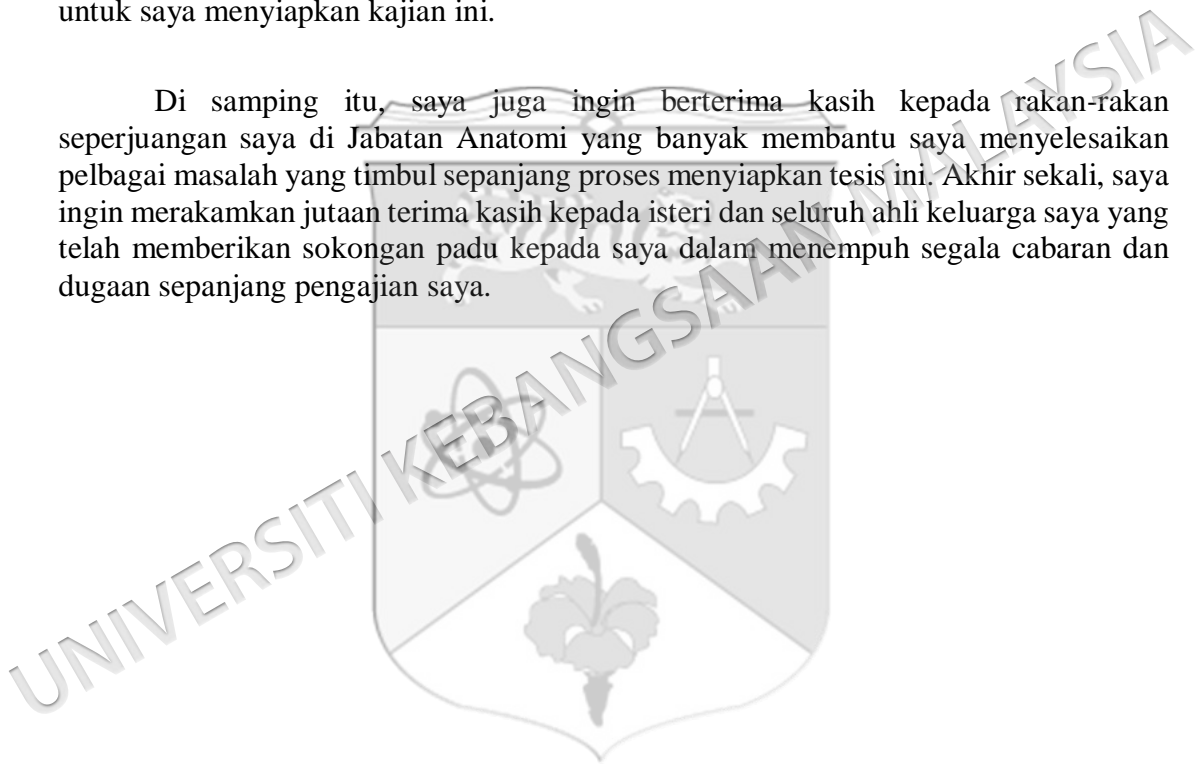
## PENGHARGAAN

Terlebih dahulu saya bersyukur kepada Tuhan kerana memberikan saya kesihatan fizikal dan mental yang baik sepanjang masa saya menyempurnakan tesis ini.

Jutaan terima kasih saya ingin ucapkan kepada penyelia utama saya iaitu Prof. Madya Dr. Teoh Seong Lin dan penyelia bersama, Dr. Mohamad Fairuz bin Yahaya kerana telah membimbing saya dengan memberikan idea yang bernas, nasihat dan teguran sepanjang kajian ini dilaksanakan.

Selain itu, saya juga ingin merakamkan penghargaan saya kepada Jabatan Anatomi yang telah menyediakan segala kemudahan dan peralatan yang diperlukan untuk saya menyiapkan kajian ini.

Di samping itu, saya juga ingin berterima kasih kepada rakan-rakan seperjuangan saya di Jabatan Anatomi yang banyak membantu saya menyelesaikan pelbagai masalah yang timbul sepanjang proses menyiapkan tesis ini. Akhir sekali, saya ingin merakamkan jutaan terima kasih kepada isteri dan seluruh ahli keluarga saya yang telah memberikan sokongan padu kepada saya dalam menempuh segala cabaran dan dugaan sepanjang pengajian saya.



## ABSTRAK

Kecederaan otak traumatik (TBI) merupakan salah satu penyebab utama ketidakupayaan di seluruh dunia dan memberi cabaran yang besar kepada keluarga pesakit dan perkhidmatan kesihatan. Sehingga hari ini, tiada rawatan khusus yang berkesan untuk merawat TBI disebabkan oleh kecederaan neuron yang bersifat kekal akibat TBI. Terdapat banyak ubat atau herba tradisional telah dikaji menggunakan modal haiwan untuk merawat TBI. Hidroksitirosol (HT) merupakan satu agen antioksidan dan antiinflamasi yang berupaya mempamerkan kesan neuroprotektif terutamanya untuk penyakit neurodegeneratif seperti penyakit Alzheimer dan Parkinson. Justeru itu, kajian ini dijalankan untuk menilai kesan rawatan HT terhadap model TBI ikan zebra. Model TBI dihasilkan melalui kecederaan tikaman pada telensefalon, diikuti dengan suntikan intraperitoneal HT pada dos 10 dan 100 mg/kg atau plasebo. Ekspresi gen inflamasi dan proliferasi sel dianalisis menggunakan qPCR pada hari ke-3 dan ke-21 selepas TBI. Tahap kebimbangan ikan zebra dinilai menggunakan Novel Tank Test pada hari pertama, ke-14 dan ke-21 selepas kecederaan. Kematian sel neuron dianalisis menggunakan ujian TUNEL pada 4 jam dan hari ke-3 selepas TBI. Hasil kajian menunjukkan dos HT pada 10 mg/kg berupaya untuk mengurangkan proses inflamasi pada peringkat awal TBI dengan menunjukkan penurunan signifikan ( $p < 0.05$ ) dalam ekspresi gen *il1 $\beta$*  dan *tnf $\alpha$*  berbanding dengan plasebo serta mengurangkan kematian sel neuron pada peringkat awal TBI. Rawatan HT juga didapati tidak memberikan kesan yang signifikan terhadap pengurangan tahap kebimbangan ikan zebra selepas TBI. Kesimpulannya, HT berpotensi dikembangkan sebagai satu agen terapeutik bagi rawatan sampingan untuk TBI.

## EFFECTS OF A SINGLE-DOSE INTRAPERITONEAL INJECTION OF HYDROXYTYROSOL IN A ZEBRAFISH TRAUMATIC BRAIN INJURY MODEL

### ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) is one of the leading causes of disability worldwide and poses significant challenges to the patients' families and healthcare systems. To date, there is no effective treatment for TBI, largely due to the permanent damage of the neurons resulting from the injury. Numerous drugs and traditional herbal compounds have been investigated using animal models to treat TBI. Hydroxytyrosol (HT) is a potent antioxidant and anti-inflammatory agent that has been shown to exhibit neuroprotective effects, especially for neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease. Therefore, this study was conducted to evaluate the effects of HT treatment on zebrafish TBI model. The TBI model was induced by a stab injury to the telencephalon, followed by intraperitoneal administration of HT at doses of 10 and 100 mg/kg or placebo. Inflammatory gene expression and cell proliferation were analysed using qPCR on days 3 and 21 post-TBI. Anxiety-like behaviour were assessed using the Novel Tank Test on days 1, 14 and 21 after injury. Neuronal cell death was evaluated using the TUNEL assay at 4 hours and on day 3 post-TBI. The results demonstrated that HT at a dose of 10 mg/kg significantly reduced inflammatory processes at the early stage of TBI, as indicated by a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the expression of *il1fma* and *tnfa* genes compared with the placebo group and also attenuated early-stage neuronal cell death. Besides that, HT treatment did not result in a statistically significant reduction in anxiety-like behaviour in zebrafish following TBI. In conclusion, HT shows potential as a therapeutic agent to be developed as an adjunct treatment for TBI.

## KANDUNGAN

		<b>Halaman</b>
<b>PENGAKUAN</b>		<b>ii</b>
<b>PENGHARGAAN</b>		<b>v</b>
<b>ABSTRAK</b>		<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b>		<b>vii</b>
<b>KANDUNGAN</b>		<b>viii</b>
<b>SENARAI JADUAL</b>		<b>xi</b>
<b>SENARAI ILUSTRASI</b>		<b>xii</b>
<b>SENARAI SINGKATAN</b>		<b>xiii</b>
<b>BAB I</b>	<b>Pengenalan</b>	
1.1	Latar Belakang	1
1.2	Kepentingan Kajian	2
1.3	Objektif kajian	3
	1.3.1 Objektif Umum	3
	1.3.2 Objektif Khusus	3
1.4	Hipotesis	3
<b>BAB II</b>	<b>Kajian Literatur</b>	
2.1	Klasifikasi TBI	4
2.2	Patofisiologi TBI dalam manusia	5
2.3	Neurogenesis Otak Ikan Zebra Berikutan TBI	8
2.4	Jenis-jenis Model TBI dalam Ikan Zebra	12
2.5	Prinsip Pengurusan TBI Pada Masa Kini	16
2.6	Hidroksitirozol	17
<b>BAB III</b>	<b>Bahan dan Kaedah Kajian</b>	
3.1	Pengenalan	20
3.2	Bahan	20
	3.2.1 Haiwan Kajian	20
	3.2.2 Bahan Kimia	20
	3.2.3 Alat Radas	21

3.3	Kaedah	22
3.3.1	Reka Bentuk Kajian	22
3.3.2	Pengiraan Saiz Sampel	27
3.3.3	Proses Pembiusan Ikan Zebra	29
3.3.4	Kecederaan Tikaman ke dalam Telensefalon Ikan Zebra	29
3.3.5	Suntikan Intraperitoneal ke dalam Rongga Intraperitoneal Ikan Zebra	30
3.3.6	Pengorbanan Ikan Zebra	30
3.3.7	Analisis Ekspresi Gen Menggunakan qPCR	31
3.3.8	Analisis Tahap Kebimbangan Ikan Zebra Menggunakan Novel Tank Test	34
3.3.9	Analisis Kematian Sel Menggunakan Ujian TUNEL	34
3.3.10	Analisis Statistik	36
<b>BAB IV</b>	<b>KEPUTUSAN KAJIAN</b>	
4.1	Analisis Ekspresi Gen	38
4.1.1	Gen <i>illfma</i>	38
4.1.2	Gen <i>tnfa</i>	39
4.1.3	Gen <i>il10</i>	40
4.1.4	Gen <i>pcna</i>	41
4.1.5	Ringkasan Penemuan untuk Analisis Ekspresi Gen	41
4.2	Analisis Tahap Kebimbangan Ikan Zebra	42
4.2.1	Jumlah Jarak Berenang	42
4.2.2	Peratusan Masa yang Dhabiskan di Dalam Zon Atas	43
4.2.3	Masa Statik	44
4.2.4	Kelajuan Purata	45
4.2.5	Ringkasan Penemuan untuk Analisis Tahap Kebimbangan Ikan Zebra	46
4.3	Analisis Kematian Sel (Ujian TUNEL)	47
<b>BAB V</b>	<b>PERBINCANGAN</b>	
5.1	Analisis Ekspresi Gen	49
5.2	Analisis Tahap kebimbangan Ikan Zebra	53
5.3	Analisis Kematian Sel (Ujian TUNEL)	55
<b>BAB VI</b>	<b>RUMUSAN</b>	
6.1	Kesimpulan	57
6.2	Limitasi	57

6.3	Cadangan Kajian Lanjutan	58
<b>RUJUKAN</b>		59
Lampiran A	Surat Kelulusan untuk Menjalankan Kajian	71
Lampiran B	Surat Kelulusan Jawatankuasa Etika Haiwan	72
Lampiran C	Pembentangan Persidangan	73
Lampiran D	Penerbitan	74



## SENARAI JADUAL

<b>No. Jadual</b>		<b>Halaman</b>
Jadual 2.1	Zon Proliferasi Otak Ikan Zebra	8
Jadual 2.2	Model TBI Menggunakan Larva Ikan Zebra	13
Jadual 2.3	Model TBI Menggunakan Ikan Zebra Dewasa	15
Jadual 2.4	Kepelbagaian Sifat dan Mekanisme HT dalam Kajian Praklinikal	18
Jadual 2.5	Mekanisme Perlindungan Neuron oleh HT Terhadap Penyakit Neurologi	19
Jadual 3.1	Jujukan Primer Khusus Gen	24
Jadual 3.2	Kumpulan Ikan Zebra untuk Analisis Ekspresi Gen	24
Jadual 3.3	Kumpulan Ikan Zebra untuk Analisis Tahap Kebimbangan dan Ujian TUNEL	25
Jadual 3.4	Isipadu Setiap Komponen untuk Proses Transkripsi Terbalik	33
Jadual 3.5	Isipadu Setiap Komponen untuk Proses Campuran Primer	33
Jadual 4.1	Ringkasan Penemuan untuk Analisis Ekspresi Gen	42
Jadual 4.2	Purata Jumlah Jarak Berenang Ikan Zebra (m)	42
Jadual 4.3	Ringkasan Penemuan untuk Analisis Tahap Kebimbangan Ikan Zebra	46

## SENARAI ILUSTRASI

<b>No. Rajah</b>		<b>Halaman</b>
Rajah 2.1	Mekanisme Kecederaan Otak Sekunder dalam Patofisiologi TBI	7
Rajah 2.2	Zon Proliferasi Otak Ikan Zebra	9
Rajah 2.3	Keratan Koronal Telencephalon Ikan Zebra Menunjukkan Lokasi Setiap Sel Progenitor	10
Rajah 2.4	Proses Perkembangan Sel-Sel Progenitor Dalam Otak Ikan Zebra	11
Rajah 3.1	Carta Aliran Analisis Ekspresi Gen	25
Rajah 3.2	Carta Aliran Analisis Tahap Kebimbangan Ikan Zebra	26
Rajah 3.3	Carta Aliran Analisis Kematian Sel (Ujian TUNEL)	27
Rajah 3.4	Kecederaan tikaman ke dalam telensefalon kiri ikan zebra	30
Rajah 4.1	Nisbah ekspresi gen <i>il1fma</i> untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra	38
Rajah 4.2	Nisbah ekspresi gen <i>tnfa</i> untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra	39
Rajah 4.3	Nisbah ekspresi gen <i>il10</i> untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra	40
Rajah 4.4	Nisbah ekspresi gen <i>pcna</i> untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra	41
Rajah 4.5	Jumlah jarak berenang untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra	43
Rajah 4.6	Peratusan masa yang dihabiskan di dalam zon atas untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra	44
Rajah 4.7	Masa statik untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra	45
Rajah 4.8	Kelajuan purata untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra	46
Rajah 4.9	Analisis kematian sel menggunakan ujian TUNEL	48
Rajah 5.1	Rumusan Hipotesis Kesan Rawatan HT Terhadap Proses Inflamasi Model TBI Ikan Zebra	53

## SENARAI SINGKATAN

<i>actb1</i>	Beta-aktin
BBB	Penghalang darah otak
BDNF	Faktor neurotropik terbitan otak
BMP	Protein morfogenetik tulang
BrdU	Bromodeoksiuridin
cDNA	Pelengkap asid deoksiribonukleik
DAI	<i>Diffuse axonal injury</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Dietilpirokarbonat
DF	<i>Degree of freedom</i>
DNA	Asid deoksiribonukleik
FGF	Faktor pertumbuhan fibroblast
GCS	Skala Koma Glasgow
GFAP	Protein Fibrillary Berasid Glial
HT	Hidroksitirosol
ICH	Pendarahan intrakranial
ICP	Tekanan intrakranial
IHC	Imunohistokimia
IL	Interleukin
NEC	Sel neuroepithelial
NMDA	<i>N-methyl-d-aspartate</i>
NSC	Sel stem saraf
NTC	<i>No template control</i>
OCT	Suhu Pemotongan Optimum
PBS	Garam Penimbal Fosfat

PFA	Paraformaldehid
<i>pcna</i>	Antigen nukleus sel proliferasi
pHIFU	<i>Pulsed high intensity focused ultrasound</i>
PSA-NCAM	Molekul Lekatan Sel Neural Asid Polisialik
QA	Asid quinolinik
qPCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RGC	Sel radial glial
RNA	Asid ribonukleik
RNS	Spesis nitrogen reaktif
ROS	Spesis oksigen reaktif
SGZ	Zon subgranular
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
SVZ	Zon subventrikular
□ □ □ □	Protein pengikat kalsium beta
TBI	Kecederaan otak traumatik
<i>tnfa</i>	Faktor nekrosis tumor-alfa
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling</i>
YLD	Tahun hidup kurang upaya
Wnt	<i>Wingless-Int</i>

## **BAB I**

### **PENGENALAN**

#### **1.1 LATAR BELAKANG**

Kecederaan otak traumatik (TBI) merupakan salah satu penyebab utama ketidakupayaan di dunia yang sentiasa memberikan bebanan kepada keluarga dan perkhidmatan kesihatan. Statistik TBI Asia Tenggara mengikut beban penyakit global pada tahun 2021 menunjukkan bahawa terdapat 1.39 juta kes baru dan 0.38 juta tahun hidup dengan kurang upaya (*years lived with disability*, YLD) (Yan, Wang & Sun 2025). TBI berlaku apabila sesuatu objek luar yang tumpul atau tajam secara tiba-tiba mengenai kepala atau apabila daya inersia menggegarkan kepala menyebabkan kecederaan pecutan-nyahpecutan (Menon et al. 2010; Pervez, Kitagawa & Chang 2018). Ini seterusnya mengganggu fungsi otak yang boleh membawa kepada kehilangan sementara fungsi otak atau kecederaan otak yang kekal.

TBI boleh berlaku akibat pelbagai faktor seperti jatuh dari tempat tinggi, kemalangan jalan raya, dipukul oleh objek tumpul, ditikam oleh objek tajam, kecederaan pecutan-nyahpecutan dan kecederaan letupan. TBI mempunyai patofisiologi yang kompleks dan boleh dibahagikan kepada dua fasa iaitu kecederaan otak primer dan sekunder. Stres oksidatif adalah satu fenomena yang melibatkan gangguan keseimbangan antara penghasilan radikal bebas oksigen dan agen antioksidasi yang berlaku semasa kecederaan otak sekunder (Fesharaki-Zadeh 2022). Kombinasi antara stres oksidatif dan faktor-faktor lain seperti keradangan neuron, eksitotoksisiti, dan disfungsi mitokondria akan menyumbang kepada lebih banyak kecederaan dan kematian neuron. Sehingga kini, rawatan TBI adalah tertumpu kepada pengurangan kecederaan otak sekunder kerana kecederaan otak primer tidak dapat dipulihkan.

Justeru itu, pemberian bahan yang mempunyai sifat antioksidasi dan antiinflamasi berpotensi memberikan manfaat dalam rawatan TBI.

Terdapat pelbagai bahan semula jadi yang dikenal pasti mempunyai sifat pelindung neuron. Hidroksitirosol (*hydroxytyrosol*, HT) merupakan sebatian fenolik yang berasal daripada minyak zaitun yang mempamerkan sifat pelindung neuron dalam pelbagai penyakit neurologi seperti penyakit Alzheimer, penyakit Parkinson dan strok iskemia (Chen, Ai & Wei 2021). Pelbagai kajian terkini telah menjelaskan mekanisme sifat pelindung neuron HT. Sebagai contoh, HT boleh menghalang pembentukan agregat amiloid dalam model penyakit Alzheimer (Sirangelo et al. 2020). Dalam penyakit Parkinson, HT bertindak sebagai agen antioksidasi, antiinflamasi dan mengurangkan kehilangan neuron dopamin (Siracusa et al. 2020). Selain itu, HT juga boleh mengurangkan ketoksikan alfa-sinuklein dalam penyakit Parkinson (Palazzi et al. 2020). Manakala untuk penyakit strok iskemia, HT boleh meningkatkan aliran darah serebrum dan ekspresi faktor neurotropik terbitan otak (BDNF) (Calahorra et al. 2019). Sehingga kini, tiada kajian telah mengkaji kesan HT dalam TBI.

Model haiwan memainkan peranan penting dalam kajian TBI. Namun sehingga kini, tiada model haiwan yang mampu mereplikasi sepenuhnya aspek TBI dalam manusia disebabkan oleh sifat heterogen dan kerumitan patofisiologi TBI dalam manusia (Deshetty & Periyasamy 2023). Dalam pelbagai model haiwan yang digunakan dalam kajian TBI, ikan zebra (*Danio rerio*) telah muncul sebagai model haiwan yang berpotensi. Antara keunikan ikan zebra yang tiada dalam model haiwan yang lain ialah keupayaan regenerasi otak, persamaan genetik dengan manusia, dan mempunyai embrio dan larva yang telus (Adhish & Manjubala 2023). Kelebihan ini membolehkan ikan zebra memainkan peranan yang penting dalam kajian TBI terutamanya yang melibatkan pemahaman mekanisme regenerasi neuron.

## 1.2 KEPENTINGAN KAJIAN

HT telah banyak digunakan dalam kajian neurosains yang melibatkan pelbagai penyakit neurologi. Namun begitu, sehingga kini, tiada kajian yang menilai keberkesanan HT dalam merawat TBI. Justeru itu, kajian ini adalah amat penting untuk meneroka potensi

HT dalam membantu proses regenerasi neuron dan juga keupayaannya bertindak sebagai agen antioksidan dan antiinflamasi dalam TBI ikan zebra.

### 1.3 OBJEKTIF KAJIAN

#### 1.3.1 Objektif Umum

Kajian ini bertujuan untuk mengenal pasti kesan rawatan HT dalam model TBI ikan zebra dewasa.

#### 1.3.2 Objektif Khusus

- i) Mengetahui pasti kesan rawatan HT terhadap ekspresi gen proinflamasi (*il1fma* dan *tnfa*); gen antiinflamasi (*il10*); dan gen proliferasi sel (*pcna*) dalam otak model TBI ikan zebra.
- ii) Mengetahui pasti kesan rawatan HT terhadap tahap keseimbangan dalam model TBI ikan zebra menggunakan *Novel Tank Test*.
- iii) Mengetahui pasti kesan rawatan HT terhadap kematian sel dalam otak model TBI ikan zebra menggunakan ujian TUNEL.

### 1.4 HIPOTESIS

- i) Rawatan HT dapat mengurangkan ekspresi gen proinflamasi (*il1fma* dan *tnfa*); meningkatkan ekspresi gen antiinflamasi (*il10*) dan gen proliferasi sel (*pcna*) dalam otak model TBI ikan zebra.
- ii) Rawatan HT dapat mengurangkan tahap keseimbangan dalam model TBI ikan zebra menggunakan *Novel Tank Test*.
- iii) Rawatan HT dapat mengurangkan kematian sel dalam otak model TBI ikan zebra menggunakan ujian TUNEL.

## BAB II

### KAJIAN LITERASI

#### 2.1 KLASIFIKASI TBI

TBI boleh diklasifikasikan mengikut beberapa kriteria seperti keterukan, lokasi, mekanisme kecederaan, dan patofisiologi (Manley et al. 2025; Ng & Lee 2019). Setiap klasifikasi mempunyai kepentingan tersendiri untuk tujuan rawatan klinikal ataupun penyelidikan. Sebagai contoh, klasifikasi TBI berdasarkan keterukan dan lokasi kecederaan adalah penting dari segi klinikal dalam menentukan prognosis pesakit dan pemilihan kaedah rawatan, manakala klasifikasi TBI mengikut mekanisme kecederaan dan patofisiologinya adalah lebih relevan dalam bidang penyelidikan (Manley et al. 2025; Ng & Lee 2019). Dari segi keterukan kecederaan, TBI boleh dibahagikan kepada ringan, sederhana, dan teruk mengikut beberapa parameter klinikal seperti Skala Koma Glasgow (GCS), tempoh hilang kesedaran, dan amnesia selepas trauma (Nichols et al. 2025). Parameter klinikal seperti GCS yang mempunyai komponen lisan tidak dapat direplikasi dalam model haiwan. Selain itu, amnesia selepas trauma juga sukar untuk direplikasi dalam model haiwan disebabkan kemerosotan ingatan manusia adalah lebih kompleks manakala untuk haiwan seperti ikan zebra, komponen ingatannya adalah lebih tertumpu kepada ingatan spatial visual (Locskai et al. 2025). TBI juga boleh diklasifikasikan mengikut lokasi kecederaan seperti kontusi otak, pendarahan epidural, subdural, subarachnoid, intraparenkimal dan *diffuse axonal injury* (DAI) (Wilson et al. 2022). Untuk mekanisme kecederaan pula, TBI boleh dikategorikan kepada kecederaan tumpul, tajam, letupan, konkusi dan pecutan-nyahpecutan (Ng & Lee 2019). Klasifikasi TBI mengikut patofisiologi akan dibincangkan dalam topik seterusnya.

## 2.2 PATOFISIOLOGI TBI DALAM MANUSIA

TBI mempunyai patofisiologi yang kompleks dan boleh dibahagikan kepada dua fasa iaitu kecederaan otak primer dan sekunder. Kecederaan otak primer berlaku serta merta ketika impak awal akibat daya mekanikal yang secara langsung mencederakan atau merosakkan tisu otak (Ng & Lee 2019). Kecederaan otak sekunder merupakan siri perubahan susulan yang dicetuskan oleh kecederaan otak primer, yang melibatkan tindakbalas selular dan molekular, yang seterusnya menyumbang kepada kerosakan yang lebih lanjut kepada neuron (Khatri et al. 2021). Kecederaan otak sekunder boleh berlaku dalam tempoh sejam sehingga bertahun-tahun kemudian selepas impak (Ng & Lee 2019). TBI juga mempunyai kecenderungan untuk berkembang menjadi penyakit neurodegeneratif seperti penyakit Alzheimer dan Parkinson melalui proses penghasilan proteinopati (Delic et al. 2020; Gupta & Sen 2016).

Terdapat dua jenis mekanisme yang boleh menyebabkan kecederaan otak primer iaitu kecederaan otak tertumpu (*focal*) dan bertaburan (*diffuse*) (Ng & Lee 2019). Kecederaan otak tertumpu melibatkan suatu kawasan yang spesifik di dalam otak dan biasanya disebabkan oleh hentakan, mampatan dan objek tajam yang boleh mengakibatkan keretakan tengkorak dan kontusi setempat (Ng & Lee 2019). Kontusi sekunder atau kecederaan *contre-coup* boleh berlaku di sisi yang berlawanan pada lokasi kecederaan asal disebabkan oleh impak sekunder yang mengakibatkan otak melantun ke arah bertentangan dan mengenai tengkorak (Ng & Lee 2019). Sementara itu, kecederaan otak bertaburan melibatkan taburan kawasan kecederaan yang lebih luas dan umum yang merangkumi kecederaan otak yang paling ringan iaitu konkusi otak sehingga kecederaan otak yang paling teruk iaitu DAI (Santurro et al. 2025). Konkusi otak ditakrifkan sebagai kehilangan sementara fungsi otak dengan tiada kerosakan struktur yang dapat dikesan daripada imej radiologi (Choe 2016). DAI berlaku dalam kemalangan jalan raya berkelajuan tinggi disebabkan oleh daya pecutan-nyahpecutan yang mengakibatkan akson neuron mericih (Santurro et al. 2025).

Kecederaan otak sekunder berpunca daripada gangguan biologi susulan kecederaan primer. Mekanisme utama yang menyebabkan kematian neuron termasuk kerosakan penghalang darah otak (BBB), eksitotoksikiti, disfungsi mitokondria, stres oksidatif, dan neuroinflamasi (Khatri et al. 2021; Ng & Lee 2019). Selepas impak awal

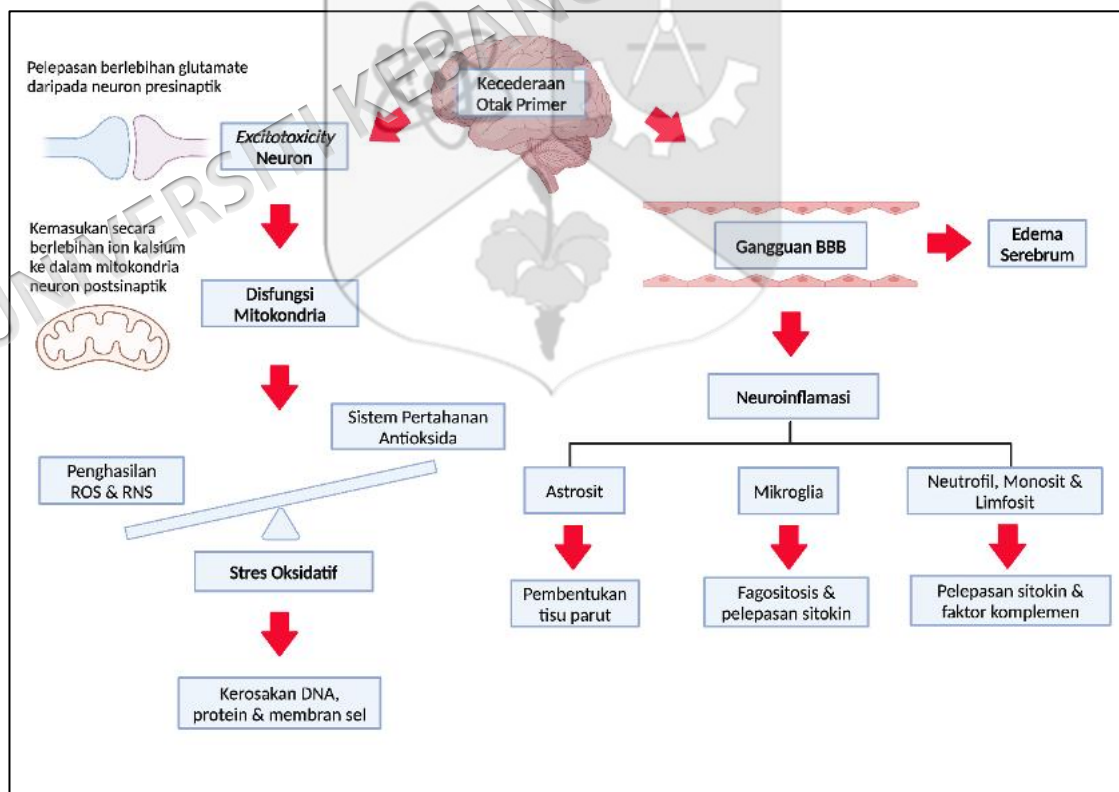
yang berlaku dalam kecederaan otak primer, terdapat dua mekanisme yang menyebabkan gangguan BBB iaitu kerosakan sel endothelial dan kehilangan protein *tight junction* (Cash & Theus 2020). Gangguan BBB boleh berlaku dalam tempoh masa sejam sehingga bertahun-tahun selepas impak awal (Hay et al. 2015). Disfungsi BBB akan menyebabkan kemasukan sel-sel imun dan edema serebrum (Cash & Theus 2020).

Peristiwa kedua yang berlaku dalam kecederaan otak sekunder ialah eksitotoksisiti. Pelepasan berlebihan glutamat daripada terminal saraf presinaptik neuron yang tercedera akan mengikat kepada *ligand-gated ion channel* iaitu reseptor N-methyl-d-aspartate (NMDA) seterusnya menyebabkan kemasukan ion kalsium secara berlebihan ke dalam neuron postsinaptik dan proses ini dikenali sebagai eksitotoksisiti (Chamoun et al. 2010; Ng & Lee 2019). Keadaan ini akan mengakibatkan pengumpulan kalsium dalam mitokondria seterusnya menyebabkan disfungsi mitokondria (Khatri et al. 2021; Ng & Lee 2019). Disfungsi mitokondria akan meningkatkan penghasilan radikal bebas seperti spesis oksigen reaktif (ROS) dan spesis nitrogen reaktif (RNS) (Khatri et al. 2021; Ng & Lee 2019). Stres oksidatif akan terjadi apabila berlaku ketidakseimbangan antara radikal bebas dan sistem pertahanan antioksidan (Fesharaki-Zadeh 2022). ROS bukan sahaja akan merosakkan asid deoksiribonukleik (DNA) dan protein tetapi juga membran fosfolipid yang akan bertukar menjadi radikal lipoperoksil, seterusnya merosakkan lagi membran sel neuron dan proses ini dikenali sebagai peroksidaan lipid (Ng & Lee 2019).

Neuroinflamasi memainkan peranan yang penting dalam kecederaan otak sekunder. Kerosakan BBB membenarkan infiltrasi sel neutrofil, monosit dan limfosit ke dalam tisu otak (Cash & Theus 2020). Leukosit-leukosit ini akan melepaskan faktor komplemen dan sitokin pro-inflamasi seperti interleukin-1 alfa (IL-1 ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), dan faktor nekrosis tumor-alfa (TNF- ) (Ng & Lee 2019). TNF- juga akan berinteraksi dengan Fas ligand seterusnya mengaktifkan sistem caspase yang penting dalam proses apoptosis sel (Morganti-Kossmann et al. 2002). Tambahan pula, kecederaan otak selepas TBI akan mengaktifkan proliferasi sel-sel glial seperti mikroglia dan astrosit (Ng & Lee 2019). Mikroglia akan melepaskan sitokin dan terlibat dalam proses fagositosis sel-sel yang mati dalam otak (Jassam et al. 2017). Sementara itu, astrosit akan mengalami proses astrogliosis reaktif yang

bertanggungjawab dalam pembentukan tisu parut dalam otak selepas kecederaan (Jassam et al. 2017). Rajah 2.1 menunjukkan mekanisme kecederaan otak sekunder dalam patofisiologi TBI.

Selepas TBI, otak manusia akan melalui satu proses yang dipanggil neuroplastisiti. Neuroplastisiti adalah keupayaan otak untuk mengubah struktur dan fungsinya secara adaptif sebagai respons kepada kecederaan atau penyakit (Gazerani 2025). Neuroplastisiti merangkumi proses neurogenesis, pembentukan sinaps neuron yang baru, plastisiti sinaps, dan penyusunan semula fungsi otak (Gazerani 2025). Salah satu perbezaan utama antara mekanisme TBI manusia dan ikan zebra ialah otak manusia mempunyai keupayaan neurogenesis otak manusia yang terhad berbanding dengan otak ikan zebra (Kvistad et al. 2024). Selain itu, otak manusia akan membentuk tisu parut selepas TBI tidak seperti otak ikan zebra yang akan mengalami proses neurogenerasi yang penuh (Ghaddar et al. 2021). Proses neurogenesis otak ikan zebra akan dibincangkan dengan lebih lanjut dalam topik seterusnya.



Rajah 2.1 Mekanisme Kecederaan Otak Sekunder dalam Patofisiologi TBI

### 2.3 NEUROGENESIS OTAK IKAN ZEBRA BERIKUTAN TBI

Neurogenesis merupakan proses proliferasi dan pembezaan sel stem saraf (NSC) kepada neuron yang berfungsi. Neurogenesis merangkumi tiga langkah yang penting iaitu proliferasi sel progenitor, migrasi ke kawasan sasaran dan pembezaan kepada neuron dewasa (Shabani et al. 2020). Proses ini berlaku sepanjang hayat, dari tempoh embrio, antenatal, postnatal sehingga dewasa. Joseph Altman merupakan orang pertama yang memperkenalkan konsep neurogenesis ketika dewasa dengan menggunakan model tikus pada tahun 1965 (Altman & Das 1965).

Dalam mamalia, neurogenesis dewasa hanya berlaku di dua kawasan iaitu zon subventrikular (SVZ) yang terletak di dinding lateral ventrikel lateral dan zon subgranular (SGZ) yang terletak di girus dentate dalam hippocampus (Ghaddar et al. 2021; Kempermann, Song & Gage 2015). Sebaliknya, ikan zebra dewasa mempunyai 16 zon proliferasi di dalam otak seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 2.1 dan Rajah 2.2 (Grandel et al. 2006; Labusch et al. 2020). Daripada 16 zon proliferasi ini, ventral telensefalon (subpallium) dikatakan adalah homolog kepada SVZ mamalia manakala zon lateral dan/atau zon posterior dorsal telensefalon (pallium) otak ikan zebra adalah homolog kepada SGZ mamalia (Diotel et al. 2020).

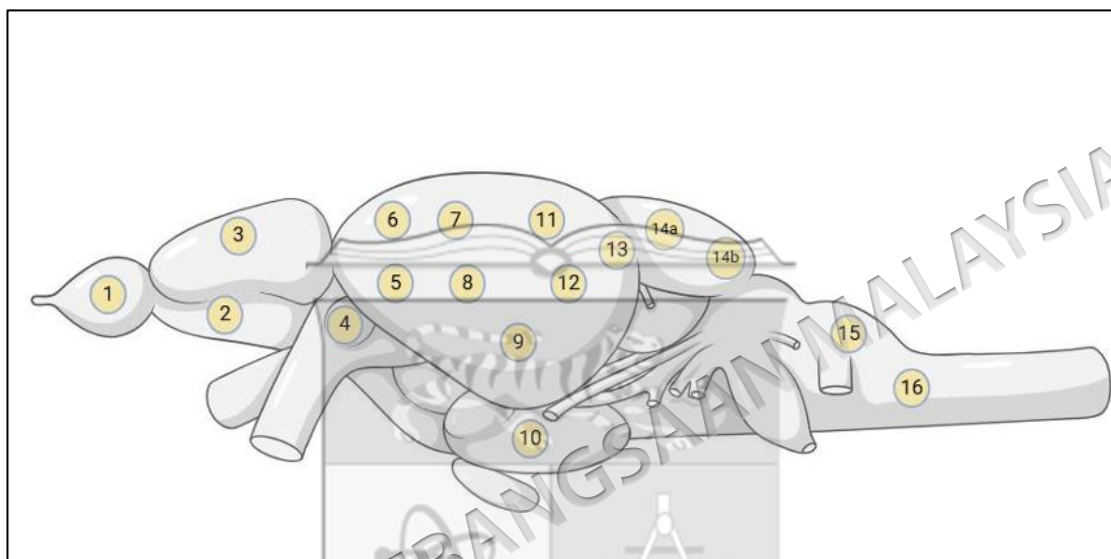
Jadual 2.1 Zon Proliferasi Otak Ikan Zebra

Kawasan	Zon Proliferasi
Telensefalon	1) Bulb olfaktori 2) Telensefalon ventral 3) Telensefalon dorsal
Diensefalon	4) Preoptik 5) Talamus ventral 6) Habenula 7) Pretektal 8) Talamus dorsal 9) Tuberkular posterior 10) Hipotalamus
Mesenkefalon	11) Tektum 12) <i>Torus longitudinalis</i> 13) Lamina mesenkefalic posterior (menhubungkan tektum kepada serebelum)

...sambungan

Rhombensefalon	14a) Serebelum (lapisan molekular: valvula dan <i>corpus cerebelli</i> )
	14b) Serebelum (lobus kaudal)
	15) Lobus facial dan vagal ke nukleus Cajal
	16) Ventrikel rhombensefalon ke saraf tunjang

Sumber: Grandel et al. 2006



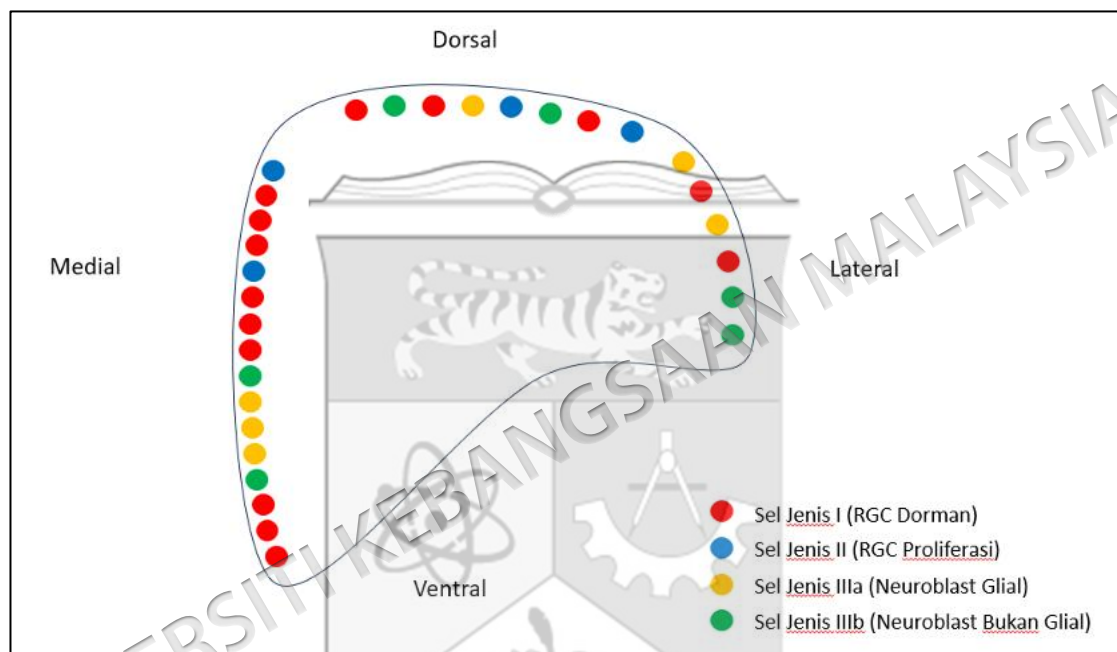
Rajah 2.2 Zon Proliferasi Otak Ikan Zebra

Sumber: Diubahsuai daripada Grandel et al. 2006

Sel radial glial (RGC) merupakan sel utama dalam neurogenesis ikan zebra dewasa. Sel radial glial (RGC) terletak berdekatan dengan ventrikel otak dan mempunyai proses selular yang panjang sehingga mencecah permukaan pia telensefalon (Ghaddar et al. 2021). RGC berasal daripada sel neuroepithelial (NEC) melalui satu proses peralihan yang melibatkan NEC memperoleh ciri-ciri astroglia (Miranda-Negrón & García-Arrarás 2022). Berbanding dengan otak mamalia, RGC dan NEC kekal dalam otak ikan zebra dan mengekalkan sifat neurogeniknya (Ghaddar et al. 2021).

Terdapat banyak laluan isyarat yang membolehkan proses neurogenesis berlaku dalam ikan zebra dewasa seperti faktor pertumbuhan fibroblast (FGF), *Sonic hedgehog* (Shh), *Wingless-Int* (Wnt), protein morfogenetik tulang (BMP), BDNF dan Notch (Diotel et al. 2020). Laluan isyarat ini mengekalkan homeostasis tisu dalam sistem saraf

dengan mengawal keseimbangan antara NSC dorman dengan NSC aktif yang boleh menjalani proses proliferasi dan pembezaan (Diotel et al. 2020). Terdapat empat jenis sel progenitor yang terdapat dalam telencephalon ikan zebra dewasa iaitu jenis I (RGC dorman), jenis II (RGC proliferasi), jenis III (neuroblast) yang boleh dibahagikan lagi kepada IIIa (neuroblast glial) dan IIIb (neuroblast bukan glial) (Ghaddar et al. 2021; März et al. 2010). Lokasi setiap sel progenitor adalah seperti ditunjukkan dalam Rajah 2.3.

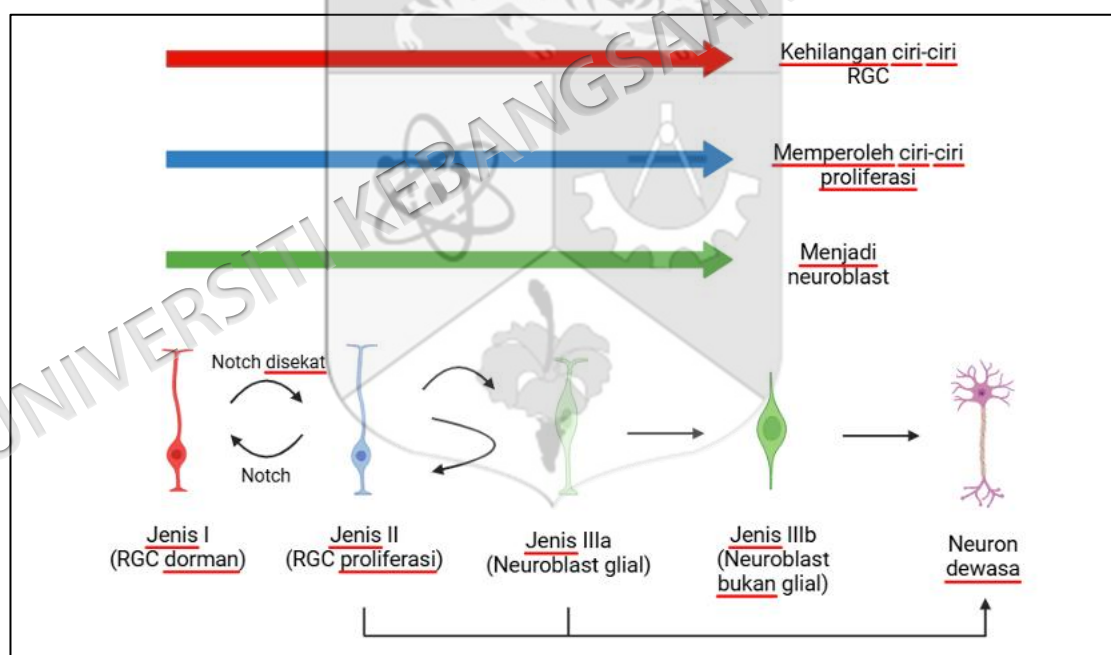


Rajah 2.3 Keratan Koronal Telencephalon Ikan Zebra Menunjukkan Lokasi Setiap Sel Progenitor

Sumber: Diubahsuai daripada März et al. 2010

Antara empat jenis sel ini, hanya sel jenis I tidak mempunyai penanda antigen nukleus sel proliferasi (PCNA) yang menunjukkan sel tersebut berada dalam keadaan dorman (Ghaddar et al. 2021; März et al. 2010). Selain itu, sel-sel progenitor kehilangan ciri-ciri RGC secara beransur-ansur. Ini dapat ditunjukkan melalui penanda RGC yang kuat seperti Protein Pengikat Kalsium Beta  $\square \square \square \square$  dan Protein Fibrillary Berasid Glial (GFAP) dalam sel jenis I dan II berbanding dengan sel jenis IIIa yang menunjukkan penanda RGC yang lemah ataupun tiada manakala sel jenis IIIb tiada penanda RGC (Ghaddar et al. 2021; März et al. 2010). Ekspresi penanda Molekul Lekatan Sel Neural Asid Polisialik (PSA-NCAM) dalam sel jenis IIIa dan IIIb menunjukkan sel-sel tersebut ialah neuroblast yang sedang berkembang dan bermigrasi (Ghaddar et al. 2021; März

et al. 2010). Menurut satu kajian yang dijalankan oleh Chapouton et al. (2010), sel jenis I dan jenis II boleh bertukar sesama sendiri bergantung kepada isyarat Notch. Apabila isyarat Notch diaktifkan, sel jenis II akan bertukar menjadi sel jenis I yang dorman manakala apabila isyarat Notch disekat, sel jenis I akan bertukar menjadi sel jenis II yang akan menghasilkan lebih banyak sel jenis III (neuroblast) (Chapouton et al. 2010; Than-Trong et al. 2018). Sel jenis II boleh menjalani proses pembahagian NSC secara simetri untuk menambah bilangan sel jenis II, pembahagian bukan NSC secara simetri untuk menjadi sel jenis III, pembahagian secara asimetri menjadi sel jenis II dan III atau penukaran secara langsung menjadi neuron dewasa (Barbosa & Ninkovic 2016; Rothenaigner et al. 2011; Than-Trong et al. 2020). Selepas kecederaan, sel jenis III akan berhijrah dari zon ventrikular ke kawasan kecederaan dan akan menjadi neuron dewasa (Barbosa & Ninkovic 2016). Proses perkembangan sel-sel progenitor untuk menjadi neuron dewasa dirumuskan dalam Rajah 2.4.



Rajah 2.4 Proses Perkembangan Sel-Sel Progenitor Dalam Otak Ikan Zebra

Apabila berlaku kecederaan pada telensefalon otak ikan zebra, penjana semula neuron dicetuskan oleh kombinasi aktiviti inflamasi dan laluan isyarat neurogenik (BMP/Notch) (Kizil et al. 2012; Viales et al. 2015; Zhang et al. 2020a). Inflamasi yang disebabkan oleh kecederaan akan mengaktifkan ekspresi faktor

transkripsi *gata3* seterusnya menggalakkan proliferasi dan pembezaan RGC kepada neuron (Caron, Trzuskot & Lindsey 2022; Kizil et al. 2012). Neurogenesis berlaku di sepanjang permukaan ventrikel otak dengan pertambahan sel jenis II yang mempunyai penanda proliferasi PCNA sepanjang tiga hari selepas kecederaan (Ghaddar et al. 2021). Sementara itu, laluan isyarat BMP dan Notch akan mengawal keseimbangan antara NSC dorman dengan NSC aktif dengan melawan isyarat neurogenik dari *gata3* seterusnya mengekalkan NSC dorman (Viales et al. 2015; Zhang et al. 2020a).

Semua mekanisme ini membolehkan proses neurogenesis otak ikan zebra berlaku selepas TBI. Justeru itu, ikan zebra memberi kelebihan kepada manusia untuk mendalami proses neurogenesis supaya suatu hari nanti proses ini dapat diaplikasikan dalam rawatan TBI.

#### 2.4 JENIS-JENIS MODEL TBI DALAM IKAN ZEBRA

Penggunaan model haiwan adalah penting dalam kajian TBI. Secara umumnya, model haiwan yang digunakan dalam kajian TBI boleh dibahagikan kepada model mamalia dan model bukan mamalia. Antara haiwan mamalia yang digunakan dalam kajian TBI adalah seperti tikus, arnab, monyet, anjing, kucing dan kambing biri-biri (Fesharaki-Zadeh & Datta 2024; Xiong, Mahmood & Chopp 2013). Model mamalia banyak digunakan dalam kajian TBI disebabkan oleh persamaan fisiologi dengan manusia. Namun begitu, terdapat limitasi dalam model mamalia seperti kos yang tinggi, masa yang panjang, etika haiwan dan penggunaan teknik pembedahan dalam kajian TBI (Morganti-Kossmann, Yan & Bye 2010; Sorby-Adams, Vink & Turner 2018).

Terdapat peningkatan dalam penggunaan haiwan bukan mamalia seperti ikan zebra (*Danio rerio*), lalat buah (*Drosophila melanogaster*), dan cacing gelang (*Caenorhabditis elegans*). Antara haiwan bukan mamalia ini, ikan zebra telah muncul sebagai haiwan yang paling banyak digunakan dalam kajian TBI (Zulazmi et al. 2021). Antara kelebihan ikan zebra yang tidak terdapat dalam haiwan lain ialah keupayaan penjanaan semula sebahagian daripada otaknya, persamaan genetik dengan manusia, peringkat embrio yang lutsinar dan perkembangannya yang cepat (Kalueff, Stewart & Gerlai 2014; Stewart et al. 2014).

Terdapat pelbagai jenis model TBI ikan zebra yang telah diperkenalkan. Model-model ini dicipta untuk mereplikasi mekanisme TBI yang berbeza dalam manusia yang merangkumi kecederaan otak tembus terbuka, letupan, konkusi dan kecederaan tumpul tertutup. Larva dan dewasa ikan zebra boleh digunakan sebagai model TBI. Setiap model TBI ikan zebra masing-masing mempunyai kelebihan dan limitasinya seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 2.2 dan Jadual 2.3.

Model TBI ikan zebra telah digunakan secara meluas dalam kajian rawatan TBI yang melibatkan penggunaan pelbagai jenis bahan sama ada herba tradisional ataupun bahan kimia yang baru. Antara bahan yang digunakan sebagai agen terapeutik dalam model TBI ikan zebra ialah ekstrak saffron, *cytidine diphosphate-choline* (CDP-choline), dan *Integrated Stress Response Inhibitor* (ISRIB) (Chaoul et al. 2022; Gan et al. 2020; Ilyin et al. 2025). Untuk kajian ini, hidroksitirosol telah dipilih sebagai agen terapeutik untuk model TBI ikan zebra dan akan dibincangkan secara lebih lanjut dalam topik seterusnya.

Jadual 2.2 Model TBI Menggunakan Larva Ikan Zebra

Jenis Model	Mekanisme TBI Manusia	Kaedah	Kelebihan	Limitasi
Konkusi (Beppi et al. 2022)	Konkusi (TBI ringan)	Larva ikan zebra diletakkan di dalam kapsul berisi air dan disambungkan kepada satu peralatan motor yang menghasilkan daya pecutan dan nyahpecutan.	1) Mengelakkan penggunaan ubat bius 2) Tidak invasif	1) Daya impak boleh mencederakan organ lain 2) Transmisi daya dalam cecair berbeza dengan atmosfera
Letupan (Gill et al. 2024)	Kecederaan letupan tertutup	Larva ikan zebra diletakkan di dalam picagari yang berisi air. Pemberat dijatuhkan ke atas pelocok picagari untuk menghasilkan gelombang tekanan yang menyerupai daya letupan.	1) Mengelakkan penggunaan ubat bius 2) Kos efektif 3) Tekanan yang dihasilkan boleh dimodulasi dan diukur	1) Daya impak boleh mencederakan organ lain 2) Tidak dapat mereplikasi peningkatan tekanan intrakranial (ICP) dalam manusia

...sambungan

Kecederaan tikaman ke dalam optik tectum (Herzog et al. 2019)	Kecederaan otak tembus terbuka	Satu kecederaan tikaman dilakukan pada optik tectum larva ikan zebra dengan menggunakan stereomikroskop dan mikromanipulator.	1) Kos efektif 2) Mudah dicapai kerana lokasi cetek optic tectum dalam kepala yang lut sinar	1) Penggunaan ubat bius 2) Sukar untuk mereplikasi kecederaan yang sama untuk setiap larva ikan zebra
Eksitotoksiti glutamik (McCutcheon et al. 2016)	TBI sekunder	Larva ikan zebra diletakkan di dalam bekas berisi air yang dicampurkan dengan larutan asid glutamik untuk mengakibatkan kecederaan eksitotoksiti neuron.	1) Mengelakkan penggunaan ubat bius 2) Kos dan masa yang efektif 3) Tahap kecederaan boleh diubah mengikut dos	Hanya mewakili satu mekanisme dalam TBI sekunder iaitu eksitotoksiti glutamik
Pendarahan intrakranial menggunakan atorvastatin (Crilly et al. 2018)	Pendarahan intrakranial (ICH)	Embrio ikan zebra diletakkan di atas piring petri berisi medium embrio E3 dan atorvastatin selama 24 jam untuk menghasilkan pendarahan intrakranial.	1) Tahap kecederaan boleh diubah mengikut dos 2) ICH secara spontan tanpa pembedahan	Tidak dapat mereplikasi peningkatan ICP dalam manusia
Ikan zebra yang diubah suai secara genetik a) <i>Bubblehead</i> b) <i>Redhead</i> (Buchner et al. 2007; Crilly et al. 2018)	ICH	Larva ikan zebra ( <i>Bubblehead</i> dan <i>Redhead</i> ) yang diubah suai kandungan genetik akan mengalami pendarahan intrakranial.	1) ICH secara spontan tanpa pembedahan 2) Boleh memahami mekanisme pembentukan saluran darah	1) Tidak dapat mereplikasi peningkatan ICP dalam manusia 2) Penggunaan ikan zebra mutan

Jadual 2.3 Model TBI Menggunakan Ikan Zebra Dewasa

Jenis Model	Mekanisme TBI Manusia	Kaedah	Kelebihan	Limitasi
Kecederaan tikaman ke dalam telensefalon (Schmidt et al. 2014)	Kecederaan otak tembus terbuka	Satu jarum 30G digunakan untuk menghasilkan kecederaan tikaman ke dalam telensefalon ikan zebra dewasa di bawah mikroskop.	Mudah, cepat dan kos efektif	1) Kecederaan di sekeliling kawasan sasaran 2) Boleh menyebabkan kebocoran cecair serebrospinal akibat kecederaan ventrikel 3) Sukar untuk mereplikasi kecederaan yang sama untuk setiap ikan zebra
Model kejatuhan pemberat (Maheras et al. 2018)	Konkusi (TBI ringan)	Pemberat dijatuhkan dari satu ketinggian yang ditetapkan melalui satu tiub ke atas kranium ikan zebra untuk menghasilkan kecederaan konkusi.	1) Kos efektif 2) Menilai kehilangan memori ruangan dalam TBI ringan	1) Mungkin akan mencederakan bahagian ikan zebra yang lain 2) Kepala ikan zebra mungkin mengalami kelekukan
Model kejatuhan pemberat (Hentig et al. 2021)	Kecederaan tumpul (TBI ringan, sederhana dan teruk)	Pemberat yang berlainan berat dijatuhkan dari ketinggian yang berbeza melalui satu tiub ke atas kranium ikan zebra yang dilindungi oleh cakera keluli untuk menghasilkan kecederaan TBI ringan, sederhana dan berat.	1) Boleh dikategorikan kepada TBI ringan, sederhana dan teruk 2) Cakera keluli yang diletakkan di atas kepala ikan zebra dapat mengurangkan impak dan risiko kranium retak	Pemberat mungkin akan mencederakan bahagian ikan zebra yang lain
<i>Pulsed high intensity focused ultrasound (pHIFU)</i> (Cho et al. 2020)	TBI tertutup	Gelombang ultrasound secara tidak berterusan digunakan untuk menghasilkan kecederaan TBI tertutup pada telensefalon ikan zebra dewasa.	1) Tidak invasif 2) Tahap kecederaan boleh diubah mengikut intensiti ultrasound 3) Boleh mengkaji sawan selepas trauma dalam TBI teruk	Kompleks dan mahal

...sambungan

Penyinaran laser (Tikhonova et al. 2022)	TBI tertutup	Sinaran laser digunakan untuk menghasilkan kecederaan TBI tertutup secara tepat pada telensefalon ikan zebra dewasa.	1) Tidak invasif 2) Penghasilan kawasan kecederaan yang tepat 3) Tahap kecederaan boleh diubah mengikut intensiti laser	1) Memerlukan ikan zebra mutan dengan kulit yang lut sinar 2) Kompleks dan mahal
Suntikan asid quinolinik (QA) ke dalam telensefalon (Skaggs, Goldman & Parent 2014)	TBI sekunder	Asid quinolinik disuntik ke dalam telensefalon ikan zebra dewasa untuk menghasilkan eksitotoksiti neuron.	1) Menghasilkan inflamasi yang lebih banyak dan luas berbanding kecederaan mekanikal 2) Peningkatan proliferasi RGC	Hanya mewakili satu mekanisme dalam TBI sekunder iaitu eksitotoksiti QA

## 2.5 PRINSIP PENGURUSAN TBI PADA MASA KINI

Pengurusan TBI bermula sebaik sahaja pesakit dibawa ke klinik atau hospital yang terdekat. Di situ, pesakit TBI akan menjalani penilaian GCS dan neurologi di samping mendapatkan keterangan tentang mekanisme kecederaan. Ini adalah penting untuk menentukan tahap keterukan kecederaan dan sama ada pesakit itu memerlukan imbasan tomografi berkomputer (CT) otak. Secara amnya, GCS  $\geq 13$ : TBI ringan, GCS 9 -12: TBI sederhana dan GCS 3 - 8: TBI teruk (Nichols et al. 2025). Individu yang mengalami perubahan status mental, hilang kesedaran, amnesia, defisit neurologi fokal, muntah dan tanda patah tengkorak basal memerlukan imbasan CT otak (Sakkas et al. 2023). Ini adalah penting untuk mengenal pasti kehadiran keretakan tengkorak, pendarahan intrakranial dan pembengkakan otak.

Pesakit TBI ringan (konkusi) adalah tertumpu kepada rehat, pemantauan gejala peningkatan ICP dan pengurusan gejala selepas konkusi (Sergeyenko, Andrae & Segal 2025). Sementara itu, pengurusan TBI sederhana atau teruk adalah tertumpu kepada pencegahan kecederaan otak sekunder yang berpunca daripada hipoksia, hipotensi dan peningkatan ICP (Meyfroidt et al. 2022). Pesakit TBI sederhana atau teruk memerlukan terapi oksigen, kawalan gula, elektrolit dan tekanan darah yang rapi bagi mengekalkan perfusi serebrum yang mencukupi di samping pemberian agen antiepileptik untuk

mengelakkan daripada berlakunya sawan dan manitol untuk mengurangkan ICP (Meyfroidt et al. 2022). Intervensi pembedahan seperti kraniektomi dekompresif atau pengeluaran hematoma diperlukan sekiranya terdapat pendarahan yang ketara, peralihan garis tengah otak atau kemerosotan neurologi (Vitali et al. 2023).

Pengurusan jangka panjang memberi tumpuan kepada rehabilitasi dan pemulihan fungsi. Pendekatan multidisiplin yang melibatkan fisioterapi, terapi cara kerja, terapi pertuturan, serta sokongan neuropsikologi adalah penting untuk mengoptimalkan pesakit (Corrigan et al. 2025). Pesakit mungkin mengalami gangguan kognitif, tingkah laku atau fizikal yang memerlukan pelan rehabilitasi secara individu (Corrigan et al. 2025). Secara keseluruhan, pengurusan TBI moden menggabungkan rawatan akut yang menyelamatkan nyawa dengan strategi rehabilitasi menyeluruh untuk meningkatkan kualiti hidup pesakit. Pada masa hadapan, rawatan tambahan seperti pemberian agen antiinflamasi mungkin boleh membantu mengurangkan kecederaan neuron dan mempercepat proses pemulihan TBI.

## 2.6 HIDROKSITIRO SOL

HT merupakan sebatian fenol yang berasal daripada minyak zaitun. HT juga dikenali sebagai 3,4-dihidroksifeniletanol (DOPET). Selain diperoleh daripada makanan, HT juga boleh dihasilkan melalui metabolisme dopamin (Robles-Almazan et al. 2018).

Ketersediaan-bio oral (*oral bioavailability*) HT apabila diberikan dalam bentuk minyak zaitun ialah 99% manakala dalam bentuk larutan akueus ialah 75% (Tuck et al. 2001). Kepekatan maksimum HT dalam plasma memuncak 30 minit selepas diambil melalui oral dalam manusia (Bender, Strassmann & Golz 2023). Selepas diserap di dalam usus, HT akan menjalani proses metabolisme dalam hati, usus, dan seterusnya disingkirkan melalui air kencing (Bender, Strassmann & Golz 2023). Antara metabolit utama HT dalam plasma dan air kencing ialah asid homovanillik, HT-3-O-sulfat, dan asid 3,4-dihidroksifenilasetik (Bender, Strassmann & Golz 2023). Dalam satu kajian toksikologi yang menggunakan tikus, dos HT sebanyak 500 mg/kg/hari dilaporkan tiada tahap kesan buruk yang diperhatikan (*No Observed Adverse Effects Level*, NOAEL) (Auñon-Calles, Canut & Visioli 2013).

HT merupakan sebatian fenol yang mempunyai sifat kompleks yang dikenali sebagai paradoks oksidatif polifenol (Al Fazazi et al. 2018; Martini et al. 2018). Sifat ini membolehkan HT bertindak sebagai agen antioksidasi, antiinflamasi, antiapoptosis, atau proapoptosis bergantung kepada dos HT yang digunakan, haiwan atau sel kajian, jenis penyakit, dan persekitaran fisiologinya (Batarfi et al. 2024; Chen, Ai & Wei 2021). Rumusan kajian praklinikal yang menunjukkan kepelbagaian sifat dan mekanisme HT ditunjukkan dalam Jadual 2.4. HT berpotensi untuk dijadikan sebagai agen terapeutik untuk penyakit neurologi disebabkan oleh keupayaannya untuk melintasi BBB (Fan, Peng & Li 2023). HT dapat mempamerkan kesan neuroprotektif dalam pelbagai penyakit neurologi seperti penyakit Alzheimer, penyakit Parkinson, dan strok iskemia (Chen, Ai & Wei 2021). Rumusan mekanisme perlindungan neuron oleh HT untuk beberapa jenis penyakit neurologi ditunjukkan dalam Jadual 2.5.

Jadual 2.4 Kepelbagaian Sifat dan Mekanisme HT dalam Kajian Praklinikal

Sifat dan Mekanisme HT	Penyakit atau Kecederaan	Subjek	Rujukan
Antioksidasi - pengaktifan Akt dan ERK1/2 - peningkatan ekspresi Nrf2	Sitotoksiti akibat hidrogen peroksida	Sel endothelial vaskular	(Zrelli et al. 2011)
Antioksidasi - pengaktifan laluan Nrf2	Sitotoksiti akibat hidrogen peroksida	Sel PC12	(Peng et al. 2015)
Antiinflamasi - mengurangkan ekspresi P53 dan NF-kB	Kerosakan DNA akibat UVB	Sel HaCat	(Guo et al. 2010)
Antiinflamasi - mengurangkan sitokin proinflamasi (TNFA, IL-1B, dan IL-6)	Obesiti akibat diet tinggi lemak	Tikus C57BL/6J	(Liu et al. 2019)
Antiapoptosis - penurunan pengawalaturan gen proapoptosis BAX - peningkatan pengawalaturan gen antiapoptosis BCL2	Kolitis ulseratif	Tikus albino	(Elmaksoud et al. 2021)

...sambungan

Proapoptosis - peningkatan ekspresi gen proapoptosi BAX - penurunan ekspresi gen BCL2 - pengurangan isyarat Akt, NF-kB, dan STAT3	Kanser prostat	Sel kanser prostat LNCaP dan C4 $\square$ 2	(Zubair et al. 2017)
--	----------------	---	----------------------

---

Jadual 2.5 Mekanisme Perlindungan Neuron oleh HT Terhadap Penyakit Neurologi

Model Penyakit	Subjek	Mekanisme Perlindungan Neuron	Rujukan
Penyakit Alzheimer	Tikus Wistar yang diberikan steptozotocin	1) Meningkatkan daya ingatan ruangan 2) Memulihkan aras normal kuprum dan besi dalam otak	(Tabanez et al. 2023)
Penyakit Alzheimer	Amiloid insulin	Menghalang pembentukan kelompok amiloid	(Sirangelo et al. 2020)
Penyakit Parkinson	Tikus CD1 yang diberikan rotenone	1) Agen antioksidan dan antiinflamasi 2) Mengurangkan kehilangan neuron dopamin	(Siracusa et al. 2020)
Penyakit Parkinson	Sel-sel SH-SY5Y yang terdedah kepada kelompok alfa-sinuklein	Mengurangkan ketoksikan alfa-sinuklein	(Palazzi et al. 2020)
Strok Iskemia	Tikus C57BL/6JRj yang menjalani proses penyumbatan arteri serebrum tengah	1) Meningkatkan aliran darah serebrum 2) Meningkatkan ekspresi BDNF	(Calahorra et al. 2019)

## **BAB III**

### **BAHAN DAN KAEDAH KAJIAN**

#### **3.1 PENGENALAN**

Kajian ini telah diluluskan oleh Sekretariat Penyelidikan & Inovasi, Fakulti Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) dengan kod projek FF-2024-463 dan dijalankan mengikut tatacara yang ditetapkan oleh Jawatankuasa Etika Haiwan, UKM dengan nombor kelulusan FP/2024/TEOH SEONG/02-OCT/1458-SEPT.-2024-AUG.-2025.

#### **3.2 BAHAN**

##### **3.2.1 Haiwan Kajian**

Sebanyak 84 ekor ikan zebra (*Danio rerio*) dewasa yang berumur empat bulan daripada kedua-dua jantina telah diperolehi daripada pembekal tempatan. Ikan dipilih secara rawak daripada populasi tersebut dan jantina tidak ditentukan sebelum pengagihan ke dalam kumpulan. Ikan ditempatkan di dalam akuarium lutsinar berkapasiti 3.5 L dengan kepadatan < 5 ekor ikan seliter. Ikan-ikan tersebut diletakkan di dalam air yang bersuhu  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan diberikan lampu secara terkawal dengan nisbah 14:10 jam (siang:malam). Ikan zebra diberikan makanan ikan dewasa (Thera+A, New Life Spectrum, Florida, Amerika Syarikat) sebanyak dua kali sehari dan diberikan tempoh penyesuaian selama dua minggu sebelum kajian bermula.

##### **3.2.2 Bahan Kimia**

###### **a. Hidroksitirosol (HT)**

Sebanyak 25 mg HT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Amerika Syarikat) digunakan dalam penyelidikan ini dan disimpan dalam peti sejuk beku bersuhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**b. Bahan untuk Analisis Ekspresi Gen**

Reagen TRIzol (Invitrogen, Amerika Syarikat) digunakan untuk memisahkan asid deoksiribonukleik (DNA), asid ribonukleik (RNA) dan protein. Kit sintesis ProtoScript II *First Strand* cDNA (E6560L, New England BioLabs, Amerika Syarikat) digunakan untuk menghasilkan cDNA daripada RNA. Primer ke hadapan dan terbalik (Azenta Life Sciences, Amerika Syarikat) dan Luna Universal *Quantitative real-time polymerase chain reaction* (qPCR) *Master Mix* (M3003L, New England BioLabs) digunakan untuk analisis qPCR. Selain itu, larutan penimbal fosfat (PBS) 1x juga digunakan dalam kajian ini.

**c. Bahan untuk Kajian Histologi**

Sebatian Suhu Pemotongan Optimum (OCT) Tissue-Tek (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan), kit Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) (ab66110, Abcam, England) dan perwarna pendarfluor 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) (ab104139, Abcam, England). Selain itu, proteinase K, larutan paraformaldehid 4% dan larutan penimbal fosfat juga digunakan dalam kajian histologi.

**3.2.3 Alat Radas****a. Akuarium dan Peralatan untuk Mengendalikan Ikan Zebra**

Akuarium akrilik lutsinar bersaiz 3.5 L yang diisi dengan air yang dinyahklorinan digunakan untuk menempatkan ikan-ikan zebra dalam kajian ini. Jaring ikan akuarium digunakan untuk mengambil ikan zebra.

**b. Mikroskop untuk Induksi TBI dan Suntikan Intraperitoneal ke dalam Ikan Zebra**

Stereomikroskop Stemi 305 Trino (ZEISS, Jerman) digunakan dalam proses induksi TBI dan suntikan ke dalam rongga intraperitoneal ikan zebra.

**c. Analisis Ekspresi Gen**

Mesin Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Jerman) digunakan untuk mengempar campuran larutan dalam proses pengekstrakan RNA. Pengadun vorteks V-1 plus (Biosan, Latvia)

digunakan untuk mencampurkan larutan. Kepekatan RNA disukat dengan menggunakan mesin NanoDrop TM 1000 spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific, Amerika Syarikat). Mesin CFX 96 *Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Amerika Syarikat) digunakan untuk proses analisis qPCR.

#### d. **Kajian Histologi**

Slaid mikroskop imunohistokimia (IHC) (Muto Pure Chemical, Japan), mesin cryostat HM525 NX (Thermo Scientific, Amerika Syarikat) dan mikroskop pendarfluor BX53FL (Olympus, Japan) digunakan dalam kajian histologi.

#### e. **Analisis Lokomotor Ikan Zebra**

Kamera video dan tripod digunakan untuk mengambil video pergerakan ikan zebra dan kemudiannya dianalisis dengan menggunakan perisian ToxTrac 2025 versi 1.1 (Rodriguez et al. 2018).

### 3.3 **KAEDAH**

#### 3.3.1 **Reka Bentuk Kajian**

Kajian ini dijalankan dalam tiga peringkat yang tertumpu kepada analisis kesan rawatan HT terhadap ekspresi gen inflamasi, tahap kebimbangan ikan zebra dan kematian sel dalam otak ikan zebra selepas TBI. Peringkat pertama kajian ialah analisis ekspresi gen yang melibatkan gen proinflamasi: interleukin-1 family member A (*il1fma*) dan faktor nekrosis tumor alfa (*tnfa*); gen antiinflamasi: interleukin-10 (*il10*) dan gen proliferasi sel: antigen nukleus sel proliferasi (*pcna*). Manakala gen rujukan yang digunakan ialah beta-aktin (*actb1*) kerana ekspresinya stabil dalam kebanyakan jenis tisu. Jujukan primer khusus gen ditunjukkan dalam Jadual 3.1.

Dalam kajian ini, kumpulan plasebo ialah kumpulan model TBI ikan zebra yang menerima suntikan intraperitoneal bahan tidak aktif dan bertindak sebagai garis dasar untuk perbandingan dengan rawatan HT. Kumpulan plasebo ialah kumpulan kawalan kerana fokus utama dalam kajian ini adalah untuk membandingkan kesan rawatan HT dengan plasebo dalam keadaan patologi yang sama dan mengakui ketiadaan kumpulan

kawalan normal boleh menghalang kesimpulan dibuat bahawa rawatan HT dapat memulihkan subjek ke tahap normal. Larutan penimbal fosfat (PBS) digunakan sebagai bahan tidak aktif dalam kumpulan plasebo kerana sifatnya yang tidak toksik, isotonik dan mempunyai pH yang stabil untuk memastikan sel-sel kekal hidup (Hassan et al. 2024). Selain itu, larutan PBS juga digunakan sebagai pelarut HT atau kawalan vehikel (*vehicle control*) dalam kajian ini disebabkan ion fosfat seperti dinatrium hidrogen fosfat dan kalium dihidrogen fosfat memudahkan proses pelarutan serta mengekalkan kestabilan protein (Pavani et al. 2021).

Dalam kajian analisis ekspresi gen, sebanyak 48 ekor ikan zebra dibahagikan kepada 4 kumpulan dan butiran setiap kumpulan ditunjukkan dalam Jadual 3.2. Dos HT sebanyak 10, 50 dan 100 mg/kg adalah berdasarkan kepada kajian Kotronoulas et al. (2013) yang menggunakan tikus untuk mengkaji metabolisme HT. Dos tersebut adalah selamat untuk digunakan berdasarkan kepada satu kajian toksikologi yang menggunakan tikus melaporkan dos HT pada 500 mg/kg/hari menunjukkan tiada tahap kesan buruk yang diperhatikan (*No Observed Adverse Effects Level*, NOAEL) (Auñon-Calles, Canut & Visioli 2013). Carta aliran kajian analisis ekspresi gen ditunjukkan dalam Rajah 3.1.

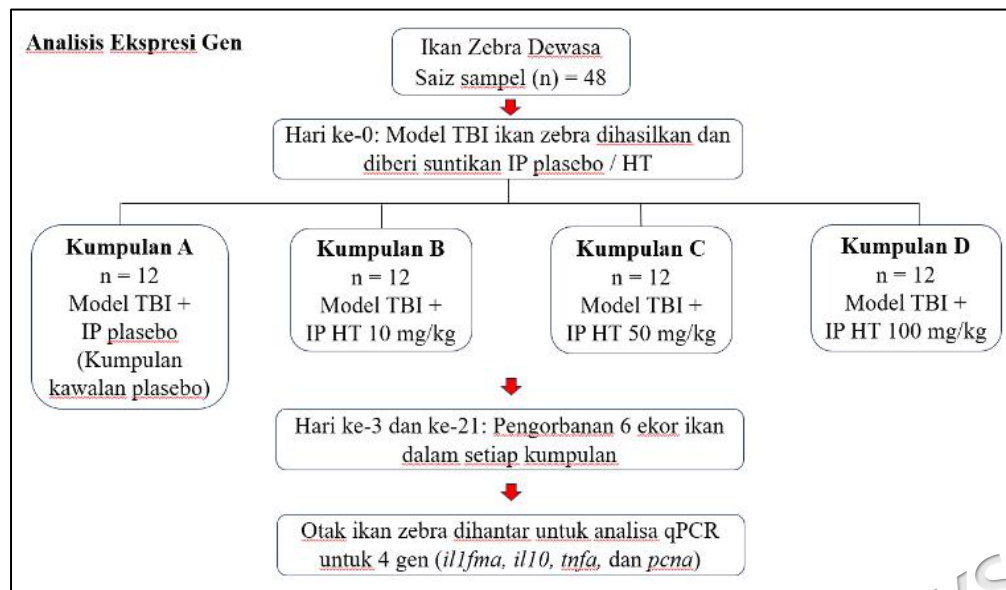
Pada hari ketiga dan hari ke-21 selepas TBI, enam ekor ikan zebra diambil dari setiap kumpulan untuk dikorbankan. Analisis ekspresi gen dilakukan pada hari ke-3 dan ke-21 selepas TBI disebabkan proses neuroinflamasi memuncak pada hari ke-3 selepas TBI manakala proses neuroregenerasi memuncak pada hari ke-21 selepas TBI (Maheras et al. 2018).

Jadual 3.1 Jujukan Primer Khusus Gen

Gen	Nombor Akses	□ □ □ □ □ an □ □ □ i □ e □ □ □ □ ' □ □ □ ' □
<i>actb1</i>	NM_131031.1	F: GCCTTCCTTCCTCCTTCCTTCCTGGGTATGG R: ATATGTCCACGTC GCACTTCAT
<i>il1fma</i>	NM_001290418.1	F: AGCACCATCACCATGTCAGCACCAAT R: GGAACACCTAACACCTGGATTGTCCACT
<i>il10</i>	NM_001020785.2	F: AGCACTCCACAACCCCAATC R: GGCAAGAAAAGTACCTCTTGCAAT
<i>tnfa</i>	NM_212859.2	F: CTCCATAACTCCATAAGACCCAGGGCAA R: TGGCACAGCCTTGAA GTGAAA
<i>pna</i>	NM_131404.2	F: AGGAGGATGAAGCGGTAACAA R: GTCTTGGACAGAGGAGTGGC

Jadual 3.2 Kumpulan Ikan Zebra untuk Analisis Ekspresi Gen

Kumpulan	Butiran
A	Model TBI + IP Plasebo
B	Model TBI + IP HT 10 mg/kg
C	Model TBI + IP HT 50 mg/kg
D	Model TBI + IP HT 100 mg/kg

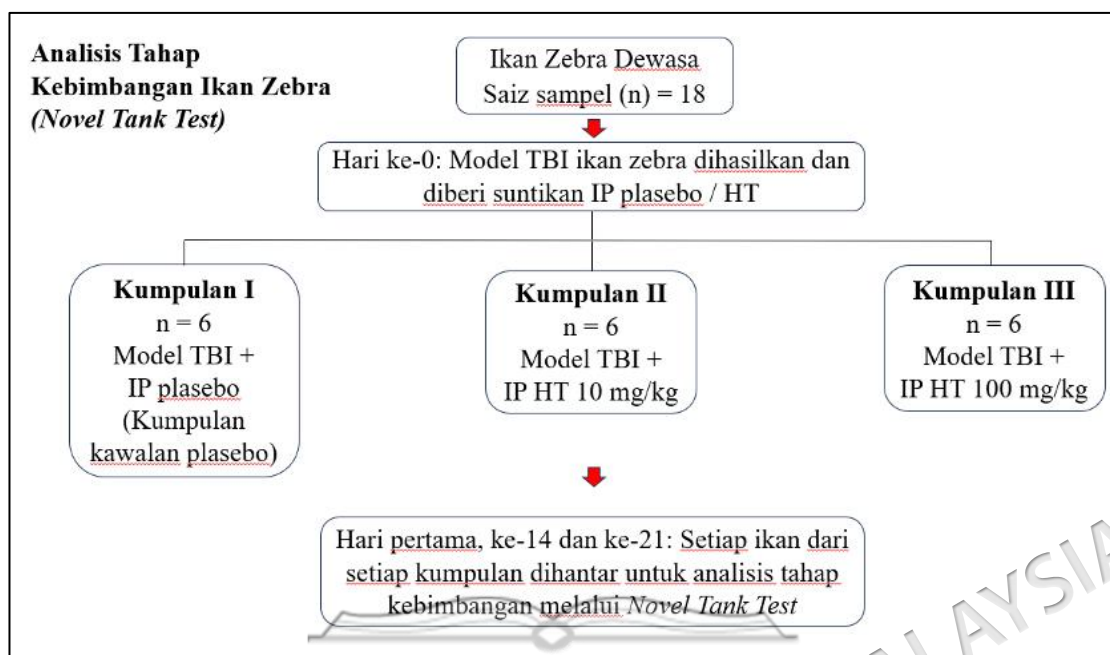


Rajah 3.1 Carta Aliran Analisis Ekspresi Gen

Selepas analisis ekspresi gen (peringkat pertama), dua dos HT (10 mg/kg dan 100 mg/kg) menunjukkan keputusan positif. Oleh itu, kedua-dua dos ini dipilih untuk diteruskan ke peringkat kedua dan ketiga kajian. Peringkat kedua kajian ialah analisis tahap keseimbangan ikan zebra dengan menggunakan *Novel Tank Test* yang digunakan secara meluas (Shinkai et al. 2025). Sebanyak 18 ekor ikan zebra dewasa digunakan untuk menghasilkan model TBI dan seterusnya dibahagikan kepada tiga kumpulan seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 3.3. Setiap kumpulan ikan zebra dihantar untuk analisis tahap keseimbangan pada hari pertama, ke-14 dan ke-21 selepas TBI untuk mengkaji tingkah laku ikan zebra pada fasa akut, pertengahan dan jangka panjang (Chaoul et al. 2022). Carta aliran peringkat kedua kajian ditunjukkan dalam Rajah 3.2.

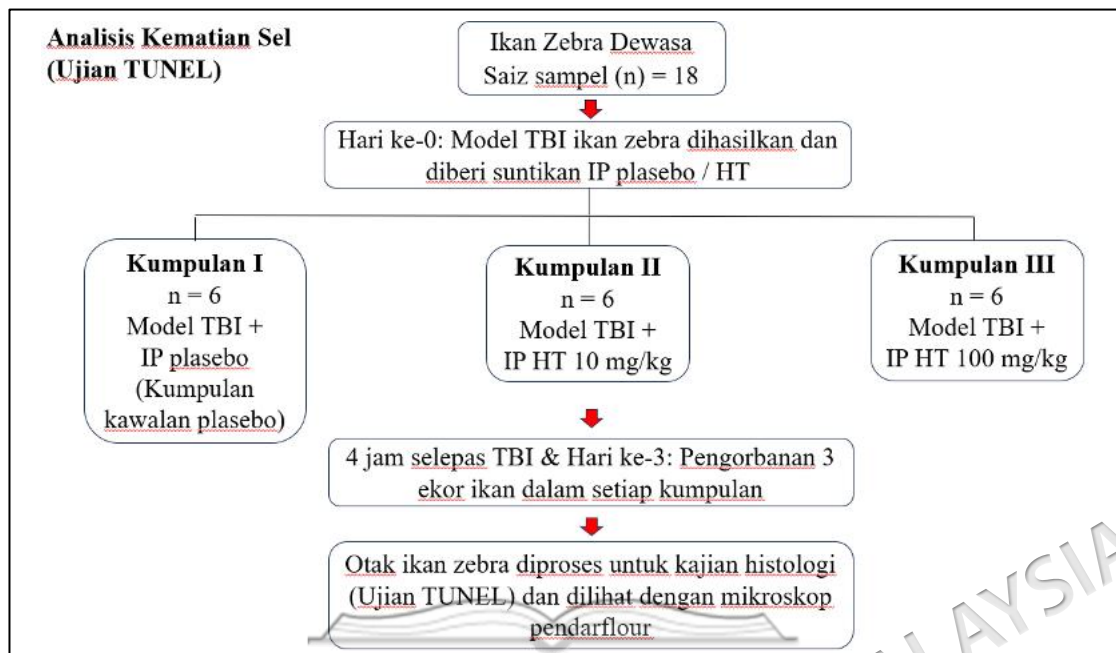
Jadual 3.3 Kumpulan Ikan Zebra untuk Analisis Tahap Keseimbangan dan Ujian TUNEL

Kumpulan	Butiran
I	Model TBI + IP Plasebo
II	Model TBI + IP HT 10 mg/kg
III	Model TBI + IP HT 100 mg/kg



Rajah 3.2 Carta Aliran Analisis Tahap Kebimbangan Ikan Zebra

Peringkat ketiga kajian ialah analisis kematian sel dengan menggunakan ujian TUNEL. Sebanyak 18 ekor ikan zebra dewasa digunakan untuk menghasilkan model TBI dan seterusnya diberi suntikan IP plasebo ataupun HT sebanyak 10 mg/kg dan 100 mg/kg. Ikan zebra tersebut dibahagikan kepada tiga kumpulan yang sama seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 3.3. Setiap kumpulan mengandungi 6 ekor ikan dan 3 ekor ikan dikorbankan pada waktu 4 jam dan hari ke-3 selepas TBI. Kajian ini telah menggunakan waktu 4 jam selepas TBI dan hari ke-3 selepas TBI sebagai waktu untuk analisis kematian sel kerana kematian sel selepas kecederaan mekanikal boleh dikesan seawal 4 - 6 jam selepas TBI (Ghaddar et al. 2021). Selain itu, bilangan sel apoptosis memuncak pada hari ke-3 selepas TBI (He et al. 2023). Ujian TUNEL apabila dilakukan bersama dengan DAPI boleh memberi gambaran secara kasar struktur telensefalon ikan zebra dan juga kematian sel. Mikroskop pendarflour digunakan untuk melihat slaid ujian TUNEL. Carta aliran analisis kematian sel dengan menggunakan ujian TUNEL ditunjukkan dalam Rajah 3.3.



Rajah 3.3 Carta Aliran Analisis Kematian Sel (Ujian TUNEL)

### 3.3.2 Pengiraan Saiz Sampel

Dalam kajian ini, persamaan sumber (*resource equation*) digunakan untuk mengira saiz sampel kerana tiada kajian sebelum ini yang menggunakan HT dalam model TBI ikan zebra dan juga kaedah analisis statistik yang digunakan ialah analisis varians (ANOVA) (Arifin & Zahiruddin 2017). Persamaan sumber adalah berasaskan julat *degree of freedom* (DF) yang boleh diterima dalam analisis ANOVA iaitu antara 10 hingga 20 (Festing & Altman 2002).

Untuk kajian pertama iaitu analisis ekspresi gen, terdapat empat kumpulan yang terlibat dalam satu ujian qPCR. Oleh itu, formula yang digunakan untuk mengira saiz sampel mengikut Arifin & Zahiruddin (2017) ialah:

$$n = \frac{DF}{k} + 1 \quad \square (3.2)$$

$n$  = bilangan subjek setiap kumpulan,  $k$  = bilangan kumpulan, DF = *degree of freedom*

Julat DF ialah antara 10 hingga 20. Oleh itu,

$$\text{Minimum } n = \frac{10}{4} + 1 = 3.5 \quad \square \text{ (3.3)}$$

$$\text{Maksimum } n = \frac{20}{4} + 1 = 6 \quad \square \text{ (3.4)}$$

Bilangan maksimum saiz sampel digunakan untuk ujian qPCR untuk meningkatkan kuasa statistik dan mengurangkan ralat dalam eksperimen. Disebabkan analisis qPCR dilakukan dua kali pada hari ke-3 dan hari ke-21 selepas TBI, maka bilangan sampel ikan setiap kumpulan yang dikorbankan perlu didarab dengan dua. Oleh itu, jumlah saiz sampel untuk analisis ekspresi gen ialah  $6 \times 2 \times 4 = 48$ .

Untuk kajian kedua iaitu analisis aktiviti lokomotor ikan zebra, terdapat tiga kumpulan yang digunakan dan tiada ikan zebra yang dikorbankan untuk ujian ini. Oleh itu, kiraan saiz sampel adalah seperti berikut:

$$\text{Minimum } n = \frac{10}{3} + 1 = 4.3 \quad \square \text{ (3.5)}$$

$$\text{Maksimum } n = \frac{20}{3} + 1 = 7.7 \quad \square \text{ (3.6)}$$

Daripada julat bilangan sampel yang dikira untuk setiap kumpulan iaitu  $4 \square 8$ , sebanyak enam ekor ikan zebra digunakan untuk mewakili tiga kumpulan untuk analisis aktiviti lokomotor. Oleh itu, jumlah saiz sampel untuk kajian analisis lokomotor ialah  $6 \times 3 = 18$ .

Untuk kajian yang ketiga iaitu analisis kematian sel menggunakan ujian TUNEL, sebanyak tiga kumpulan ikan zebra yang digunakan dan ikan zebra dikorbankan pada waktu 4 jam dan hari ke-3 selepas TBI. Disebabkan ujian TUNEL ini merupakan salah satu kajian histologi, hanya tiga ekor ikan zebra diperlukan untuk

setiap kumpulan. Oleh itu, jumlah saiz sampel untuk ujian TUNEL ialah  $3 \times 3 \times 2 = 18$ . Maka, jumlah keseluruhan saiz sampel untuk ketiga-tiga kajian ini ialah  $N = 48 + 18 + 18 = 84$ .

### 3.3.3 Proses Pembedaan Ikan Zebra

Ikan zebra diberikan ubat bius melalui kaedah rendaman di dalam larutan benzocaine 0.0025% selama 1-2 minit sehingga tiada pergerakan operkulum. Larutan benzocaine digunakan untuk pembiusan ikan zebra kerana larutan tersebut bertindak cepat, efektif dan tidak toksik kepada ikan zebra pada dos rendah (Wynd et al. 2017). Setelah ikan zebra berada dalam keadaan bius, induksi TBI dilakukan melalui kecederaan tikaman ke dalam telensefalon, diikuti dengan suntikan intraperitoneal sama ada plasebo atau HT ke dalam rongga intraperitoneal. Kedua-dua proses ini dilakukan secara serentak dan rawatan HT hanya diberikan satu dos sahaja untuk mengurangkan kesan ubat bius dan juga kadar kematian ikan zebra.

### 3.3.4 Kecederaan Tikaman ke dalam Telensefalon Ikan Zebra

Kecederaan tikaman ke dalam telensefalon ikan zebra adalah berdasarkan kepada model Schmidt et al. (2014) yang mudah, cepat, kos efektif dan tidak memerlukan peralatan yang kompleks. Prosedur ini dilakukan dengan menggunakan jarum 30G dan dimasukkan secara tegak ke dalam telensefalon kiri sedalam 2 mm menembusi tengkoraknya dengan menggunakan posisi matanya dan jahitan tengkorak sebagai panduan seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 3.4.



Rajah 3.4 Kecederaan tikaman ke dalam telensefalon kiri ikan zebra. Anak panah menunjukkan lokasi kecederaan tikaman ke dalam telensefalon kiri ikan zebra

### 3.3.5 Suntikan Intraperitoneal ke dalam Rongga Intraperitoneal Ikan Zebra

Suntikan intraperitoneal ke dalam rongga intraperitoneal ikan zebra adalah berdasarkan kepada model Kinkel et al. (2010). Selepas model TBI ikan zebra dihasilkan, ikan zebra diterbalikkan di dalam alur span yang basah dengan abdomennya menghala ke atas. Ikan zebra perlu berpuasa selama 24 jam sebelum prosedur ini dijalankan. Dengan menggunakan jarum 30 G dan picagari Hamilton 10  $\mu$ L yang telah diisikan dengan dos HT atau plasebo yang dikehendaki, jarum tersebut dihalakan 45° secara kranial dan dimasukkan secara berhati-hati sedalam 2 mm melalui garis tengah pangkal sirip pelvis ikan zebra ke dalam rongga intraperitonealnya. Bahan dengan dos yang dikehendaki disuntik secara perlahan-lahan ke dalam rongga intraperitoneal ikan zebra dan kemudian jarum itu dikeluarkan.

### 3.3.6 Pengorbanan Ikan Zebra

Ikan zebra dikorbankan menggunakan kaedah penyejukan pantas dengan merendam ikan tersebut di dalam air yang diisi ais bersuhu 0  $\square$  4 °C selama sekurang-kurangnya 20 minit untuk memastikan ikan tersebut mati. Apabila tiada pergerakan operkulum diperhatikan, ikan zebra dikeluarkan dari rendaman air ais untuk dibedah. Pembedahan

kecil dilakukan ke atas kepala ikan zebra dengan mengeluarkan sisik ikan dan tengkoraknya. Kemudian, otak ikan zebra dikeluarkan secara berhati-hati untuk kajian analisis ekspresi gen.

### 3.3.7 Analisis Ekspresi Gen Menggunakan qPCR

Setelah ikan zebra dikorbankan, setiap otak ikan zebra dikeluarkan dan diproses untuk mengekstrakkan RNA. Kemudian, RNA ditukar kepada cDNA melalui proses transkripsi terbalik. qPCR dijalankan bagi lima gen sasaran iaitu *illfma*, *tnfa*, *il10*, *pcna* dan gen rujukan *actb1*. Analisis qPCR dilakukan dengan mengambil nilai Cq setiap sampel otak ikan zebra. Selepas itu, nisbah ekspresi gen dikira dengan menggunakan formula:

$$\text{Nisbah Ekspresi Gen} = 2^{-\Delta\Delta Cq} \quad \square (3.1)$$

Kajian analisis ekspresi gen dijalankan mengikut tiga fasa iaitu fasa pengekstrakan RNA, fasa sintesis cDNA dan fasa campuran gen khusus primer untuk analisis qPCR. Langkah-langkah untuk setiap fasa adalah seperti berikut:

#### a. Pengekstrakan RNA

##### i. Homogenisasi

Reagen TRIzol sebanyak 400  $\mu\text{L}$  diletakkan di dalam tiub emparan dengan menggunakan mikropipet. Sampel otak ikan zebra dihomogenkan di dalam reagen TRIzol sebaik sahaja dikeluarkan daripada kepalanya. Seterusnya, sampel ini boleh disimpan di dalam peti ais bersuhu  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Apabila diperlukan, sampel yang dihomogenkan ini diletakkan dalam suhu bilik selama 5 minit sebelum digunakan.

##### ii. Pemisahan Fasa

Kloroform sebanyak 80  $\mu\text{L}$  ditambah ke dalam sampel yang dihomogenkan itu dengan menggunakan mikropipet. Kemudian, campuran itu digoncang dengan tangan selama 15 s dan diletakkan dalam suhu bilik selama 3 minit. Seterusnya, campuran itu

diemparkan pada  $12\,000 \times g$  pada suhu  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 15 minit. Selepas itu, fasa akueus atas yang tidak berwarna dipindahkan ke dalam tiub emparan yang baru. Langkah ini harus diberi perhatian supaya lapisan tengah berwarna putih yang mengandungi protein dan DNA tidak diambil.

### iii. Presipitasi RNA

Fasa akueus yang tidak berwarna di dalam tiub emparan baru dicampurkan dengan isopropil alkohol sebanyak  $180\text{ }\mu\text{L}$  dan diputar sehingga sehati dengan menggunakan pegadun vorteks. Campuran tersebut dibiarkan dalam suhu bilik selama 10 minit. Selepas itu, campuran itu diemparkan pada  $12\,000 \times g$  pada suhu  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 15 minit. Selepas proses emparan, RNA akan terbentuk pada sisi tepi sebelah atas tiub emparan. Cecair supernatan dikeluarkan dari tiub emparan dengan menggunakan mikropipet. Kemudian, RNA dibilas dengan  $500\text{ }\mu\text{L}$  etanol 75% dan diputar sehingga sehati dengan pegadun vorteks. Seterusnya, campuran itu diemparkan pada  $12\,000 \times g$  pada suhu  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 5 minit. Cecair supernatan dikeluarkan dengan mikropipet dan dibiarkan kering selama 5 minit. Akhir sekali, RNA yang terbentuk dilarutkan dengan  $20\text{ }\mu\text{L}$  air yang dirawat dengan dietilpirokarbonat (DEPC).

### iv. Kuantifikasi RNA

Kepekatan RNA disukat dengan menggunakan mesin NanoDrop TM 1000 spektrofotometer. Air DEPC sebanyak  $1\text{ }\mu\text{L}$  diletakkan di atas pembaca sampel mesin tersebut. Seterusnya, tetapan komputer ditukar kepada RNA and butang blank ditekan. Pembaca sampel mesin NanoDrop dilap dengan Kimwipe dan kemudian sampel RNA sebanyak  $1\text{ }\mu\text{L}$  diletakkan di atas pembaca tersebut. Bacaan kepekatan RNA dalam  $\text{ng}/\mu\text{L}$  direkodkan berserta dengan bacaan nisbah A260/A280 dan A260/A230. Proses ini diulang dengan sampel RNA yang lain.

### b. Sintesis cDNA

*ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit* digunakan untuk menghasilkan cDNA daripada sampel RNA melalui proses transkripsi terbalik. RNA sebanyak 500 ng dicampurkan dengan  $2\text{ }\mu\text{L}$  *Random Primer Mix* ( $60\text{ }\mu\text{M}$ ),  $10\text{ }\mu\text{L}$  *ProtoScript II Reaction Mix* (2X),  $2\text{ }\mu\text{L}$  *ProtoScript II Enzyme Mix* (10X) dan air DEPC ke dalam tiub emparan

mikro untuk menjadikan jumlah isipadu sebanyak 20  $\mu\text{L}$ . Isipadu setiap komponen bahan kimia untuk proses transkripsi terbalik dirumuskan dalam Jadual 3.4. Seterusnya, campuran larutan di dalam tiub emparan mikro diletakkan ke dalam mesin *Bio-Rad CFX 96 Real-Time PCR Detection System* untuk menjalani proses *incubation* pada suhu 25  $^{\circ}\text{C}$  selama 5 minit dan kemudian pada suhu 42  $^{\circ}\text{C}$  selama sejam. Akhirnya, proses penyahaktifan enzim berlaku pada suhu 80  $^{\circ}\text{C}$  selama 5 minit untuk menghasilkan cDNA.

Jadual 3.4 Isipadu Setiap Komponen untuk Proses Transkripsi Terbalik

Komponen	Isipadu
RNA	500 ng
<i>Random Primer Mix</i> (60 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{L}$
<i>ProtoScript II Reaction Mix</i> (2X)	10 $\mu\text{L}$
<i>ProtoScript II Enzyme Mix</i> (10X)	2 $\mu\text{L}$
Air DEPC	ditambah untuk menjadikan jumlah isipadu sebanyak 20 $\mu\text{L}$

**c. Proses Campuran Primer dan Analisis qPCR**

*Luna Universal qPCR Master Mix* digunakan untuk proses tafsiran qPCR. Pertamanya, 1  $\mu\text{L}$  cDNA dicampurkan dengan 10  $\mu\text{L}$  *Luna Universal qPCR Mix*, 0.5  $\mu\text{L}$  *forward primer* (10  $\mu\text{M}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  *reverse primer* (10  $\mu\text{M}$ ) dan air DEPC ke dalam plat PCR untuk menghasilkan jumlah isipadu larutan sebanyak 20  $\mu\text{L}$ . Isipadu setiap komponen untuk proses campuran primer ditunjukkan dalam Jadual 3.5.

Jadual 3.5 Isipadu Setiap Komponen untuk Proses Campuran Primer

Komponen	Isipadu
<i>Luna Universal qPCR Mix</i>	10 $\mu\text{L}$
<i>Forward primer</i> (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
<i>Reverse primer</i> (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
cDNA	1 $\mu\text{L}$
Air DEPC	ditambah untuk menjadikan jumlah isipadu sebanyak 20 $\mu\text{L}$

Proses ini diulangi dengan sampel cDNA yang lain untuk ruangan plat PCR yang berikutnya. Satu baris plat PCR dikhaskan untuk *Non-Template Control* (NTC) yang diisi dengan kesemua larutan di atas kecuali cDNA. Plat PCR yang mengandungi kesemua campuran larutan dipastikan tiada gelembung udara di dalamnya yang akan mempengaruhi keputusan qPCR. Kemudian, bahagian atas plat PCR tersebut ditutup dengan filem pendedap haba.

Seterusnya, plat PCR tersebut diletakkan ke dalam mesin *Bio-Rad CFX 96 Real-Time PCR Detection System* untuk menjalani proses tafsiran qPCR yang akan melalui beberapa peringkat. Peringkat pertama, plat PCR tersebut melalui proses denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 60 saat untuk satu kitaran. Kemudiannya, plat tersebut melalui proses denaturasi pada suhu 95 °C selama 15 saat dan proses sambungan pada suhu 60 °C selama 30 saat berserta dengan bacaan plat untuk 40 kitaran. Akhirnya, plat tersebut melalui proses *melt curve* pada suhu 60 – 95 °C untuk satu kitaran. Nilai Cq untuk setiap sampel cDNA dan setiap gen sasaran direkodkan.

### **3.3.8 Analisis Tahap Kebimbangan Ikan Zebra Menggunakan Novel Tank Test**

Sebuah akuarium lutsinar diisi dengan 2.5 L air yang telah dinyahklorin. Seekor ikan zebra dipindahkan dari akuarium asal ke dalam akuarium baru itu dan ikan tersebut dibiarkan selama lima minit untuk menyesuaikan diri. Kemudian, corak renangan ikan zebra tersebut dirakam dengan kamera web selama 5 minit dan diletakkan pada jarak 20 cm dari akuarium tersebut. Selepas itu, video yang dirakam dianalisa dengan menggunakan perisian ToxTrac 2025 versi 1.1 (Rodriguez et al. 2018).

### **3.3.9 Analisis Kematian Sel Menggunakan Ujian TUNEL**

Kajian histologi untuk ujian TUNEL yang melibatkan tisu otak ikan zebra perlu melibatkan beberapa proses iaitu penetapan (*fixation*), perlindungan krio (*cryoprotection*), pembenaman (*embedding*), pembekuan (*freezing*), pembahagian (*sectioning*), pewarnaan (*staining*), dan pelekapan (*mounting*). Slaid kemudian dianalisis dengan menggunakan mikroskop pendarfluor.

**a. Proses Penetapan**

Larutan paraformaldehid (PFA) 4% dalam nisbah 1:1 disediakan dengan mencampurkan 1 mL larutan PFA 8% dengan 1 mL larutan 2N.PB di dalam tiub emparan 2 mL. Seterusnya, sampel otak ikan zebra yang telah dikorbankan diletakkan di dalam larutan PFA 4% yang telah disediakan selama 6 jam pada suhu 4 °C.

**b. Proses Perlindungan Krio**

Selepas proses penetapan, sampel otak ikan zebra dikeluarkan dari larutan PFA 4% dan dikeringkan. Kemudian, larutan sukrosa yang bertindak sebagai agen perlindungan krio disediakan dengan mencampurkan 10 g serbuk sukrosa, 25 mL larutan 2N.PB, dan selebihnya air tapisan ultra untuk menghasilkan larutan sebanyak 50 mL. Selepas itu, otak ikan zebra diletakkan di dalam larutan sukrosa pada suhu 4 °C dan dibiarkan untuk tempoh semalaman sehingga sampel otak ikan zebra itu tenggelam di dalam larutan.

**c. Proses Pembedaan dan Pembekuan**

Selepas proses perlindungan krio, sampel otak ikan zebra dikeluarkan dari larutan sukrosa dan dikeringkan. Sampel otak ikan zebra kemudian diletakkan di dalam sebatian OCT yang diisi di dalam acuan kecil menggunakan kertas aluminium yang berbentuk segi empat tepat. Bahagian depan otak ikan zebra dilabel pada acuan itu. Sampel otak ikan zebra di dalam sebatian OCT disimpan di dalam peti ais bersuhu -80 °C sekurang-kurangnya untuk dua hari.

**d. Proses Pembahagian**

Mesin cryostat Thermo Scientific HM525 NX digunakan untuk memotong telencephalon otak ikan zebra kepada ketebalan 14 µm pada suhu -20 °C. Bahagian tisu otak ikan zebra tersebut kemudian diletakkan di atas permukaan slaid IHC.

**e. Proses Pewarnaan dan Pelekapan**

Slaid yang mengandungi bahagian tisu beku segar diletakkan di dalam balang Coplin berisi larutan PFA 4% selama 15 minit pada suhu bilik. Slaid itu kemudian direndam di dalam balang Coplin berisi larutan PBS selama 5 minit pada suhu bilik. Selepas itu, dua

titis larutan proteinase K sedia guna dititiskan sehingga menutupi bahagian atas permukaan setiap bahagian tisu otak ikan zebra dan dibiarkan selama tiga minit. Seterusnya, slaid tersebut direndam secara bergilir-gilir di dalam larutan PBS, larutan PFA 4% dan kemudiannya larutan PBS selama lima minit untuk setiap larutan di dalam balang Coplin pada suhu bilik.

Selepas itu, bahagian tisu otak ikan zebra ditutupi dengan 100  $\mu$ L larutan penimbal dan kemudian slip penutup plastik diletakkan di atas tisu otak ikan zebra selama lima minit untuk menyebarkan larutan itu secara rata. Seterusnya, larutan pelabelan DNA iaitu Bromodeoksiuridin (BrdU) merah sebanyak 50  $\mu$ L diletakkan di atas tisu otak dan ditutupi dengan slip plastik. Slaid itu diletakkan dalam tempat gelap dan lembap pada suhu 37 °C selama sejam. Kemudian, slaid itu direndam di dalam larutan PBS selama lima minit. Larutan antibodi anti-BrdU sebanyak 100  $\mu$ L diletakkan di atas tisu otak ikan zebra, ditutup dengan slip plastik dan dibiarkan dalam tempat gelap selama 30 minit pada suhu bilik. Kemudian, perwarna DAPI sebanyak 100  $\mu$ L digunakan untuk mewarnakan nukleus sel. Akhir sekali, slaid tersebut ditutup dan dilekat dengan penutup kaca.

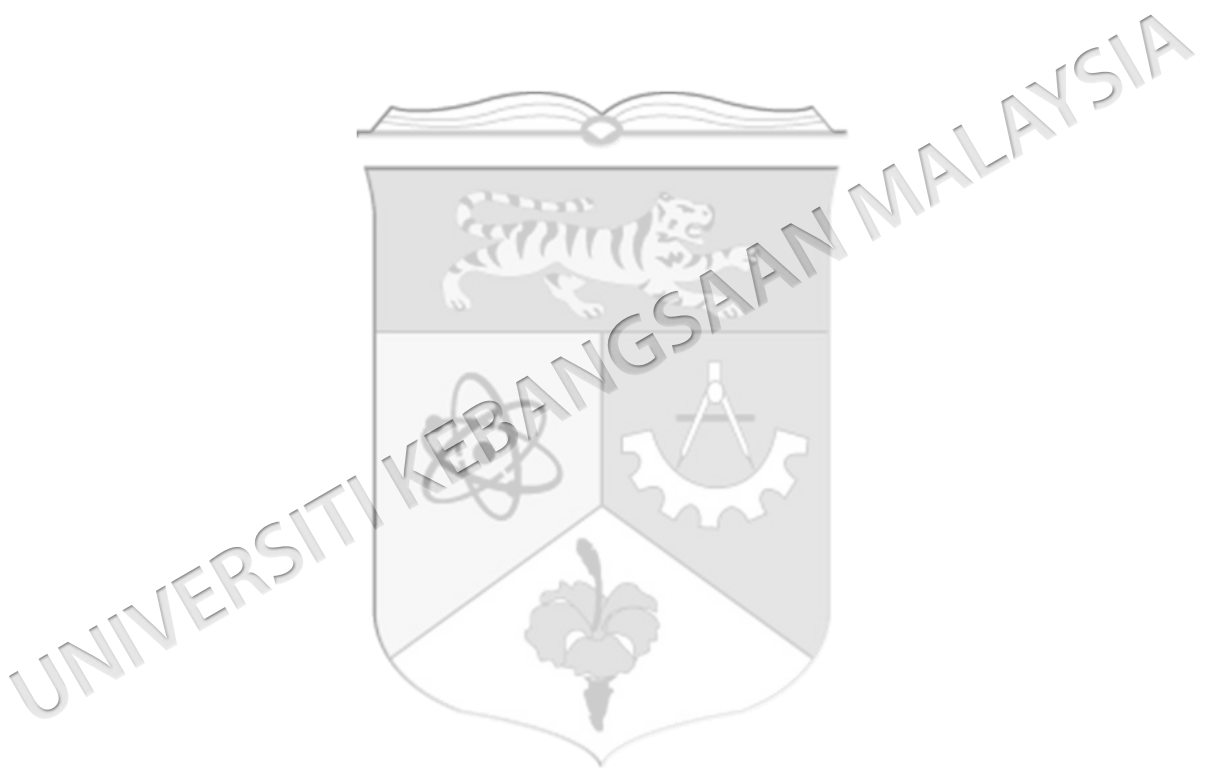
#### **f. Analisis Slaid Dengan Menggunakan Mikroskop Pendarfluor**

Slaid yang telah siap diwarnakan dianalisis dengan menggunakan mikroskop pendarfluor. Set penapis mikroskop diselaraskan mengikut panjang gelombang warna cahaya iaitu Ex/Em = 488/576 nm untuk TUNEL (merah) dan Ex/Em = 360/460 nm untuk DAPI (biru). Sel apoptosis yang mengandungi serpihan DNA diwarnakan merah oleh TUNEL manakala nukleus sel yang mengandungi sama ada DNA utuh ataupun serpihan diwarnakan biru oleh DAPI.

#### **3.3.10 Analisis Statistik**

Semua data yang diperolehi dianalisis dan direkodkan sebagai min  $\pm$  ralat piawai bagi min (SEM). Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan perisian Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) IBM versi 27. Analisis kenormalan data (*normality analysis*) dilakukan terlebih dahulu untuk menentukan data yang diperolehi adalah dalam taburan normal dengan melakukan perbandingan antara min dan median

(min □ □ □ e □. Selain itu, pemeriksaan secara visual histogram juga boleh menentukan sama ada data tersebut berada dalam taburan normal. Selepas itu, perbandingan data antara kumpulan ikan zebra pada hari yang sama dalam analisis ekspresi gen dan perbandingan tiga hari berbeza dalam analisis tahap keseimbangan ikan zebra dilakukan dengan Analisis Varians (ANOVA) diikuti dengan ujian Tukey post hoc. Manakala, perbandingan data antara dua hari yang berbeza dalam analisis ekspresi gen dilakukan dengan ujian T bebas. Nilai  $p < 0.05$  dianggap sebagai signifikan.



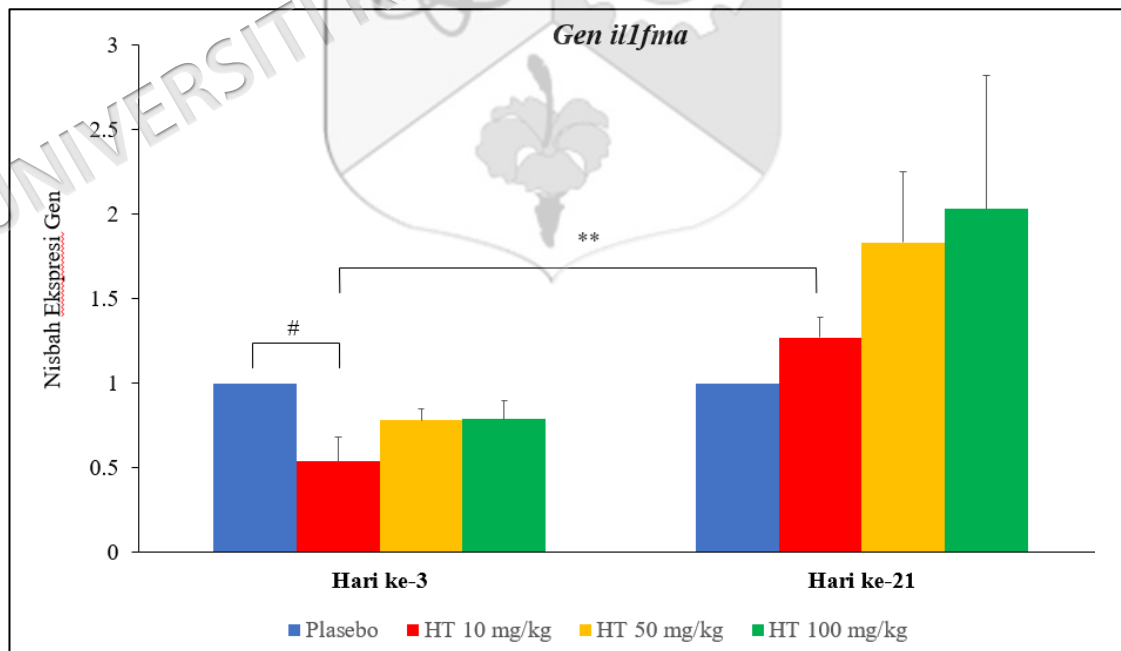
## BAB IV

### KEPUTUSAN KAJIAN

#### 4.1 ANALISIS EKSPRESI GEN

##### 4.1.1 Gen *ilfma*

Pada hari ke-3, hanya kumpulan ikan zebra yang menerima suntikan IP HT 10 mg/kg menunjukkan penurunan signifikan dari segi nisbah ekspresi gen *ilfma* berbanding dengan plasebo ( $p < 0.05$ ). Selain itu, ikan zebra yang menerima suntikan IP HT 10 mg/kg menunjukkan peningkatan yang signifikan dari segi ekspresi gen pada hari ke-21 berbanding dengan hari ke-3 ( $p < 0.01$ ). Nisbah ekspresi gen *ilfma* untuk setiap kumpulan ikan zebra ditunjukkan dalam Rajah 4.1.

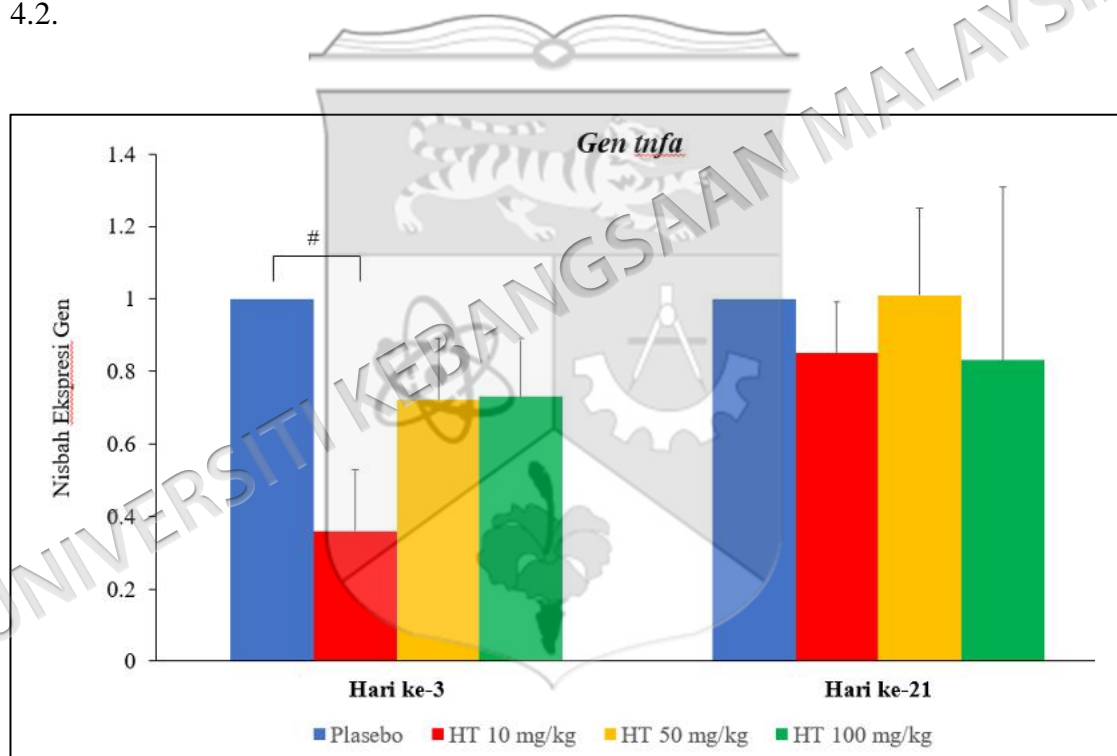


Rajah 4.1 Nisbah ekspresi gen *ilfma* untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra,  $n = 6$  untuk setiap kumpulan. Perbezaan signifikan ( $p < 0.05$ ) kumpulan HT 10 mg/kg berbanding dengan plasebo pada hari ke-3 dilabel dengan (#), manakala perbezaan signifikan ( $p < 0.01$ ) pada hari ke-21 berbanding dengan hari ke-3 untuk kumpulan HT 10 mg/kg dilabel dengan (\*\*).

Analisis statistik ANOVA dengan ujian Tukey post hoc dilakukan untuk data setiap kumpulan pada hari yang sama, manakala ujian T bebas dilakukan untuk membandingkan kumpulan yang sama pada hari ke-3 dan ke-21. Semua data direkodkan dalam  $\text{min} \pm \text{SEM}$ .

#### 4.1.2 Gen *tnfa*

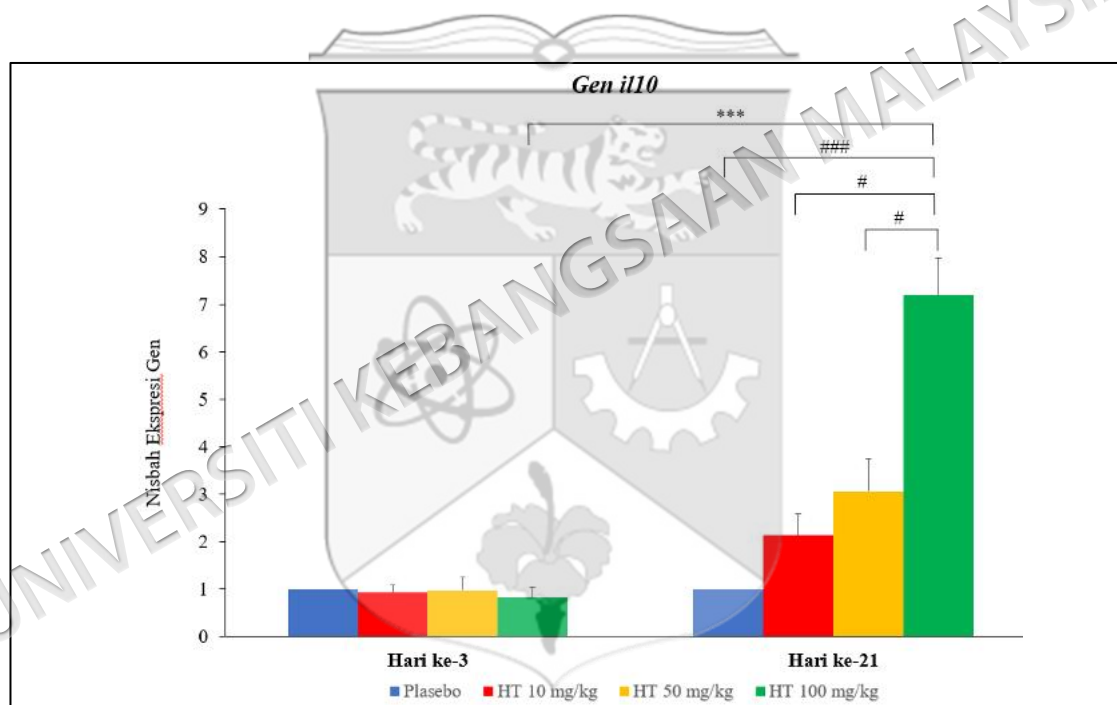
Pada hari ke-3, hanya kumpulan ikan zebra yang menerima suntikan IP HT 10 mg/kg menunjukkan penurunan yang signifikan dari segi nisbah ekspresi gen *tnfa* berbanding dengan plasebo ( $p < 0.05$ ). Pada hari ke-21, nisbah ekspresi gen untuk setiap kumpulan ikan zebra yang menerima rawatan HT tiada perbezaan dengan kumpulan plasebo. Nisbah ekspresi gen *tnfa* untuk setiap kumpulan ikan zebra ditunjukkan dalam Rajah 4.2.



Rajah 4.2 Nisbah ekspresi gen *tnfa* untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra,  $n = 6$  untuk setiap kumpulan. Perbezaan signifikan ( $p < 0.05$ ) kumpulan HT 10 mg/kg berbanding dengan plasebo pada hari ke-3 yang dilabel dengan (#). Analisis statistik ANOVA dengan ujian Tukey post hoc dilakukan untuk data setiap kumpulan pada hari yang sama manakala ujian T bebas dilakukan untuk membandingkan kumpulan yang sama pada hari ke-3 dan ke-21. Semua data direkodkan dalam  $\text{min} \pm \text{SEM}$ .

### 4.1.3 Gen *il10*

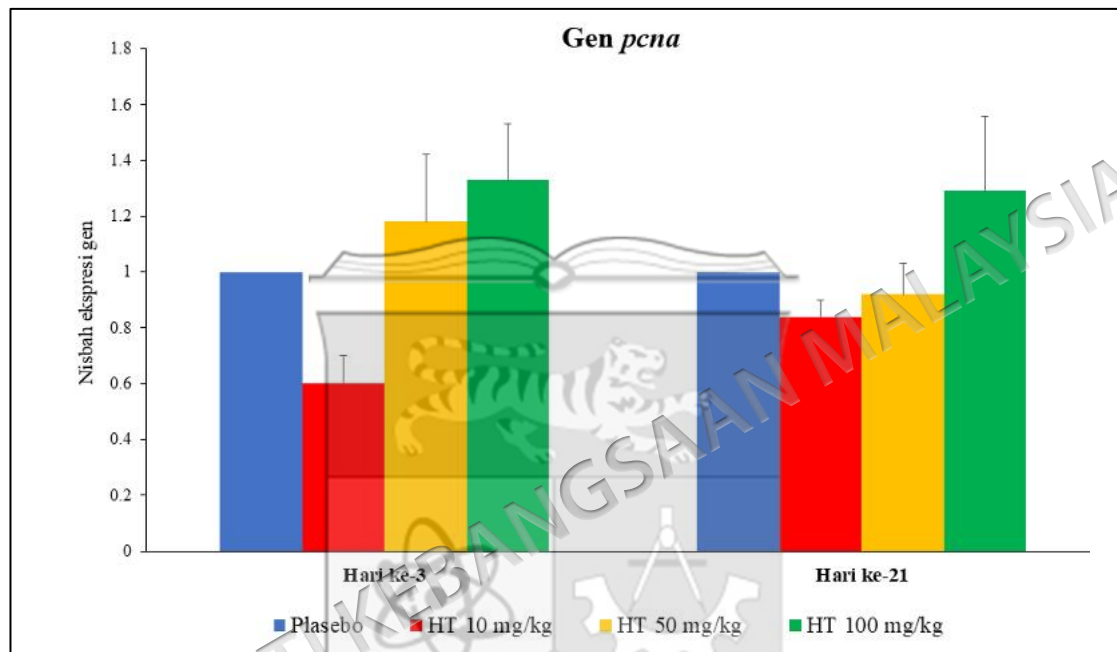
Pada hari ke-3, tiada perbezaan dalam nisbah ekspresi gen *il10* untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra yang menerima rawatan HT berbanding dengan plasebo. Pada hari ke-21, kumpulan ikan zebra yang menerima suntikan IP HT 100 mg/kg telah menunjukkan peningkatan yang signifikan dari segi nisbah ekspresi gen *il10* berbanding dengan kumpulan plasebo dan kumpulan ikan zebra yang menerima suntikan IP HT 10 mg/kg dan 50 mg/kg ( $p < 0.05$ ). Selain itu, kumpulan ikan zebra yang menerima rawatan HT 100 mg/kg telah menunjukkan peningkatan yang amat signifikan dari segi nisbah ekspresi gen *il10* pada hari ke-21 berbanding dengan hari ke-3 ( $p < 0.001$ ). Nisbah ekspresi gen *il10* untuk setiap kumpulan ikan zebra ditunjukkan dalam Rajah 4.3.



Rajah 4.3 Nisbah ekspresi gen *il10* untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra,  $n = 6$  untuk setiap kumpulan. Perbezaan signifikan ( $p < 0.05$ ) kumpulan HT 100 mg/kg berbanding dengan kumpulan HT 10 mg/kg dan 50 mg/kg pada hari ke-21 dilabel dengan (#). Perbezaan signifikan ( $p < 0.001$ ) kumpulan HT 100 mg/kg berbanding dengan plasebo pada hari ke-21 dilabel dengan (###). Perbezaan signifikan ( $p < 0.001$ ) pada hari ke-21 berbanding dengan hari ke-3 untuk kumpulan HT 100 mg/kg dilabel dengan (\*\*\*). Analisis statistik ANOVA dengan ujian Tukey post hoc dilakukan untuk data setiap kumpulan pada hari yang sama, manakala ujian T bebas dilakukan untuk membandingkan kumpulan yang sama pada hari ke-3 dan ke-21. Semua data direkodkan dalam  $\text{min} \pm \text{SEM}$ .

#### 4.1.4 Gen *pcna*

Secara keseluruhannya, ekspresi gen *pcna* tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan sama ada dari segi dos rawatan HT ataupun perbandingan antara hari ke-3 dan hari ke-21. Nisbah ekspresi gen *pcna* untuk setiap kumpulan ikan zebra ditunjukkan dalam Rajah 4.4.



Rajah 4.4 – Nisbah ekspresi gen *pcna* untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra,  $n = 6$  untuk setiap kumpulan. Analisis statistik ANOVA dengan ujian Tukey post hoc dilakukan untuk data setiap kumpulan pada hari yang sama, manakala ujian T bebas dilakukan untuk membandingkan kumpulan yang sama pada hari ke-3 dan ke-21. Semua data direkodkan dalam  $\text{min} \pm \text{SEM}$ .

#### 4.1.5 Ringkasan Penemuan untuk Analisis Ekspresi Gen

Secara keseluruhannya, nisbah ekspresi gen untuk gen proinflamasi iaitu *il1fma* dan *tnfa* serta gen antiinflamasi: *il10* untuk setiap kumpulan ikan zebra yang menerima HT 10 mg/kg, 50 mg/kg dan 100 mg/kg menunjukkan peningkatan pada hari ke-21 berbanding dengan hari ke-3. Ringkasan ditunjukkan dalam Jadual 4.1.

Jadual 4.1 Ringkasan Penemuan untuk Analisis Ekspresi Gen

Gen	Ringkasan Penemuan
<i>il1fma</i> (proinflamasi)	Perbezaan signifikan ( $p < 0.05$ ) kumpulan HT 10 mg/kg berbanding dengan plasebo. Perbezaan signifikan ( $p < 0.01$ ) pada hari ke-21 berbanding dengan hari ke-3 untuk kumpulan HT 10 mg/kg.
<i>tnfa</i> (proinflamasi)	Perbezaan signifikan ( $p < 0.05$ ) kumpulan HT 10 mg/kg berbanding dengan plasebo pada hari ke-3.
<i>il10</i> (antiinflamasi)	Perbezaan signifikan ( $p < 0.05$ ) kumpulan HT 100 mg/kg berbanding dengan kumpulan HT 10 mg/kg dan 50 mg/kg pada hari ke-21. Perbezaan signifikan ( $p < 0.001$ ) pada hari ke-21 berbanding dengan hari ke-3 untuk kumpulan HT 100 mg/kg.
<i>pcna</i> (proliferasi)	Tiada perbezaan signifikan dicatatkan.

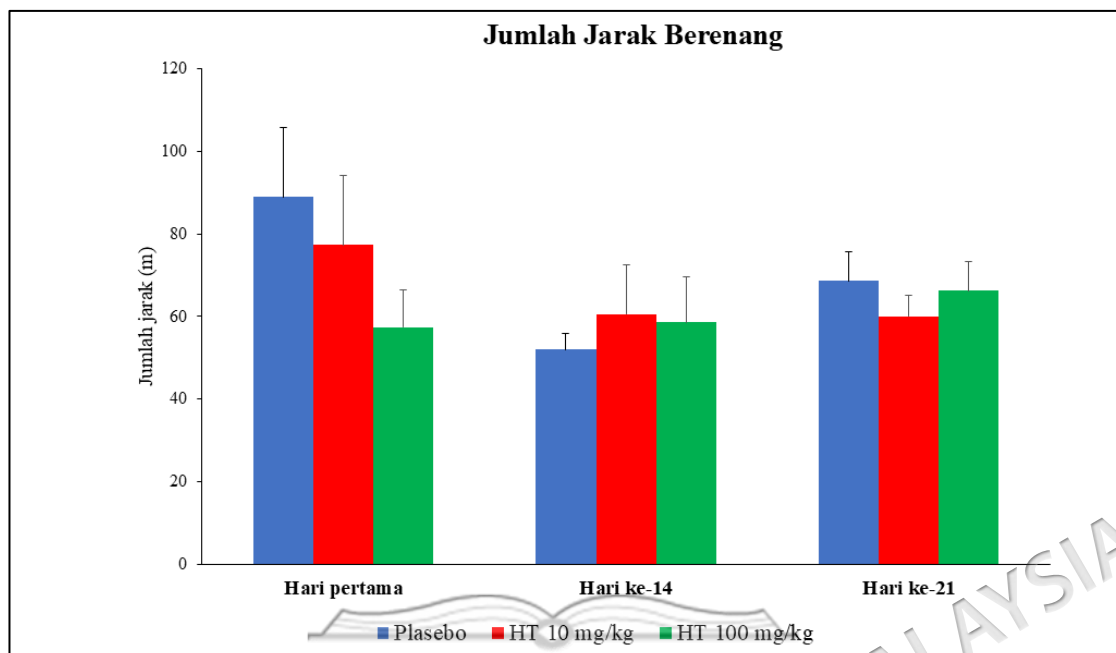
## 4.2 ANALISIS TAHAP KEBIMBANGAN IKAN ZEBRA

### 4.2.1 Jumlah Jarak Berenang

Secara keseluruhannya, purata jumlah jarak berenang ikan zebra tidak menunjukkan perbezaan signifikan antara setiap kumpulan. Jumlah jarak berenang ikan zebra untuk kumpulan plasebo pada hari pertama selepas TBI adalah yang paling jauh iaitu sebanyak 88.9 m. Jumlah jarak berenang ikan zebra untuk setiap kumpulan ditunjukkan dalam Jadual 4.2 dan Rajah 4.5.

Jadual 4.2 Purata Jumlah Jarak Berenang Ikan Zebra (m)

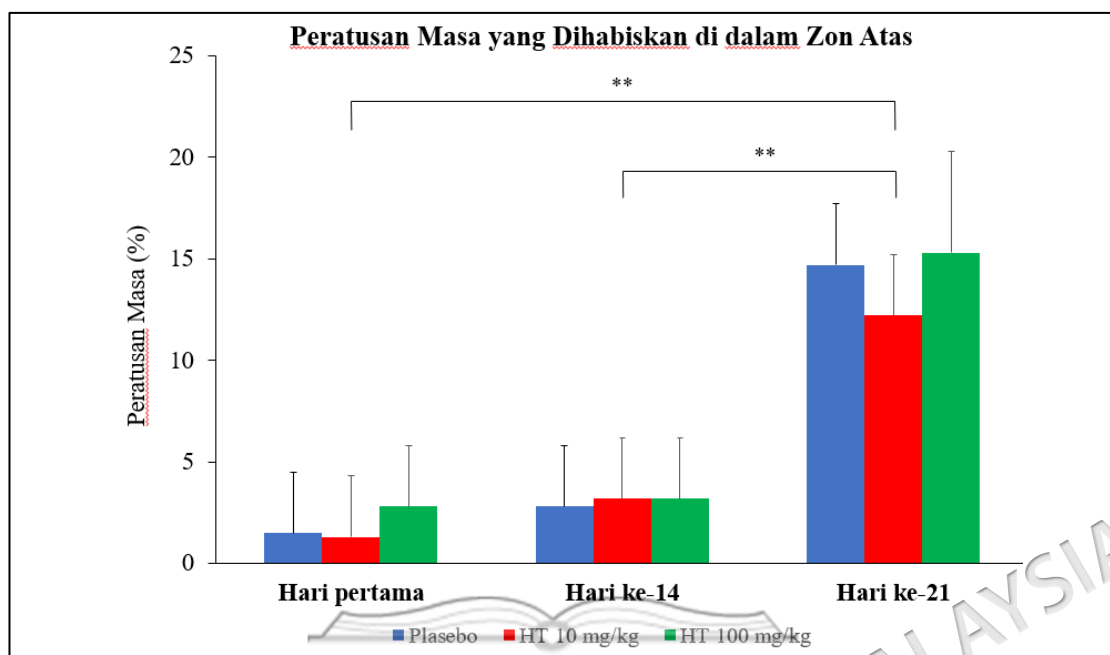
	Hari Pertama	Hari ke-14	Hari ke-21
<b>Plasebo</b>	88.9	52	68.6
<b>HT 10 mg/kg</b>	77.3	60.6	60
<b>HT 100 mg/kg</b>	57.4	58.6	66.2



Rajah 4.5 Jumlah jarak berenang untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra,  $n = 6$  untuk setiap kumpulan. Analisis statistik ANOVA dengan ujian Tukey post hoc dilakukan untuk data setiap kumpulan pada hari yang sama dan juga untuk data pada hari pertama, ke-14 dan ke-21 untuk kumpulan yang sama. Semua data direkodkan dalam  $\text{min} \pm \text{SEM}$ .

#### 4.2.2 Peratusan Masa yang Dhabiskan di Dalam Zon Atas

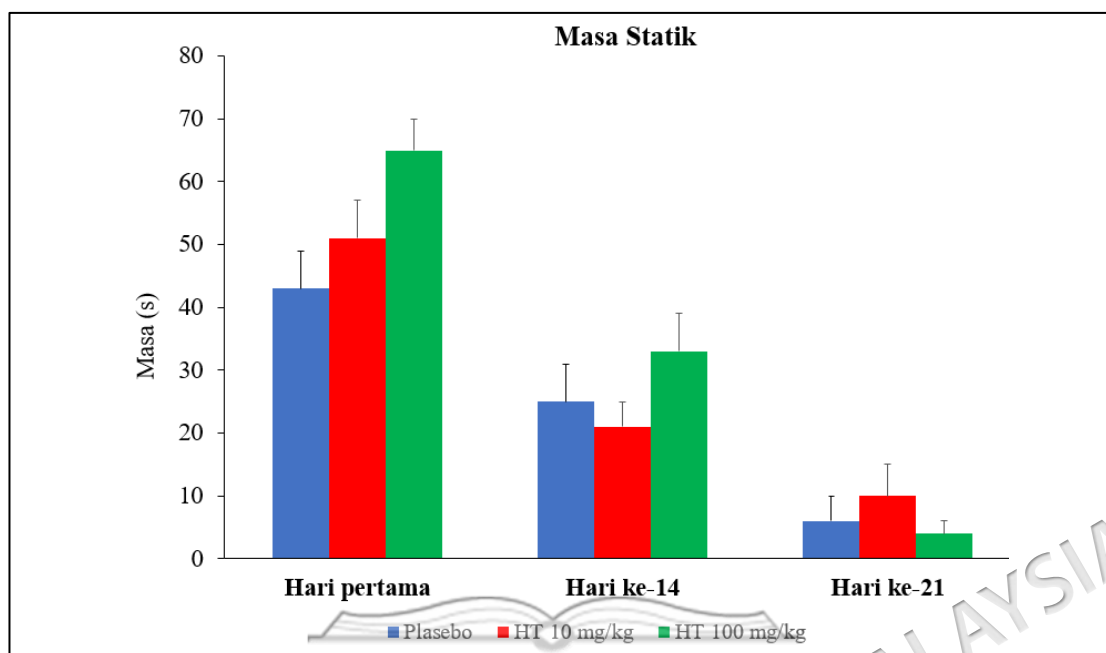
Secara keseluruhannya, peratusan masa yang dihabiskan oleh ikan zebra di dalam zon atas adalah paling tinggi pada hari ke-21 berbanding dengan hari ke-14 dan hari pertama selepas TBI. Peratusan masa yang dihabiskan oleh ikan zebra di dalam zon atas menunjukkan perbezaan signifikan ( $p < 0.01$ ) pada hari ke-21 berbanding dengan hari pertama dan hari ke-14 untuk kumpulan ikan zebra yang menerima rawatan HT 10 mg/kg. Peratusan masa yang dihabiskan oleh setiap kumpulan ikan zebra di dalam zon atas ditunjukkan dalam Rajah 4.6.



Rajah 4.6 Peratusan masa yang dihabiskan di dalam zon atas untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra,  $n = 6$  untuk setiap kumpulan. Perbezaan signifikan ( $p < 0.01$ ) pada hari ke-21 berbanding dengan hari pertama dan ke-14 untuk kumpulan HT 10 mg/kg dilabel dengan (\*\*). Analisis statistik ANOVA dengan ujian Tukey post hoc dilakukan untuk data setiap kumpulan pada hari yang sama dan juga untuk data pada hari pertama, ke-14 dan ke-21 untuk kumpulan yang sama. Semua data direkodkan dalam  $\text{min} \pm \text{SEM}$ .

#### 4.2.3 Masa Statik

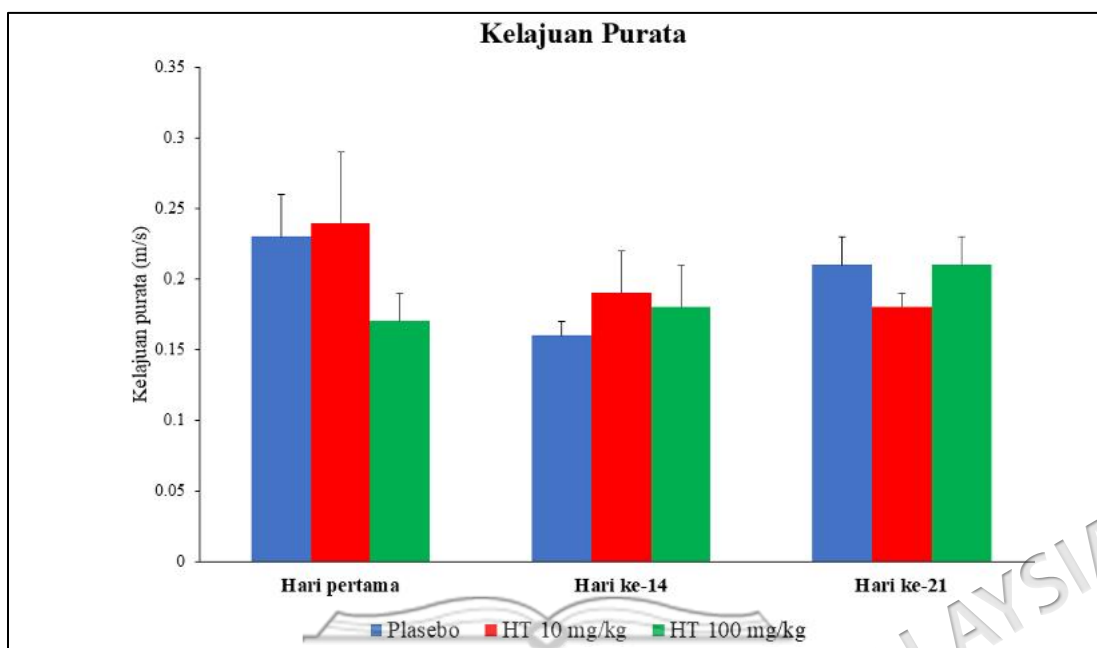
Secara keseluruhannya, masa statik yang direkodkan untuk setiap kumpulan ikan zebra tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan. Masa statik ikan zebra yang dicatatkan adalah paling tinggi pada hari pertama selepas TBI untuk setiap kumpulan ikan zebra berbanding dengan hari ke-14 dan ke-21 selepas TBI. Masa statik untuk setiap kumpulan ikan zebra ditunjukkan dalam Rajah 4.7.



Rajah 4.7 Masa statik untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra,  $n = 6$  untuk setiap kumpulan. Analisis statistik ANOVA dengan ujian Tukey post hoc dilakukan untuk data setiap kumpulan pada hari yang sama dan juga untuk data pada hari pertama, ke-14 dan ke-21 untuk kumpulan yang sama. Semua data direkodkan dalam  $\text{min} \pm \text{SEM}$ .

#### 4.2.4 Kelajuan Purata

Kelajuan purata ikan zebra untuk setiap kumpulan tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan. Secara keseluruhannya, kelajuan purata ikan zebra untuk setiap kumpulan adalah stabil dan berada dalam lingkungan 0.15 hingga 0.25 m/s. Kelajuan purata ikan zebra untuk setiap kumpulan ditunjukkan dalam Rajah 4.8.



Rajah 4.8 Kelajuan purata untuk setiap kumpulan TBI ikan zebra,  $n = 6$  untuk setiap kumpulan. Analisis statistik ANOVA dengan ujian Tukey post hoc dilakukan untuk data setiap kumpulan pada hari yang sama dan juga untuk data pada hari pertama, ke-14 dan ke-21 untuk kumpulan yang sama. Semua data direkodkan dalam  $\text{min} \pm \text{SEM}$ .

#### 4.2.5 Ringkasan Penemuan untuk Analisis Tahap Kebimbangan Ikan Zebra

Ringkasan penemuan untuk analisis tahap keseimbangan ikan zebra menggunakan *Novel Tank Test* ditunjukkan dalam Jadual 4.3.

Jadual 4.3 Ringkasan Penemuan untuk Analisis Tahap Kebimbangan Ikan Zebra

Parameter	Ringkasan Penemuan
Jumlah jarak berenang	Tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan.
Kelajuan purata	Tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan.
Peratusan masa yang dihabiskan di dalam zon atas	Perbezaan signifikan ( $p < 0.01$ ) pada hari ke-21 berbanding dengan hari pertama dan ke-14 untuk kumpulan HT 10 mg/kg.
Masa statik	Masa statik adalah paling tinggi untuk hari pertama dan berkurang secara beransur-ansur sehingga hari ke-21 untuk setiap kumpulan ikan zebra dan tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan.

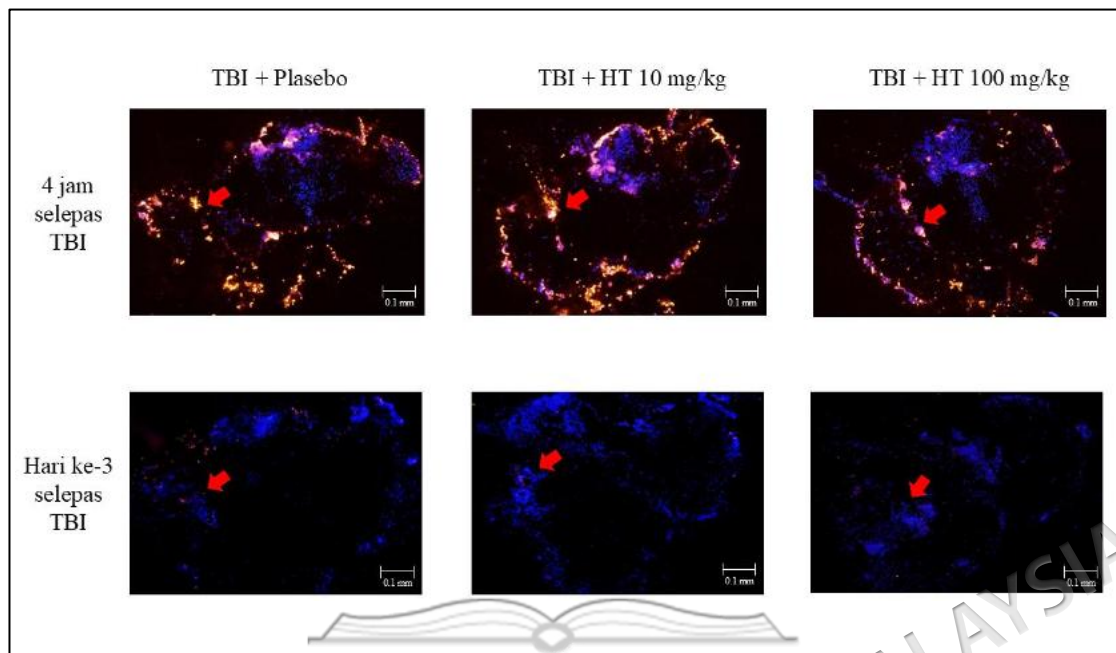
### 4.3 ANALISIS KEMATIAN SEL (UJIAN TUNEL)

Analisis kematian sel dilakukan pada waktu empat jam selepas TBI dan hari ke-3 selepas TBI ke atas tiga kumpulan ikan zebra iaitu kumpulan plasebo, kumpulan ikan zebra yang menerima HT 10 mg/kg dan 100 mg/kg. Kecederaan tikaman ke dalam telensefalon kiri ikan zebra ditunjukkan dalam Rajah 4.9 melalui anak panah merah.

Terdapat dua isyarat dalam kajian histologi ini iaitu isyarat DAPI yang mewarnakan nukleus sel biru yang mengandungi DNA untuk melihat secara kasar struktur telensefalon ikan zebra, manakala isyarat TUNEL yang berwarna merah melabelkan serpihan DNA dari sel yang telah mati sama ada dari proses apoptosis ataupun nekrosis. Dalam kajian ini, ujian TUNEL dianalisis secara kualitatif disebabkan oleh spesifisiti yang terhad terhadap apoptosis, variasi teknikal penyelidik serta kesukaran proses pengiraan disebabkan oleh pewarnaan yang padat dan pertindihan nukleus.

Pada waktu empat jam selepas TBI, ketiga-tiga kumpulan ikan zebra itu menunjukkan isyarat TUNEL yang berwarna merah pada kawasan kecederaan dan juga di sekeliling telensefalon ikan zebra. Pada hari ke-3 selepas TBI, isyarat TUNEL didapati berkurangan dalam kawasan kecederaan untuk ketiga-tiga kumpulan ikan zebra dengan kumpulan ikan zebra yang menerima HT 10 mg/kg dan 100 mg/kg menunjukkan isyarat TUNEL yang paling kurang berbanding dengan kumpulan plasebo.

Sementara itu, isyarat biru DAPI banyak didapati di kawasan sekeliling telensefalon ikan zebra dan juga di kawasan kecederaan pada waktu empat jam selepas TBI dan juga hari ke-3 selepas TBI. Fotomikrograf dengan pembesaran x10 dalam Rajah 4.9 menunjukkan analisis kematian sel menggunakan ujian TUNEL.



Rajah 4.9 Analisis kematian sel menggunakan ujian TUNEL. Fotomikrograf diambil pada pembesaran x10 dan anak panah merah menunjukkan kecederaan tikaman ke dalam telensefalon kiri ikan zebra. Isyarat merah ujian TUNEL menunjukkan serpihan DNA dari sel yang telah mati manakala isyarat biru DAPI menunjukkan nukleus sel dalam telensefalon ikan zebra.



## BAB V

### PERBINCANGAN

#### 5.1 ANALISIS EKSPRESI GEN

Dalam kajian ini, empat gen ikan zebra iaitu *il1fma*, *il10*, *tnfa* dan *pcna* telah dipilih untuk analisis. Sementara itu, tiga gen iaitu *il1fma*, *il10* dan *tnfa* ialah gen yang mengkod sitokin manakala gen *pcna* bertanggungjawab mengkod protein PCNA yang penting untuk proses replikasi dan pembaikan DNA dalam proliferasi sel. Sitokin merupakan protein yang dirembeskan oleh pelbagai sel terutamanya sel-sel imun yang bertindak sebagai utusan kimia dalam sistem imun untuk mengawal selia proses inflamasi, jangkitan dan kecederaan (Cui et al. 2024).

Mengikut pangkalan data UniProt, gen ikan zebra *il1fma* bertanggungjawab mengkod protein IL-1 $\alpha$  manakala *il10* mengkod protein IL-10 dan gen *tnfa* mengkod protein limfotoksin-alfa. Protein IL-1 $\alpha$ , salah satu ahli keluarga IL-1 merupakan sitokin proinflamasi yang dirembeskan oleh sel monosit, makrofaj, neutrofil, atau dendritik semasa tindak balas imun semula jadi berlaku (Garlanda, Di Ceglie & Jaillon 2025). Protein IL-10 pula merupakan sitokin antiinflamasi yang bertanggungjawab untuk menyekat tindak balas imun yang berlebihan (Carlini et al. 2023). Sitokin antiinflamasi IL-10 bukan sahaja bertindak untuk mengimbangi proses inflamasi pada peringkat awal TBI tetapi juga mempunyai kesan neuroprotektif pada peringkat lewat TBI (Garcia et al. 2017).

Sementara itu, limfotoksin-alfa merupakan ahli keluarga TNF yang dirembeskan oleh sel limfosit dan mempunyai aktiviti sitotoksik (Tafalla & Granja 2018). Limfotoksin-alfa mempunyai struktur yang homolog kepada TNF- $\alpha$  dan boleh terikat kepada reseptor TNFR1 dan TNFR2 (Zhang et al. 2025). Pada peringkat awal TBI, apabila TNF- $\alpha$  terikat kepada reseptor TNFR1, ia boleh membawa

kepada pengaktifan mikroglia pro-inflamasi yang seterusnya boleh mengakibatkan kecederaan otak sekunder (Zhao et al. 2018). Apabila TNF- terikat kepada reseptor TNFR2, ia boleh mengaktifkan mikroglia anti-inflamasi yang seterusnya membantu regenerasi dan kelangsungan hidup neuron (Ortí-Casañ et al. 2019).

Secara amnya, nisbah ekspresi gen proinflamasi iaitu *il1fma* dan *tnfa* serta gen antiinflamasi *il10* adalah lebih tinggi pada hari ke-21 berbanding hari ke-3 selepas TBI untuk semua kumpulan ikan zebra yang menerima suntikan intraperitoneal HT. Ini mungkin disebabkan oleh pemberian hanya satu dos HT pada waktu induksi TBI yang dapat mengurangkan proses inflamasi pada peringkat awal TBI. Sekiranya HT dapat diberikan dalam beberapa dos, kemungkinan dapat mengurangkan proses inflamasi pada peringkat lewat TBI.

Hasil daripada kajian ini, rawatan HT pada dos 10 mg/kg didapati dapat mengurangkan ekspresi gen *il1fma* secara signifikan berbanding plasebo pada hari ke-3 selepas TBI. Ini menunjukkan HT pada dos rendah berupaya mengurangkan proses inflamasi pada peringkat awal. Hasil kajian ini adalah selari dengan satu kajian *in vitro* dan *in vivo* yang berjaya membuktikan bahawa HT dapat mengurangkan sitokin proinflamasi seperti IL-1 (Zhang et al. 2020b). Sementara itu, pada hari ke-21 selepas TBI, didapati ekspresi gen *il1fma* untuk kesemua kumpulan yang menerima rawatan HT meningkat terutamanya kumpulan ikan zebra yang menerima dos HT yang tinggi iaitu 100 mg/kg. Ini bererti kemungkinan administrasi HT sekali sahaja tidak dapat mengurangkan inflamasi untuk jangka masa yang panjang dan HT pada dos yang tinggi iaitu 100 mg/kg mungkin boleh merencatkan proses pemulihan otak ikan zebra. Ini disebabkan oleh ekspresi berlebihan IL-1 didapati boleh meningkatkan risiko untuk mendapat kemerosotan kognitif selepas TBI dalam satu kajian klinikal (Purwa Samatra, Pratiwi & Widyadharma 2018).

Dalam kajian ini, kumpulan ikan zebra yang menerima dos HT pada 10 mg/kg menunjukkan penurunan yang signifikan dari segi pengawalaturan gen *tnfa* berbanding dengan plasebo pada hari ke-3. Ini menunjukkan rawatan HT pada dos yang rendah berupaya mengurangkan proses inflamasi dan TNF- pada peringkat awal TBI seperti yang dibuktikan daripada satu kajian TBI lain yang menggunakan tikus Sprague-

Dawley (Cordaro et al. 2021). Manakala ekspresi gen *tnfa* meningkat pada hari ke-21 tetapi tidak signifikan berbanding dengan hari ke-3. Ini menunjukkan TNF- mungkin diperlukan pada peringkat lewat TBI untuk proses regenerasi neuron otak ikan zebra (Ortí-Casañ et al. 2019).

Untuk gen *il10* pula, rawatan HT didapati tidak menunjukkan perubahan yang signifikan dari segi ekspresi gen berbanding dengan plasebo pada hari ke-3 selepas TBI. Ini disebabkan oleh sitokin antiinflamasi IL-10 bertindak sebagai pengawal selia proses inflamasi pada peringkat awal TBI dan peningkatan yang mendadak boleh menghalang proses inflamasi yang penting untuk mengeluarkan sel mati dan membunuh mikroorganisma (Garcia et al. 2017; Postolache et al. 2020). Sementara itu, pada hari ke-21 selepas TBI, didapati ekspresi gen *il10* meningkat untuk semua kumpulan rawatan HT berbanding hari ke-3. Ini menunjukkan protein IL-10 bertindak sebagai sitokin antiinflamasi dan mempunyai kesan neuroprotektif pada peringkat lewat TBI (Garcia et al. 2017).

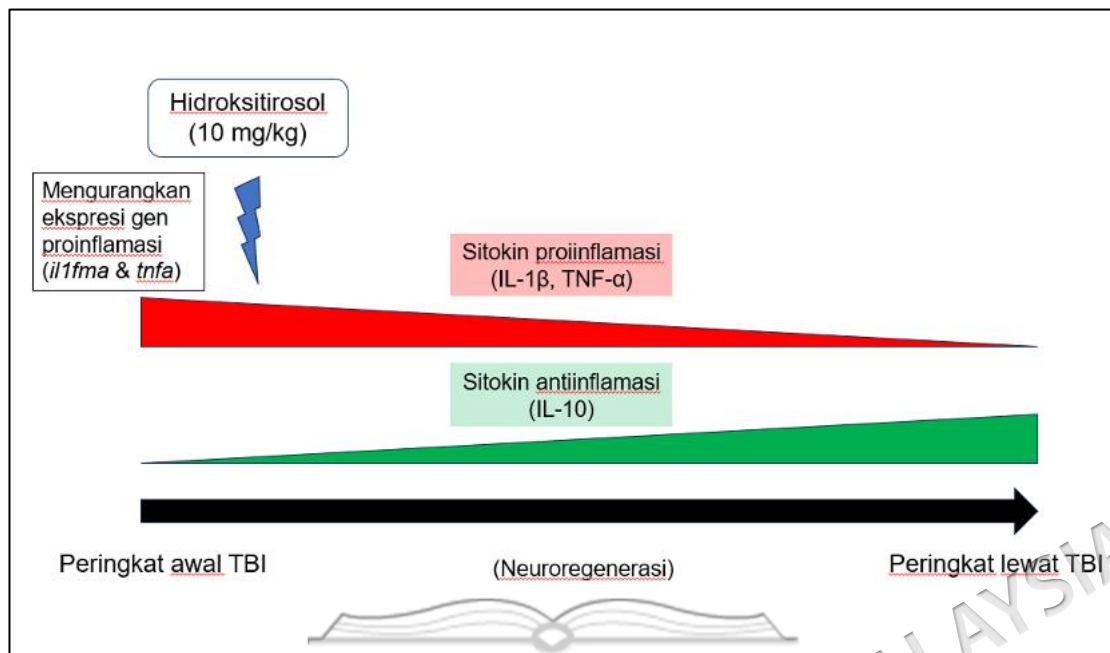
Kumpulan ikan zebra yang menerima rawatan HT 100 mg/kg pada hari ke-21 untuk gen *il10* menunjukkan nisbah ekspresi gen yang sangat tinggi iaitu lebih kurang 7 kali ganda berbanding kumpulan plasebo. Ini disebabkan oleh artifak pengiraan dan bukan disebabkan oleh ekspresi gennya yang tinggi. Nisbah ekspresi gen dikira menggunakan formula Livak =  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  iaitu secara perbandingan dengan gen rujukan dan bukannya nilai mutlak. Nilai Cq untuk gen *il10* pada hari ke-21 dilaporkan tinggi sekitar 30 □36 berbanding dengan gen yang lain yang menunjukkan kuantiti DNA yang sangat rendah. Ini akan menyebabkan pengiraan jurang  $\Delta Cq$  yang tinggi dengan nilai negatif seterusnya meningkatkan kiraan nisbah ekspresi gen secara berlipat ganda dan bukannya disebabkan oleh kesan toksisiti HT yang akan meningkatkan ekspresi gen proinflamasi yang lain secara berlebihan. Justeru itu, kemungkinan gen *il10* perlu dianalisis pada peringkat awal dan pertengahan TBI untuk mendapatkan keputusan yang lebih jitu atau menggunakan gen antiinflamasi yang lain seperti *tgfb* untuk mengkaji proses antiinflamasi (Sharma et al. 2020).

Protein PCNA memainkan dua peranan yang penting dalam proses replikasi DNA. Pertamanya, PCNA bertindak merekrut polimerase DNA dan pelbagai faktor lain

supaya proses replikasi DNA berjalan lancar (Zhang et al. 2021). Keduanya, protein PCNA berfungsi dalam sistem Toleransi Kerosakan DNA (*DNA Damage Tolerance*) untuk memintas kerosakan DNA supaya proses replikasi DNA dapat diteruskan walaupun berlaku kerosakan (Zhang et al. 2021). Dalam kajian ini, rawatan HT tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan dari segi ekspresi gen *pcna*. Keputusan ini berbeza dengan satu kajian in vitro yang dilakukan oleh Kamil et al. (2020) yang menunjukkan HT pada dos rendah mampu untuk menggalakkan proliferasi sel Schwann manusia. Perbezaan keputusan ini mungkin disebabkan oleh ekspresi protein PCNA boleh dipengaruhi oleh pelbagai faktor seperti jangkitan virus, radikal bebas, dan penyakit kanser (Pan & Zhang 2021; Wang et al. 2023; Yin et al. 2015).

Dalam kajian ini, kecederaan tikaman ke dalam telensefalon adalah berbeza dengan model kecederaan tumpul ikan zebra kerana kedua-dua kaedah ini menghasilkan tindak balas inflamasi yang berbeza disebabkan oleh mekanisme kecederaan yang berlainan. Kecederaan tikaman akan menghasilkan kecederaan yang fokal dan tertumpu pada satu lokasi manakala kecederaan tumpul seperti konkusi akan menghasilkan kecederaan yang lebih luas. Dari segi mekanisme selular, kecederaan tikaman telensefalon akan menghasilkan regeneratif angiogenesis (Fernezelian et al. 2025), manakala kecederaan tertutup ikan zebra melalui kejatuhan pemberat akan menghasilkan edema serebrum yang hampir sama dengan manusia (Hentig et al. 2021). Walaubagaimanapun, kedua-dua jenis kecederaan ini menunjukkan persamaan iaitu dari segi peningkatan ekspresi gen proinflamasi pada peringkat awal TBI, kehadiran sel mikroglia dan juga proliferasi sel glial dalam proses neuroregenerasi (Fernezelian et al. 2025; Hentig et al. 2021).

Kesimpulannya, rawatan HT pada dos rendah iaitu 10 mg/kg didapati dapat mengurangkan proses inflamasi pada peringkat awal TBI seperti yang ditunjukkan melalui pengurangan signifikan ekspresi gen proinflamasi iaitu *il1fma* dan *tnfa* pada hari ke-3 selepas TBI. Rumusan hipotesis kesan rawatan HT terhadap proses inflamasi dalam model TBI ikan zebra ditunjukkan dalam Rajah 5.1.



Rajah 5.1 Rajah ini menunjukkan rumusan hipotesis kesan rawatan HT terhadap proses inflamasi dalam model TBI ikan zebra. Rawatan dos tunggal HT 10 mg/kg boleh mengurangkan ekspresi gen proinflamasi (*il1fma*, *tnfa*) dan mengurangkan kematian sel pada peringkat awal TBI. Keseimbangan antara sitokin proinflamasi dan antiinflamasi diperlukan untuk proses neuroregenerasi otak ikan zebra.

## 5.2 ANALISIS TAHAP KEBIMBANGAN IKAN ZEBRA

Tahap kebimbangan (anxiety) ikan zebra boleh diukur melalui aktiviti lokomotornya seperti jumlah jarak berenang, masa statik, jumlah masa yang dihabiskan di dalam zon atas atau bawah akuarium dan kelajuan purata (Johnson et al. 2023). Apabila ikan zebra berada dalam keadaan yang bimbang, corak renangannya akan berubah dan akan mempengaruhi aktiviti lokomotor seperti peningkatan masa statik dan pengurangan masa yang dihabiskan di dalam zon atas akuarium. Semua komponen penting aktiviti lokomotor ini boleh dikaji dengan menggunakan *Novel Tank Test* yang digunakan secara meluas oleh penyelidik dan telah menjalani proses penambahbaikan serta penyeragaman (Shinkai et al. 2025). Antara kaedah lain yang digunakan untuk mengkaji tingkah laku ikan zebra ialah *Shoaling Test* yang dapat menilai tingkah laku sosial dan berkumpul serta *Light/Dark Test* yang dapat menilai tahap kebimbangan serta tindak balas ikan zebra terhadap cahaya (Johnson et al. 2023).

Terdapat banyak faktor yang boleh mempengaruhi tahap kebimbangan ikan zebra yang boleh dibahagikan kepada faktor persekitaran, genetik, penyakit atau

kecederaan dan pendedahan kepada bahan kimia. Faktor persekitaran yang baru boleh meningkatkan tahap kebimbangan ikan zebra yang dikenali sebagai *novelty-induced anxiety* (Golla, Østby & Kermen 2020). Selain itu, ikan zebra mutan seperti *spiegeldanio* adalah lebih agresif berbanding dengan ikan zebra jenis liar (*wildtype*) (Mustafa et al. 2019). Ikan zebra yang mengalami kecederaan, terdedah kepada penyakit atau bahan kimia seperti alkohol juga boleh meningkatkan tahap kebimbangan (Echevarria, Toms & Jouandot 2011; Tikhonova et al. 2022).

Secara amnya, kecederaan tikaman ke dalam telensefalon ikan zebra tidak menyebabkan kerosakan motor yang kekal pada ikan zebra dan tingkah laku berenang kembali ke tahap normal sekitar 6 jam selepas TBI (Hentig et al. 2021). Ini juga dapat dibuktikan melalui parameter jumlah jarak berenang dan kelajuan puratanya yang stabil sepanjang kajian ini dan juga masa statik yang semakin berkurangan pada peringkat lewat TBI memberi indikasi bahawa ikan zebra aktif berenang. Dengan ini, analisis aktiviti lokomotor ikan zebra menggunakan *Novel Tank Test* dapat dihubungkan dengan tahap kebimbangan ikan zebra secara berkesan.

Jumlah jarak berenang ikan zebra boleh dipengaruhi oleh pelbagai faktor seperti corak renangan dan tingkah laku statik ikan zebra (Alia & Petrunich-Rutherford 2019; Wilson Alphonse & Rajaretinam 2022). Oleh itu, ikan zebra yang mempunyai tahap kebimbangan yang tinggi boleh menghasilkan dua keputusan yang berbeza. Pertama, ikan zebra yang bimbang boleh berenang secara tidak menentu yang secara tidak langsung akan menambah jumlah jarak berenang (Wilson Alphonse & Rajaretinam 2022). Kedua, ikan zebra yang bimbang boleh berada dalam keadaan statik yang akan mengurangkan jumlah jarak berenang (Pintos et al. 2023). Dalam kajian ini, jumlah jarak berenang ikan zebra tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan antara setiap kumpulan. Ini mungkin disebabkan oleh keputusan yang berbeza apabila ikan zebra menunjukkan sifat kebimbangan. Oleh itu, komponen lain aktiviti lokomotor ikan zebra perlu dianalisis dengan teliti sebelum kesimpulan dibuat.

Ikan zebra yang bimbang akan cenderung untuk berada dalam keadaan yang statik. Dalam kajian ini, walaupun tiada perbezaan yang signifikan yang dicatatkan antara kesemua kumpulan ikan zebra, namun begitu, secara keseluruhannya, masa statik

yang dicatatkan adalah paling tinggi pada hari pertama selepas TBI berbanding dengan hari ke-14 dan hari ke-21 selepas TBI. Ini memberi indikasi bahawa HT tidak memberikan apa-apa kesan untuk mengurangkan tahap kebimbangan ikan zebra pada peringkat awal TBI. Sementara itu, kelajuan purata yang dicatatkan dalam kajian ini adalah stabil dan tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan antara setiap kumpulan, selari dengan keputusan jumlah jarak berenang ikan zebra.

Ikan zebra cenderung untuk menghabiskan masa di dalam zon bawah akuarium apabila berada dalam keadaan bimbang (Alia & Petrunich-Rutherford 2019). Secara keseluruhannya, kajian ini menunjukkan terdapat peningkatan masa yang dihabiskan di dalam zon atas akuarium pada hari ke-21 berbanding dengan hari ke-14 dan pertama selepas TBI. Ini mungkin disebabkan oleh terdapat faktor pembiasaan ikan terhadap persekitaran (*familiarity*) yang telah mengurangkan kesan novelty-induced anxiety. Walaupun terdapat perbezaan signifikan ( $p < 0.01$ ) pada hari ke-21 berbanding dengan hari pertama dan ke-14 untuk kumpulan HT 10 mg/kg, namun begitu, tiada perbezaan yang signifikan dicatatkan berbanding dengan kumpulan plasebo. Selain itu, parameter aktiviti lokomotor yang lain tidak menunjukkan perbezaan yang signifikan yang menunjukkan rawatan HT dapat mengurangkan tahap kebimbangan ikan zebra. Kesimpulannya, setelah mengambil kira semua keputusan yang diperolehi dari *Novel Tank Test*, HT didapati tidak memberikan kesan terhadap kebimbangan ikan zebra.

### 5.3 ANALISIS KEMATIAN SEL (UJIAN TUNEL)

Pada waktu empat jam selepas TBI, kesemua kumpulan TBI ikan zebra menunjukkan isyarat TUNEL pada kawasan kecederaan dan juga di sekeliling telensefalon ikan zebra. Ini menunjukkan terdapat banyak sel mati di kawasan kecederaan dan juga di sekeliling telensefalon ikan zebra yang membolehkan antibodi isyarat TUNEL terikat kepada serpihan DNA sel mati. Pada masa yang sama, isyarat TUNEL di sekeliling telensefalon ikan zebra disebabkan oleh terdapat banyak sel mati termasuk darah yang menutupi kawasan sekeliling telensefalon ikan zebra seurus selepas TBI. Isyarat TUNEL semakin berkurangan pada hari ke-3 selepas TBI dengan kumpulan ikan zebra yang menerima rawatan HT 10 dan 100 mg/kg menunjukkan isyarat TUNEL yang paling kurang berbanding dengan kumpulan plasebo. Ini menunjukkan HT mempunyai kesan

antiapoptosis yang berkemungkinan membantu proses neuroregenerasi seterusnya mengurangkan kematian sel (Burattini et al. 2013).

Selain itu, pada hari ke-3 selepas TBI, kawasan telensefalon ikan zebra yang dilabel dengan isyarat biru DAPI tanpa isyarat TUNEL menunjukkan kawasan yang mengandungi sel-sel hidup terutamanya di kawasan kecederaan dan juga di sekeliling telensefalon. Ini mungkin menunjukkan kelahiran sel-sel baru yang menggantikan sel yang telah mati selepas TBI di kawasan kecederaan. Namun begitu, kajian ini tidak dapat membezakan jumlah kelahiran sel baru antara ketiga-tiga kumpulan ikan zebra dan memerlukan ujian lain untuk membuktikannya.

Ujian TUNEL tidak dapat membezakan punca kematian sel sama ada disebabkan oleh apoptosis ataupun nekrosis. Apoptosis merupakan satu proses aktif kematian sel yang diprogramkan manakala nekrosis merupakan satu proses pasif kematian sel yang disebabkan oleh kecederaan, jangkitan kuman atau inflamasi (Fink & Cookson 2005). Salah satu perbezaan morfologi yang boleh membezakan antara apoptosis dan nekrosis ialah proses nekrosis akan menyebabkan sel bengkak dan lisis manakala apoptosis akan mengakibatkan sel mengecut (Fink & Cookson 2005). Walaupun ujian TUNEL yang digabungkan dengan DAPI dapat memberikan maklumat mengenai fragmentasi DNA dan morfologi nukleus, namun ia tidak mencukupi untuk membezakan secara muktamad antara apoptosis dan nekrosis, kerana kedua-dua proses boleh menghasilkan isyarat TUNEL positif. Oleh itu, penanda molekul tambahan seperti *capase-3* diperlukan untuk pembezaan yang lebih tepat.

## BAB VI

### RUMUSAN

#### 6.1 KESIMPULAN

Hasil daripada kajian ini, rawatan HT pada dos rendah iaitu 10 mg/kg didapati dapat mengurangkan proses inflamasi pada peringkat awal TBI seperti yang ditunjukkan melalui pengurangan signifikan ekspresi gen proinflamasi iaitu *il1fma* dan *tnfa* pada hari ke-3 selepas TBI dan juga mengurangkan kematian sel pada peringkat awal TBI seterusnya membantu proses neuroregenerasi. Kesimpulannya, HT merupakan agen antioksidan dan antiinflamasi yang berpotensi untuk dijadikan sebagai rawatan sampingan untuk TBI. Namun begitu, kajian ini mempunyai limitasinya yang tersendiri dan memerlukan lebih banyak kajian pada masa hadapan untuk membuktikan keberkesanannya seperti yang akan dibincangkan dalam topik seterusnya.

#### 6.2 LIMITASI

Kajian ini mempunyai beberapa limitasi dari segi haiwan kajian, metodologi, dan kemahiran penyelidik. Dari segi haiwan kajian, meskipun ikan zebra mempunyai kelebihan seperti persamaan genetik yang tinggi dengan manusia dan memiliki keupayaan neuroregenerasi tetapi otak ikan zebra adalah lebih primitif dan kurang kompleks berbanding dengan otak manusia. Ini menyebabkan model TBI ikan zebra tidak dapat mereplikasi sepenuhnya TBI dalam manusia. Dari segi metodologi pula, ketiadaan kumpulan kawalan tanpa TBI menyukarkan proses perbandingan kesan yang diperhatikan dalam kumpulan TBI (plasebo) dengan nilai garis dasar. Selain itu, jantina ikan zebra yang tidak ditentukan dalam setiap kumpulan juga menyukarkan proses interpretasi tingkah laku dan juga perbandingan neurokimia.

Model TBI ikan zebra ini menggunakan kecederaan tikaman ke dalam telensefalon hanya dapat mewakili satu mekanisme TBI dalam manusia iaitu kecederaan tembus terbuka yang statistiknya jauh lebih rendah berbanding dengan kecederaan tertutup. Selain itu, kajian ini tidak melibatkan analisis protein seperti *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yang boleh memberikan gambaran secara komprehensif tentang fungsi gen. Di samping itu, kajian ini juga tidak melibatkan analisis proliferasi sel seperti bromodeoksiuridin (BrdU) yang boleh digunakan untuk mengesan kelahiran sel baru. Akhir sekali, faktor kemahiran penyelidik juga memainkan peranan yang penting dalam kajian ini. Sebagai seorang penyelidik yang baru, kemahiran untuk setiap jenis ujian masih tidak dapat dikuasai sepenuhnya dalam masa yang singkat dan mungkin akan mempengaruhi keputusan kajian.

### **6.3 CADANGAN KAJIAN LANJUTAN**

Terdapat beberapa aspek yang boleh ditambah baik dan diperbaiki untuk kajian pada masa hadapan. Pertama, haiwan mamalia seperti tikus boleh digunakan untuk mengkaji kesan rawatan HT berikutan TBI. Ini disebabkan kejayaan kajian klinikal amat bergantung kepada keputusan kajian praklinikal yang sebaik-baiknya melibatkan lebih daripada satu jenis spesies haiwan untuk membolehkan pengumpulan data yang lebih tepat dan konsisten. Dari segi metodologi, model haiwan TBI seperti model kejatuhan pemberat boleh digunakan untuk mengkaji kesan rawatan HT terhadap kecederaan kepala tertutup yang dapat mereplikasi TBI dalam manusia secara lebih berkesan. Selain itu, analisis protein seperti ELISA boleh digandingkan dengan analisis ekspresi gen qPCR untuk melihat kolerasi antara ekspresi gen dan juga fungsinya melalui protein yang disintesis. Akhir sekali, ujian BrdU juga boleh digunakan dalam kajian yang lain untuk melihat keberkesanan rawatan HT dalam membantu proses neuroregenerasi.

## RUJUKAN

- Adhish, M. & Manjubala, I. 2023. Effectiveness of zebrafish models in understanding human diseases □ A review of models. *Heliyon* 9(3): e14557.
- Al Fazazi, S., Casuso, R.A., Aragón-Vela, J., Casals, C. & Huertas, J.R. 2018. Effects of hydroxytyrosol dose on the redox status of exercised rats: the role of hydroxytyrosol in exercise performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 15(1): 20.
- Alia, A.O. & Petrunich-Rutherford, M.L. 2019. Anxiety-like behavior and whole-body cortisol responses to components of energy drinks in zebrafish ( *Danio rerio* ). *PeerJ* 7: e7546.
- Altman, J. & Das, G.D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *Journal of Comparative Neurology* 124(3): 319□335.
- Arifin, W.N. & Zahiruddin, W.M. 2017. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 24(5): 101□105.
- Añon-Calles, D., Canut, L. & Visioli, F. 2013. Toxicological evaluation of pure hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology* 55: 498□504.
- Barbosa, J.S. & Ninkovic, J. 2016. Adult neural stem cell behavior underlying constitutive and restorative neurogenesis in zebrafish. *Neurogenesis* 3(1): e1148101.
- Batarfi, W.A., Yunus, M.H.M., Hamid, A.A., Lee, Y.T. & Maarof, M. 2024. Hydroxytyrosol: A Promising Therapeutic Agent for Mitigating Inflammation and Apoptosis. *Pharmaceutics* 16(12): 1504.
- Bender, C., Strassmann, S. & Golz, C. 2023. Oral Bioavailability and Metabolism of Hydroxytyrosol from Food Supplements. *Nutrients* 15(2): 325.
- Beppi, C., Penner, M., Straumann, D. & Bögli, S.Y. 2022. A non-invasive biomechanical model of mild TBI in larval zebrafish. *PLOS ONE* 17(5): e0268901.
- Buchner, D.A., Su, F., Yamaoka, J.S., Kamei, M., Shavit, J.A., Barthel, L.K., McGee, B., Amigo, J.D., Kim, S., Hanosh, A.W., Jagadeeswaran, P., Goldman, D., Lawson, N.D., Raymond, P.A., Weinstein, B.M., Ginsburg, D. & Lyons, S.E. 2007. pak2a mutations cause cerebral hemorrhage in redhead zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(35): 13996□14001.
- Burattini, S., Salucci, S., Baldassarri, V., Accorsi, A., Piatti, E., Madrona, A., Espartero, J.L., Candiracci, M., Zappia, G. & Falcieri, E. 2013. Anti-apoptotic activity of hydroxytyrosol and hydroxytyrosyl laurate. *Food and Chemical Toxicology* 55: 248□256.



- Crilly, S., Njagic, A., Laurie, S.E., Fotiou, E., Hudson, G., Barrington, J., Webb, K., Young, H.L., Badrock, A.P., Hurlstone, A., Rivers-Auty, J., Parry-Jones, A.R., Allan, S.M. & Kasher, P.R. 2018. Using zebrafish larval models to study brain injury, locomotor and neuroinflammatory outcomes following intracerebral haemorrhage. *F1000Research* 7: 1617.
- Cui, A., Huang, T., Li, S., Ma, A., Pérez, J.L., Sander, C., Keskin, D.B., Wu, C.J., Fraenkel, E. & Hacohen, N. 2024. Dictionary of immune responses to cytokines at single-cell resolution. *Nature* 625(7994): 377–384.
- Delic, V., Beck, K.D., Pang, K.C.H. & Citron, B.A. 2020. Biological links between traumatic brain injury and Alzheimer's disease. *Communications* 8(1): 45.
- Deshetty, U.M. & Periyasamy, P. 2023. Potential Biomarkers in Experimental Animal Models for Traumatic Brain Injury. *Journal of Clinical Medicine* 12(12): 3923.
- Diotel, N., Lübke, L., Strähle, U. & Rastegar, S. 2020. Common and Distinct Features of Adult Neurogenesis and Regeneration in the Telencephalon of Zebrafish and Mammals. *Frontiers in Neuroscience* 14: 568930.
- Echevarria, D.J., Toms, C.N. & Jouandot, D.J. 2011. Alcohol-induced behavior change in zebrafish models. *revneuro* 22(1): 85–93.
- Elmaksoud, H.A.A., Motawea, M.H., Desoky, A.A., Elharrif, M.G. & Ibrahim, A. 2021. Hydroxytyrosol alleviate intestinal inflammation, oxidative stress and apoptosis resulted in ulcerative colitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 142: 112073.
- Fan, L., Peng, Y. & Li, X. 2023. Brain regional pharmacokinetics of hydroxytyrosol and its molecular mechanism against depression assessed by multi-omics approaches. *Phytomedicine* 112: 154712.
- Fernezelian, D., Rondeau, P., Gence, L. & Diotel, N. 2025. Telencephalic stab wound injury induces regenerative angiogenesis and neurogenesis in zebrafish: unveiling the role of vascular endothelial growth factor signaling and microglia. *Neural Regeneration Research* 20(10): 2938–2954.
- Fesharaki-Zadeh, A. 2022. Oxidative Stress in Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences* 23(21): 13000.
- Fesharaki-Zadeh, A. & Datta, D. 2024. An overview of preclinical models of traumatic brain injury (TBI): relevance to pathophysiological mechanisms. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 18: 1371213.
- Festing, M.F.W. & Altman, D.G. 2002. Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. *ILAR Journal* 43(4): 244–258.

- Fink, S.L. & Cookson, B.T. 2005. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity* 73(4): 1907–1916.
- Gan, D., Wu, S., Chen, B. & Zhang, J. 2020. Application of the Zebrafish Traumatic Brain Injury Model in Assessing Cerebral Inflammation. *Zebrafish* 17(2): 73–82.
- Garcia, J.M., Stillings, S.A., Leclerc, J.L., Phillips, H., Edwards, N.J., Robicsek, S.A., Hoh, B.L., Blackburn, S. & Doré, S. 2017. Role of Interleukin-10 in Acute Brain Injuries. *Frontiers in Neurology* 8: 244.
- Garlanda, C., Di Ceglie, I. & Jaillon, S. 2025. IL-1 family cytokines in inflammation and immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 22(11): 1345–1362.
- Gazerani, P. 2025. The neuroplastic brain: current breakthroughs and emerging frontiers. *Brain Research* 1858: 149643.
- Ghaddar, B., Lübke, L., Couret, D., Rastegar, S. & Diotel, N. 2021. Cellular Mechanisms Participating in Brain Repair of Adult Zebrafish and Mammals after Injury. *Cells* 10(2): 391.
- Gill, T., Locskai, L.F., Burton, A.H., Alyenbaawi, H., Wheeler, T., Burton, E.A. & Allison, W.T. 2024. Delivering Traumatic Brain Injury to Larval Zebrafish. Dlm. Amatruda, J. F., Houart, C., Kawakami, K., & Poss, K. D. (pnyt.). *Zebrafish*, hlm. 3–22. Springer US: New York, NY.
- Golla, A., Østby, H. & Kærmen, F. 2020. Chronic unpredictable stress induces anxiety-like behaviors in young zebrafish. *Scientific Reports* 10(1): 10339.
- Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I. & Brand, M. 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Developmental Biology* 295(1): 263–277.
- Guo, W., An, Y., Jiang, L., Geng, C. & Zhong, L. 2010. The protective effects of *Trichostema aegyptium* against *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Phytotherapy Research* 24(3): 352–359.
- Gupta, R. & Sen, N. 2016. Traumatic brain injury: a risk factor for neurodegenerative diseases. *Reviews in the Neurosciences* 27(1): 93–100.
- Hassan, R.Q.U., Tahir, M.M., Waheed, S., Naimat, S. & Ullah, M. 2024. The Critical Role of Phosphate Buffers in Cellular Function: From Homeostasis to Disease. *Biology Bulletin Reviews* 14(S3): S211–S218.
- Hay, J.R., Johnson, V.E., Young, A.M.H., Smith, D.H. & Stewart, W. 2015. Blood-Brain Barrier Disruption Is an Early Event That May Persist for Many Years After Traumatic Brain Injury in Humans: *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 74(12): 1147–1157.





Martini, S., Cavalchi, M., Conte, A. & Tagliazucchi, D. 2018. The paradoxical effect of extra-virgin olive oil on oxidative phenomena during in vitro co-digestion with meat. *Food Research International* 109: 82–90.

März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesl, B., Takamiya, M., Lam, C.S., et al. 2019. Subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia* 58(7): 870–888.

McCutcheon, V., Park, E., Liu, E., Wang, Y., Wen, X.-Y. & Baker, A.J. 2016. A Model of Excitotoxic Brain Injury in Larval Zebrafish: Potential Application for High-Throughput Drug Evaluation to Treat Traumatic Brain Injury. *Zebrafish* 13(3): 161–169.

Menon, D.K., Schwab, K., Wright, D.W. & Maas, A.I. 2010. Position Statement: Definition of Traumatic Brain Injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 91(11): 1637–1640.

Meyfroidt, G., Bouzat, P., Casaer, M.P., Chesnut, R., Hamada, S.R., Helbok, R., Hutchinson, P., Maas, A.I.R., Manley, G., Menon, D.K., Newcombe, V.F.J., Oddo, M., Robba, C., Shutter, L., Smith, M., Steyerberg, E.W., Stocchetti, N., Taccone, F.S., Wilson, L., Zanier, E.R. & Citerio, G. 2022. Management of moderate to severe traumatic brain injury: an update for the intensivist. *Intensive Care Medicine* 48(6): 649–666.

Miranda-Negrón, Y. & García-Arriarán, J.E. 2022. Radial glia and radial glia-like cells: Their role in neurogenesis and regeneration. *Frontiers in Neuroscience* 16: 1006037.

Morganti-Kossmann, M.C., Rancan, M., Stahel, P.F. & Kossmann, T. 2002. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Current Opinion in Critical Care* 8(2): 101–105.

Morganti-Kossmann, M.C., Yan, E. & Bye, N. 2010. Animal models of traumatic brain injury: Is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory? *Injury* 41: S10–S13.

Mustafa, A., Thörnqvist, P.-O., Roman, E. & Winberg, S. 2019. The aggressive spiegelanio, carrying a mutation in the fgfr1a gene, has no advantage in dyadic fights with zebrafish of the AB strain. *Behavioural Brain Research* 370: 111942.

Ng, S.Y. & Lee, A.Y.W. 2019. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13: 528.

Nichols, E., Schindler, H., Kapoor, N. & Ganti, L. 2025. Motor Vehicle Collision Associated TBI: Predictors of Injury severity. *Orthopedic Reviews* 17: 137678.

Ortí-Casañ, N., Wu, Y., Naudé, P.J.W., De Deyn, P.P., Zuhorn, I.S. & Eisel, U.L.M. 2019. Targeting TNFR2 as a Novel Disease. *Frontiers in Neuroscience* 13: 49.

- Palazzi, L., Leri, M., Cesaro, S., Stefani, M., Bucciantini, M. & Polverino De Laureto, S. 2018. Hydroxytyrosol inhibits alpha-synuclein aggregation by hydroxytyrosol. *Biochemical Pharmacology* 173: 113722.
- Pan, J. & Zhang, J. 2021. Research Progress of PCNA in Reproductive System Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2021: 1-8.
- Pavani, P., Kumar, K., Rani, A., Venkatesu, P. & Lee, M.-J. 2021. The influence of sodium phosphate buffer on the stability of various proteins: Insights into protein-buffer interactions. *Journal of Molecular Liquids* 331: 115753.
- Peng, S., Zhang, B., Yao, J., Duan, D. & Fang, J. 2015. Dual protection of hydroxytyrosol, an olive oil polyphenol, against oxidative damage in PC12 cells. *Food & Function* 6(6): 2091-2100.
- Pervez, M., Kitagawa, R.S. & Chang, T.R. 2018. Definition of Traumatic Brain Injury, Neurosurgery, Trauma Orthopedics, Neuroimaging, Psychology, and Psychiatry in Mild Traumatic Brain Injury. *Neuroimaging Clinics of North America* 28(1): 1-13.
- Pintos, S., Lucon-Xiccato, T., Vera, L.M. & Bertolucci, C. 2023. Daily rhythms in the behavioural stress response of the zebrafish *Danio rerio*. *Physiology & Behavior* 268: 114241.
- Postolache, T.T., Wadhawan, A., Can, A., Lowry, C.A., Woodbury, M., Makkar, H., Hoisington, A.J., Scott, A.J., Potocki, E., Benros, M.E. & Stiller, J.W. 2020. Inflammation in Traumatic Brain Injury. *Journal of Alzheimer's Disease* 74(1): 1-28.
- Purwa Samatra, D.P.G., Pratiwi, N.M.D. & Widyadharma, I.P.E. 2018. High IL-6 Serum as a Predictor of Decreased Cognitive Function in Mild Traumatic Brain Injury Patients. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 6(9): 1674-1677.
- Robles-Almazan, M., Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., Rodriguez-Garcia, C., Quiles, J.L. & Ramirez-Tortosa, M. 2018. Hydroxytyrosol: Bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Research International* 105: 654-667.
- Rodriguez, A., Zhang, H., Klaminder, J., Brodin, T., Andersson, P.L. & Andersson, M. 2018. *ToxTrac*: A fast and robust software for tracking organisms. *Methods in Ecology and Evolution* 9(3): 460-464.
- Rothenaigier, I., Krecsmarik, M., Hayes, J.A., Bahn, B., Lepier, A., Fortin, G., Götz, M., Jagasia, R. & Bally-Cuif, L. 2011. Clonal analysis by distinct viral vectors identifies bona fide neural stem cells in the adult zebrafish telencephalon and characterizes their division properties and fate. *Development* 138(8): 1459-1469.

Sakkas, A., Weiß, C., Wilde, F., Ebeling, M., Scheurer, M., Thiele, O.C., Mischkowski, R.A. & Pietzka, S. 2023. Justification of Indication for Cranial CT Imaging after Mild Traumatic Brain Injury According to the Current National Guidelines. *Diagnostics* 13(11): 1826.

Santurro, A., De Simone, M., Choucha, A., Morena, D., Consalvo, F., Romano, D., Terrasi, P., Corrivetti, F., Scrofani, R., Narciso, N., Amoroso, E., Cascella, M., Fineschi, V. & Iaconetta, G. 2025. Integrative Diagnostic and Prognostic Paradigms in Diffuse Axonal Injury: Insights from Clinical, Histopathological, Biomolecular, Radiological, and AI-Based Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* 26(16): 7808.

Schmidt, R., Beil, T., Strähle, U. & Rastegar, S. 2014. Stab Wound Injury of the Zebrafish Adult Telencephalon: A Method to Investigate Vertebrate Brain Neurogenesis and Regeneration. *Journal of Visualized Experiments*(90): 51753.

Sergeyenko, Y., Andreae, M.E. & Segal, M. 2025. Diagnosis and Management of Mild Traumatic Brain Injury (mTBI): A Comprehensive, Patient-centered Approach. *Current Pain and Headache Reports* 29(1): 19.

Shabani, Z., Mahmoudi, J., Farajdokht, F. & Sadigh-Eteghad, S. 2020. An Overview of Nicotinic Cholinergic System Signaling in Neurogenesis. *Archives of Medical Research* 51(4): 287-296.

Sharma, P., Gupta, S., Chaudhary, M., Mitra, S., Chawla, B., Khursheed, M.A., Saran, N.K. & Ramachandran, R. 2020. Biphasic Role of Tgf- $\beta$  in Müller Glia Reprogramming and Retinal Regeneration in Zebrafish. *iScience* 23(2): 100817.

Shinkai, T., Nakai, M., Takeshita, U., Morita, K. & Shimada, Y. 2025. Refinement of the novel tank diving test: toward standardized and robust analysis of anxiety-like behavior in zebrafish. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 19: 1624277.

Siracusa, R., Scuto, M., Fusco, R., Trovato, A., Ontario, M.L., Crea, R., Di Paola, R., Cuzzocrea, S. & Calabrese, V. 2020. Anti-inflammatory and Anti-oxidant Activity of Hidrox® in Rotenone-induced neurodegeneration in *Antioxidants* 9(9): 824.

Sirangelo, I., Borriello, M., Vilasi, S. & Iannuzzi, C. 2020. Hydroxytyrosol Inhibits Protein Oligomerization and Amyloid Aggregation in Human Insulin. *International Journal of Molecular Sciences* 21(13): 4636.

Skaggs, K., Goldman, D. & Parent, J.M. 2014. Excitotoxic brain injury in adult mice. *Neuroscience* 262(12): 2061-2079.

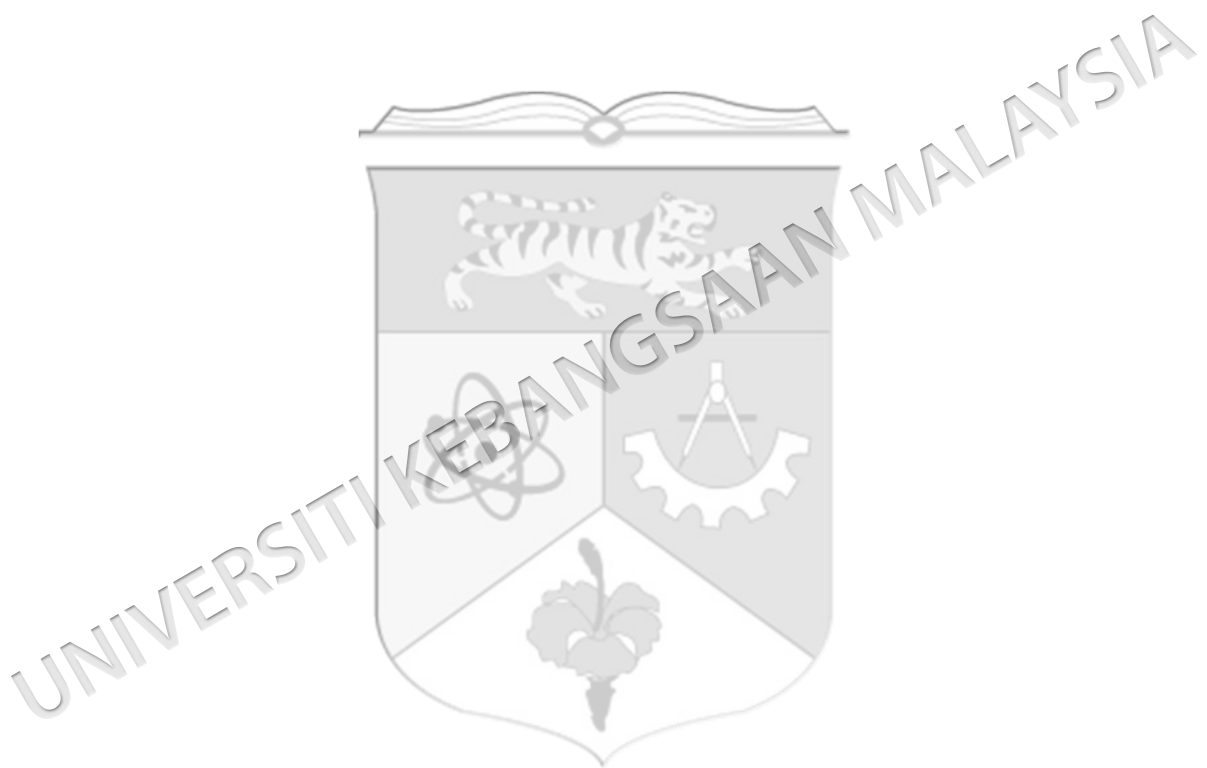
Sorby-Adams, A.J., Vink, R. & Turner, R.J. 2018. Large animal models of stroke and traumatic brain injury as translational tools. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 315(2): R165-R190.



- Wilson, M.H., Ashworth, E., Hutchinson, P.J., & On behalf of the British Neurotrauma Group. 2022. A proposed novel traumatic brain injury classification system – an overview and inter-rater reliability validation on behalf of the Society of British Neurological Surgeons. *British Journal of Neurosurgery* 36(5): 633–638.
- Wynd, B.M., Watson, C.J., Patil, K., Sanders, G.E. & Kwon, R.Y. 2017. A Dynamic Anesthesia System for Long-Term Imaging in Adult Zebrafish. *Zebrafish* 14(1): 1–7.
- Xiong, Y., Mahmood, A. & Chopp, M. 2013. Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience* 14(2): 128–142.
- Yan, J., Wang, C. & Sun, B. 2025. Global, regional, and national burdens of traumatic brain injury from 1990 to 2021. *Frontiers in Public Health* 13: 1556147.
- Yin, L., Xie, Y., Yin, S., Lv, X., Zhang, J., Gu, Z., Sun, H. & Liu, S. 2015. The S-Nitrosylation Status of PCNA Localized in Cytosol Impacts the Apoptotic Pathway in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *PLoS ONE* 10(2): e0117546.
- Zhang, G., Ferg, M., Lübke, L., Takamiya, M., Beil, T., Gourain, V., Diotel, N., Strähle, U. & Rastegar, S. 2020a. Bone morphogenetic protein signaling regulates Id1-mediated neural stem cell quiescence in the adult zebrafish brain via a phylogenetically conserved enhancer module. *Stem Cells* 38(7): 875–889.
- Zhang, L., Zhang, J., Jiang, X., Yang, L., Zhang, Q., Wang, B., Cui, L. & Wang, X. 2020b. Hydroxytyrosol Inhibits LPS-Induced Neuroinflammatory Responses via Suppression of TLR-4-Mediated NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Neuroscience* 426: 189–200.
- Zhang, M., Xie, J., Ma, Y., Wang, L., Liu, L., Zhang, P., Dai, Z., Zhang, Q. & Yin, W. 2025. TNF- $\alpha$  in the Brain Promotes Neuroinflammation and Inflammation via the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 82(1): 372.
- Zhang, S., Zhou, T., Wang, Z., Yi, F., Li, C., Guo, W., Xu, H., Cui, H., Dong, X., Liu, J., Song, X. & Cao, L. 2021. Post-Translational Modifications of PCNA in Control of DNA Synthesis and DNA Damage Tolerance-the Implications in Carcinogenesis. *International Journal of Biological Sciences* 17(14): 4047–4059.
- Zhao, X., Eyo, U.B., Murugan, M. & Wu, L. 2018. Microglial interactions with the neurovascular system in physiology and pathology. *Developmental Neurobiology* 78(6): 604–617.
- Zrelli, H., Matsuoka, M., Kitazaki, S., Araki, M., Kusunoki, M., Zarrouk, M. & Miyazaki, H. 2011. Hydroxytyrosol Induces Proliferation and Cytoprotection against Oxidative Injury in Vascular Endothelial Cells: Role of Nrf2 Activation and HO-1 Induction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(9): 4473–4482.



Zubair, H., Bhardwaj, A., Ahmad, A., Srivastava, S.K., Khan, M.A., Patel, G.K., Singh, S. & Singh, A.P. 2017. Hydroxytyrosol Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest and Suppresses Multiple Oncogenic Signaling Pathways in Prostate Cancer Cells. *Nutrition and Cancer* 69(6): 932-942.

Zulazmi, N.A., Arulsamy, A., Ali, I., Zainal Abidin, S.A., Othman, I. & Shaikh, research: A systematic review. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 27(4): 381-402.








## LAMPIRAN A

## SURAT KELULUSAN UNTUK MENJALANKAN KAJIAN

 <b>UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA</b> <i>The National University of Malaysia</i>	
<b>FAKULTI PERUBATAN • FACULTY OF MEDICINE</b>	
<b>Reference: UKM.FPR.SPI 800-2/28</b> <b>Date : 25 November 2024</b>	
<b>Associate Professor Dr Teoh Seong Lin</b> Department of Anatomy Faculty of Medicine, UKM	
Dear Professor/Datuk/Dato/Datin/Sir/Madam,	
	
<b>APPROVAL TO CONDUCT RESEARCH IN HOSPITAL CANSOLOR TUANKU MUHRIZ (HCTM)</b>	
Title :	Effect of Hydroxytyrosol Intervention on the Neuroregeneration Capacity of Zebrafish Brain Following Traumatic Brain Injury
Project Code :	FF-2024-463
With reference to the above, the Faculty of Medicine UKM and Hospital Cansolor Tuanku Muhriz (HCTM) has approved the above study based on the following information:	
Duration of Research :	<b>14 November 2024 – 13 November 2025</b>
Financial Support :	<b>RM 20,000.00 from Faculty of Medicine Fundamental Grants (GFFP) (Please refer Appendix 1 and 2)</b>
A Progress Report should be submitted through SMPU system every six (6) months from the date of approval and a Final Report within three (3) months after expiration of the study approval. Failure to submit the Final Report will affect the application of research and financial support in the future.	
The Secretariat reserves the right to withdraw the approved financial assistance if it is not spent within six (6) months from the date of approval. A show cause letter must be submitted to the Secretariat if the financial assistance is not spent according to the approved expenses.	
Application for additional budget should be submitted to the Secretariat within one (1) month before the expiration of approval. If the Principle Investigator leaves UKM, he/she must inform the Secretariat and name the replacement. Please visit our website ( <a href="https://www.ukm.my/spifper/forms/">https://www.ukm.my/spifper/forms/</a> ) for more information and guidelines.	
Please register the research at the National Medical Research Register ( <a href="http://www.nmrr.gov.my">www.nmrr.gov.my</a> ) if involved any use of infrastructure/organization/facility/staff/students/patients in the hospital/clinic/ organization under the Ministry of Health Malaysia. Researchers must also ensure that notification to the Ministry of Health is made if any results of this research project are to be published in a journal or presented at a conference.	

## LAMPIRAN B

## SURAT KELULUSAN JAWATANKUASA ETIKA HAIWAN

	<p align="center"><b>ANIMAL ETHICS COMMITTEE</b>  c/o Laboratory Animal Resource Unit  Faculty of Medicine, UKM  Jalan Temerloh, 53200 Kuala Lumpur  Tel: 92895086, 92895091, 92895087</p>	
<b>21<sup>th</sup> OCTOBER 2024</b>		
UKMAEC APPROVAL NUMBER:	FP/2024/ TEOH SEONG /02-OCT/1458-SEPT.-2024-AUG.-2025	
CHIEF INVESTIGATOR:	Prof Madya Dr Teoh Seong Lin	
DIVISION/DEPT. OF CHIEF INVESTIGATOR :	Fakulti Perubatan, UKM	
FUNDING INSTITUTION (S):	Fakulti Perubatan, UKM	
GRANT NUMBER (S):	-	
PROJECT TITLE:	Effect of Hydroxytyrosol Intervention on the Neuroregeneration Capacity of Zebrafish Brain Following Traumatic Brain Injury	
CO-INVESTIGATOR:	-	
STUDENT:	Hooi Yoong Khuen	
OTHER AUXILIARIES:	-	
PROJECT CLASSIFICATION:	-	
SOURCE OF ANIMALS:	Local aquarium	
HOUSING-LOCATION OF ANIMALS DURING PROJECT:	Zebrafish lab, level 9, Preclinical building, Faculty of Medicine, UKM	
ESTIMATED DURATION OF PROJECT:	From SEPT 2024 to AUG 2025	
 ----- Dr. Anisah Nordin Chairperson of UKMAEC Universiti Kebangsaan Malaysia		 ----- Muhamad Fakhri Mohd Saleh Secretary of UKMAEC Universiti Kebangsaan Malaysia

## LAMPIRAN C

## PEMBENTANGAN PERSIDANGAN



## LAMPIRAN D

## PENERBITAN

A036 | Zebrafish as animal model for traumatic brain injury: A scoping review

Hooi Yoong Khuen, Teoh Seong Lin\*  
 Department of Anatomy, Faculty of Medicine, National University of Malaysia, 18th Floor, Preclinical Building, Kuala Lumpur Campus, Yaacob Latif Road, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia.  
 \*teohseonglin@ukm.edu.my


**Introduction:** Traumatic brain injury (TBI) is the leading cause of disability worldwide, which poses a significant burden on families and the healthcare system. Until today, there is no single experimental animal model that can effectively mimic all aspects of human TBI as a result of the complexity of TBI pathophysiology. Zebrafish has recently emerged as a promising model for TBI research. This scoping review aims to explore the different types of zebrafish TBI models reported in the literature.

**Methods:** Three databases (PubMed, Scopus, and Web of Science) were searched from 2014 to 2024 using the following keywords: zebrafish, animal model, and traumatic brain injury. A total of 27 studies were included as relevant to this review.

**Results:** Out of the 27 studies, 11 studies use zebrafish larvae, meanwhile, 16 studies use adult zebrafish. The stab injury and weight drop models were identified as cost-effective approaches for inducing TBI in adult zebrafish. In contrast, blast injury, concussion, drug-induced TBI (such as atorvastatin and glutamate), and genetically modified zebrafish were applied to zebrafish larvae and these methods avoid the need for anaesthesia. Additionally, pulsed high-intensity focused ultrasound (pHIFU) and laser irradiation were identified as non-invasive methods for adult zebrafish but require complex experimental setup.

**Conclusion:** TBI remains a significant clinical challenge due to the irreversible damage of the neurons post-TBI. The unique capability of zebrafish brains to regenerate has prompted researchers to explore the mechanisms involved, with the hope that we can translate these findings into potential therapeutic strategies for humans.

**Keywords:** *Danio rerio*, animal model, neuroregeneration, brain



ASE Anatomical Sciences Education  
 Vol 18, #S2, October 2025

2025  
 8<sup>TH</sup> IASCBC  
 3<sup>RD</sup> MAAC  
 MALAYSIAN ANATOMICAL ASSOCIATION

**ANATOMY WITHOUT BOUNDARIES**  
 8<sup>th</sup> International Anatomical Sciences and Cell Biology Conference  
 3<sup>rd</sup> Malaysian Anatomical Association Conference

**Conference Abstracts**

Jason M. Organ  
 Editor-in-Chief

WILEY AMERICAN ASSOCIATION FOR ANATOMY