

Paparan Stresor Tidak Terprediksi Secara Kronis Meningkatkan Perilaku Depresi dan Rasio Neutrofil Limfosit Tikus

Chronic Unpredictable Stress Exposure Increases Depressive-Like Behavior and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Rats

Fajar Islam Sitanggang^{1*}, Elpita Tarigan², Sindi Farhana²

¹ Program Studi Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sumatera, Lampung Selatan, Indonesia

² iRATco Laboratory Services, Jawa Barat, Indonesia

INFO ARTIKEL

Submitted:
23 Desember 2025
Accepted:
10 Januari 2026
Publish Online:
29 Januari 2026

Kata Kunci:

Nest building, perilaku depresi, rasio neutrofil limfosit, spontaneous grooming, stres kronis tidak terprediksi

Keywords:

chronic unpredictable stress, depressive-like behavior, nest building, neutrophil lymphocyte ratio, spontaneous grooming

This is an open access article under the **CC BY-SA** license



Abstrak

Latar Belakang: Stres kronis telah diakui sebagai faktor penting pada gangguan depresi, Dampaknya tidak hanya pada aspek perilaku tetapi juga pada fungsi fisiologis. Paparan stres yang berlangsung lama dapat mengganggu regulasi emosi dan motivasi, memicu perubahan pada sistem imun membentuk kondisi inflamasi sistemik. Dalam konteks tersebut, penggunaan model hewan eksperimental menjadi pendekatan memahami perilaku depresi. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan menilai efek stres kronis tidak terprediksi terhadap perilaku menyerupai depresi dan inflamasi sistemik pada tikus melalui uji perilaku dan rasio neutrofil-limfosit. **Metode:** Penelitian ini menggunakan tikus jantan Sprague Dawley, yang dibagi ke dalam dua kelompok, yaitu kelompok kontrol normal dan kelompok tikus terpapar stres kronis. Metode paparan stress merupakan metode stress kronis yang dimodifikasi dari beberapa penelitian sebelumnya yaitu dari jumlah *stressor*. Kelompok stres dipaparkan empat jenis *stressor* secara acak satu kali setiap hari selama 28 hari untuk mencegah adaptasi terhadap stres. Perilaku menyerupai depresi dievaluasi melalui uji *nest building* dan uji *spontaneous grooming*, yang merefleksikan tingkat motivasi, perilaku perawatan diri, serta kondisi afektif hewan. Status inflamasi sistemik dinilai melalui pengukuran rasio neutrofil terhadap limfosit dari darah perifer. Analisis statistik dilakukan untuk membandingkan antara kelompok kontrol dan kelompok stres. Tikus kelompok stres juga menunjukkan peningkatan waktu latensi *grooming* ($p < 0,05$) disertai penurunan durasi *grooming* ($p < 0,01$), yang mencerminkan gangguan perilaku perawatan diri. **Hasil:** Paparan stres kronis tidak terprediksi menyebabkan gangguan perilaku yang nyata pada tikus. Tikus kelompok stres menunjukkan penurunan signifikan skor *nest building* dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,01$), yang mengindikasikan berkurangnya motivasi dan perilaku berorientasi tujuan. Tikus kelompok stres juga menunjukkan peningkatan waktu latensi *grooming* ($p < 0,05$) disertai penurunan durasi *grooming* ($p < 0,01$), yang mencerminkan gangguan perilaku perawatan diri. Selain itu, kelompok stres menunjukkan peningkatan signifikan rasio neutrofil terhadap limfosit dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,01$), yang menandakan aktivasi respons inflamasi sistemik akibat stres berkepanjangan. **Kesimpulan:** paparan stres kronis tidak terprediksi mampu menginduksi perubahan perilaku menyerupai depresi yang disertai dengan peningkatan marker inflamasi perifer pada tikus. Hasil ini memperkuat validitas model stres kronis sebagai pendekatan eksperimental untuk merepresentasikan keterkaitan antara disfungsi perilaku dan disregulasi imun yang berasosiasi dengan kondisi depresi.

Abstract

Background: Chronic stress has been recognized as a critical factor in the development of depressive disorders, exerting effects that extend beyond behavioral alterations to include profound physiological consequences. Prolonged stress exposure can disrupt emotional and motivational regulation while simultaneously inducing changes in immune function that contribute to systemic inflammatory states. Within this framework, experimental animal models provide an essential approach for examining depression-like behaviors and their associated biological responses. **Objective:** This study aimed to evaluate the effects of chronic unpredictable stress on depressive-like behavior and systemic inflammatory status in rats. **Method:** This study used male Sprague Dawley rats, which were divided into two groups: a normal control group and a chronic stress-exposed group. The stress exposure protocol was a modified chronic stress method adapted from several previous studies based on the number of stressors. The stress group was exposed to four different stressors applied randomly once daily for 28 days to prevent adaptation to stress. Depression-like behaviors were evaluated using the nest building test and the spontaneous

*grooming test, which reflect motivational level, self-care behavior, and the animals' affective state. Systemic inflammatory status was assessed by measuring the neutrophil-to-lymphocyte ratio in peripheral blood. Statistical analyses were performed to compare the control and stress groups. The stress group also exhibited a significant increase in grooming latency ($p < 0.05$) accompanied by a decrease in grooming duration ($p < 0.01$), indicating impaired self-care behavior. **Result:** Unpredictable chronic stress exposure induced marked behavioral disturbances in rats. The stress group exhibited a significant reduction in nest building scores compared with the control group ($p < 0.01$), indicating decreased motivation and goal-directed behavior. The stress group also showed a significant increase in grooming latency ($p < 0.05$) accompanied by a decrease in grooming duration ($p < 0.01$), reflecting impaired self-care behavior. In addition, the stress group demonstrated a significant increase in the neutrophil-to-lymphocyte ratio compared with the control group ($p < 0.01$), indicating activation of a systemic inflammatory response resulting from prolonged stress. **Conclusion:** These findings indicate that chronic unpredictable stress induces depression-like behavioral alterations accompanied by increased peripheral inflammatory markers in rats. The results support the validity of the chronic stress model as an experimental approach for representing the interaction between behavioral dysfunction and immune dysregulation associated with depressive conditions.*

✉ **Corresponding Author:**

Fajar Islam Sitanggang

Program Studi Biology, Institut Teknologi Sumatera, Lampung, Indonesia

Telp. 087882510209

Email: fajarisitanggang@gmail.com

PENDAHULUAN

Depresi merupakan gangguan psikiatri yang bersifat prevalen dan memengaruhi jutaan individu di seluruh dunia, yang berdampak pada penurunan kualitas hidup serta menimbulkan beban sosial yang signifikan (Strekalova et al., 2022). Kondisi ini seringkali ditandai dengan gejala seperti perasaan sedih berkepanjangan, penurunan minat atau kenikmatan, gangguan energi, serta perubahan kognitif dan fisiologis yang signifikan pada penderitanya. Perubahan pada sistem saraf pusat dan perifer yang terjadi akibat depresi merupakan gambaran mekanisme biologis kompleks yang belum sepenuhnya dipahami secara komprehensif (Rosetti et al., 2016). Stres kronis secara luas diakui sebagai faktor risiko utama terbentuknya depresi dan gangguan suasana hati lainnya (Strekalova et al., 2022), dengan bukti penelitian yang semakin berkembang baik pada manusia maupun hewan. Stres kronis pada manusia menunjukkan dampak merugikan yang signifikan terhadap proses perkembangan depresi (Cruz-Pereira et al., 2020). Studi menunjukkan bahwa stres kronis, terutama yang berlangsung dalam jangka waktu lama dan tidak dapat diprediksi, memainkan peran penting dalam memicu dan memperburuk gejala depresi melalui pengaruhnya pada sumbu stres neuroendokrin dan sistem imun. Stres yang berkepanjangan dapat memicu respons inflamasi yang berlangsung terus-menerus dan mengganggu regulasi neurokimia yang berhubungan dengan suasana hati, termasuk dopamin, serotonin, dan regulator stres lain yang dikenal terlibat dalam depresi (Rosetti et al., 2016). Pada manusia, paparan stres yang ekstrem atau berlangsung dalam jangka waktu lama telah terbukti menginduksi pola perilaku yang berasosiasi dengan depresi, seperti munculnya tanda-tanda keputusan, serta anhedonia (Gokul et al., 2019). Pada penelitian eksperimental menggunakan hewan model juga secara menunjukkan keterlibatan stres kronis sebagai faktor yang penting dalam membentuk anhedonia atau keadaan menyerupai depresi (Nollet, 2021, Song et al., 2021). Selain itu, penggunaan uji perilaku seperti *Forced Swim Test* (FST) dan *Tail Suspension Test* (TST), meskipun luas digunakan, semakin banyak dikritisi karena mengandalkan paparan stres akut tambahan yang bersifat invasif dan dapat menimbulkan artefak perilaku yang tidak sepenuhnya merefleksikan kondisi afektif basal hewan. Interpretasi imobilitas dalam FST dan TST sebagai “behavioral despair” juga masih diperdebatkan, karena dapat mencerminkan strategi koping pasif atau konservasi energi, bukan semata-mata keadaan depresi (Molendijk & de Kloet, 2015; Anyan & Amir, 2018). Sebaliknya, *nest building* dan *spontaneous grooming* merupakan perilaku spontan yang terjadi dalam konteks lingkungan alami hewan dan tidak memerlukan induksi stres tambahan, sehingga memiliki validitas etologis yang lebih tinggi dan relevansi translasi yang lebih baik terhadap gejala klinis seperti apati, anhedonia, dan gangguan

perawatan diri pada depresi manusia. Pendekatan ini juga sejalan dengan prinsip refinement dalam 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*), karena meminimalkan penderitaan hewan sekaligus memungkinkan evaluasi kondisi afektif secara longitudinal dan lebih sensitif terhadap dampak stres kronis (Gaskill & Garner, 2019; Deacon, 2012).

Salah satu aspek perilaku depresi yang sering diukur dalam penelitian hewan adalah anhedonia. Kondisi anhedonia menggambarkan adanya penurunan kemampuan untuk merasakan kenikmatan atau motivasi terhadap stimulus yang biasanya menyenangkan (Markov et al, 2022). Anhedonia sering digunakan sebagai indikator perilaku depresif pada model hewan karena hubungan kuatnya dengan perubahan fisiologis yang serupa dengan yang terlihat pada manusia dengan depresi (Ozkartal et al., 2018, Bijata et al., 2022). Paparan stres kronis dalam model hewan, seperti *Chronic Unpredictable Mild Stress* (CUS), telah terbukti secara konsisten mampu memicu fenotipe ini, termasuk pengurangan respons terhadap *reward*, penurunan motivasi eksploratif, dan gangguan dalam perilaku perawatan diri (Markov et al, 2022).

Model stres kronis tidak terprediksi telah dikembangkan sebagai alat eksperimen yang representatif untuk mempelajari keterkaitan antara stres, perubahan perilaku, dan patologi neurobiologis yang menyerupai depresi pada manusia. Model rodensia depresi dengan metode paparan stress kronis tidak terprediksi awalnya diajukan oleh Katz pada tahun 1982, dan terus mengalami perubahan dan modifikasi sepanjang waktu (Burstein et al., 2018, Nollet, 2021). Paradigma ini melibatkan paparan berulang terhadap berbagai stresor yang berbeda dengan tingkat invasifitas rendah, dipaparkan secara acak dan tidak terprediksi, sehingga hewan tidak dapat mengantisipasi atau mengatasi rangsangan tersebut (Wilner et al., 1992). Prosedur ini dirancang untuk meniru kondisi stres yang tidak terkendali dan tidak stabil yang biasa dialami individu dalam konteks kehidupan sehari-hari, yang diketahui memperburuk atau memicu gejala depresi pada manusia. Keunggulan CUS dibandingkan model stres akut adalah kemampuannya untuk menghasilkan perubahan perilaku dan fisiologis yang lebih kronis dan stabil, termasuk anhedonia dan gejala depresif lainnya (Burstein et al., 2018). Penggunaan metode paparan stres kronis ini telah menjadi bagian penting dari penelitian-penelitian terkait depresi dan perilaku anhedonia, bahkan penelitian yang bersifat terapi atau obat-obatan terkait.

Selain perubahan perilaku, stres berkepanjangan juga memicu respons imun perifer yang khas, termasuk munculnya inflamasi sistemik ringan yang kronis. Salah satu parameter yang telah banyak dipelajari sebagai indikator respons inflamasi perifer adalah rasio neutrofil-limfosit (NLR). NLR adalah rasio antar dua sub tipe sel darah putih yakni neutrofil dan limfosit, yang mencerminkan keseimbangan antara respons imun bawaan dan adaptif. Dalam konteks stres dan gangguan psikiatri seperti depresi, peningkatan NLR telah diobservasi menunjukkan adanya inflamasi sistemik yang berhubungan dengan kondisi tersebut. NLR disebut sebagai marker yang sederhana, mudah diukur, serta dapat mencerminkan status inflamasi secara lebih stabil daripada ukuran leukosit total tunggal (Swan et al., 2014, Hickman, 2017).

Meskipun peran stres kronis tidak terprediksi telah banyak digunakan sebagai model eksperimental depresi, masih terdapat keterbatasan pemahaman mengenai bagaimana paparan stres kronis mempengaruhi perilaku-perilaku spesifik yang merefleksikan motivasi dan perawatan diri, serta bagaimana perubahan perilaku tersebut berhubungan dengan respons inflamasi sistemik. Banyak penelitian sebelumnya menggunakan protokol stres kronis yang terdiri atas panel stresor yang relatif banyak, termasuk stresor invasif seperti air dingin, imobilisasi berkepanjangan, atau sengatan listrik ringan, yang meskipun efektif memicu gejala stres, juga menimbulkan tingkat mortalitas yang lebih tinggi dan potensi efek samping yang mempersulit interpretasi hasil, termasuk perubahan fisiologis yang bukan spesifik terhadap depresi (Willner, 1997, Monteiro et al., 2015, Bekhbat et al. 2018, Sequeira-Cordero et al., 2019, Nollet, 2021). Oleh karena itu, diperlukan pengembangan model stres kronis yang lebih terstandarisasi, non-invasif, dan mudah direplikasi untuk menilai gejala depresif serta parameter biologis secara konsisten. Penelitian ini mengadopsi pendekatan tersebut dengan menggunakan hanya empat stresor yang bersifat non-invasif dan tidak menyebabkan kematian pada hewan percobaan, sehingga memperkecil

variabilitas akibat trauma fisik sambil tetap menghasilkan perubahan perilaku yang relevan dengan fenotipe depresi.

Pemilihan parameter nest building dan spontaneous grooming dalam penelitian ini didasarkan pada pertimbangan validitas etologis dan relevansinya terhadap manifestasi depresi yang menyerupai kondisi klinis. Kedua parameter tersebut merupakan perilaku alami yang mencerminkan fungsi motivasional, perawatan diri, dan kesejahteraan hewan, sehingga penurunannya dapat menggambarkan gejala mirip depresi seperti anhedonia, apati, dan gangguan *self-care*. Berbeda dengan uji perilaku konvensional seperti *Forced Swim Test* (FST) dan *Tail Suspension Test* (TST) yang mengandalkan paparan stres akut dan masih menyisakan perdebatan interpretatif terkait konsep behavioral despair, nest building dan spontaneous grooming memungkinkan evaluasi kondisi afektif secara lebih basal tanpa induksi stres tambahan. Selain itu, kedua parameter ini terbukti sensitif terhadap stres kronis dan perubahan afektif, serta sejalan dengan prinsip kesejahteraan hewan, sehingga dinilai lebih tepat untuk menggambarkan gangguan perilaku yang relevan dalam model depresi yang digunakan pada penelitian ini. Secara khusus, masih terbatas penelitian yang secara simultan mengevaluasi perilaku menyerupai depresi melalui *parameter nest building* dan *spontaneous grooming* bersamaan dengan perubahan rasio neutrofil terhadap limfosit sebagai penanda inflamasi perifer akibat stres kronis. Oleh karena itu, penelitian ini dirancang untuk mengatasi permasalahan tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi efek paparan stres kronis tidak terprediksi terhadap perubahan perilaku menyerupai depresi dan status inflamasi sistemik pada tikus, serta memperkuat validitas model stres kronis sebagai pendekatan eksperimental dalam merepresentasikan keterkaitan antara disfungsi perilaku dan disregulasi imun yang berasosiasi dengan kondisi depresi.

METODE

Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *post-test only control group*, dengan metode rancangan acak lengkap (RAL). Penelitian ini dirancang sebagai penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mengevaluasi efek paparan stres kronis tidak terprediksi terhadap perubahan perilaku menyerupai depresi dan status inflamasi sistemik pada tikus. Desain yang digunakan adalah *post-test only control group design*, di mana subjek penelitian dibagi secara acak ke dalam dua kelompok, yaitu kelompok kontrol normal dan kelompok perlakuan (stres kronis), tanpa dilakukan pengukuran awal (*pre-test*). Seluruh variabel dependen, meliputi skor nest building, parameter *spontaneous grooming* (latensi dan durasi), serta rasio neutrofil terhadap limfosit, diukur hanya sekali pada akhir periode perlakuan selama 28 hari. Pendekatan ini dipilih untuk menghindari efek learning, habituasi, dan stres tambahan yang dapat muncul akibat pengukuran berulang, serta untuk memastikan bahwa perbedaan antar kelompok mencerminkan efek murni dari paparan stres kronis yang diberikan. Kepatuhan terhadap protokol kesejahteraan hewan yang disetujui komisi etik, penulis perlu mencantumkan secara eksplisit jenis anestesi yang digunakan selama prosedur invasif, termasuk dosis, rute pemberian, dan durasi efeknya, guna memastikan minimisasi nyeri, stres, serta meningkatkan transparansi dan replikabilitas penelitian.

Pengalokasian hewan percobaan ke dalam kelompok dilakukan menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL), di mana setiap tikus memiliki peluang yang sama untuk ditempatkan pada kelompok kontrol atau kelompok stres. Proses randomisasi ini bertujuan untuk meminimalkan bias seleksi dan mengontrol variabilitas biologis antar individu, sehingga setiap unit percobaan dianggap homogen pada awal penelitian.

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli-November 2025, di iRATco Laboratory Services, Bogor, Jawa Barat.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi hewan uji berupa tikus jantan Sprague Dawley dengan berat badan 180–190 gram, pakan standar hewan laboratorium, dan air minum steril, pewarna giemsa, EDTA. Alat yang digunakan berupa box container ukuran 47x68x41 cm, plastik restrain, *rotary shaker*, kandang tikus, pengering rambut, thermometer ruangan, tisu handuk, kandang hewan standar dengan ventilasi baik, timbangan digital tikus, sekam, *stopwatch*, serta kamera dan perekam video, mikroskop cahaya, pipet dan perlengkapan pengambilan darah perifer, serta alat tulis dan lembar pencatatan data. Seluruh alat yang digunakan telah dikalibrasi dan digunakan sesuai prosedur operasional standar laboratorium untuk memastikan keakuratan dan reproduibilitas data penelitian.

Pengelompokan dan Paparan Stres Kronis

Tikus diperoleh dari fasilitas pemeliharaan hewan laboratorium yang terstandar dan dinyatakan sehat secara klinis. Selama masa adaptasi dan penelitian, hewan dipelihara dalam kondisi lingkungan laboratorium yang terkontrol, meliputi suhu ruang stabil, siklus terang–gelap 12:12 jam, serta akses *ad libitum* terhadap pakan standar dan air minum. Setelah periode aklimatisasi, seluruh tikus diacak menggunakan rancangan acak lengkap ke dalam dua kelompok penelitian.

Kelompok pertama adalah kelompok kontrol normal, yang tidak menerima perlakuan stres dan dipelihara dalam kondisi standar laboratorium. Kelompok kedua adalah kelompok stres kronis tidak terprediksi, yang dipaparkan pada prosedur stres kronis sesuai dengan protokol penelitian. Masing-masing kelompok terdiri atas 10 ekor tikus, sehingga total hewan uji yang digunakan berjumlah 20 ekor. Kelompok stress menerima paparan empat stresor yang berbeda secara acak, satu kali dalam sehari, setiap hari sampai 28 hari. Paparan setiap stresor dirancang sedemikian rupa agar tidak ada stresor yang sama dilakukan dalam dua hari berturut-turut.

Stres guncangan. Sebanyak dua ekor tikus dimasukkan ke dalam kotak kandang terpisah dan dibiarkan adaptasi di ruang paparan selama 15 menit. Kotak kandang tersebut kemudian diletakkan di atas *rotary shaker* dan diguncang dengan putaran 110 RPM selama 60 menit. Stres berenang. Masing-masing tikus dimasukkan ke dalam kotak *container* berisi air setinggi 35 cm, kemudian ditutup dengan penutup berlubang. Tikus dibiarkan berenang selama 15 menit. Stres kekangan. Setiap tikus dibungkus dengan plastik restrainer berbentuk segitiga dengan lubang untuk hidung dan ekor saja. Plastik restrainer kemudian dikunci dengan penjepit hingga tikus tidak dapat bergerak selama 60 menit. Stres udara panas. Sebanyak 3 ekor tikus dimasukkan dalam kotak *container* yang sudah dimodifikasi dengan lubang input udara panas dari pengering rambut, dan disambungkan dengan *thermometer* ruangan. Udara panas dari pengering rambut diarahkan sedemikian rupa agar tidak mengarah langsung pada tikus, Rentang suhu dijaga pada tingkat non-noksious 45-50°C. Tikus diberikan udara panas selama 15 menit, serta tikus diamati secara kontinu untuk mendeteksi tanda distress, sehingga paparan panas tidak menyebabkan luka bakar maupun trauma termal berlebih.

Paparan stres udara panas dilakukan dengan memasukkan tiga ekor tikus ke dalam kotak *container* yang dimodifikasi dengan lubang input udara panas dari pengering rambut dan dilengkapi termometer ruangan digital yang ditempatkan pada beberapa titik di dalam kotak untuk memastikan distribusi suhu yang merata. Udara panas diarahkan secara tidak langsung dan disebarkan melalui deflektor sederhana sehingga aliran udara tidak mengarah langsung ke tubuh tikus, sementara jarak

sumber panas dan kecepatan aliran udara diatur untuk mempertahankan suhu pada rentang non-noksious 45–50°C. Stabilitas suhu di seluruh area kotak dipantau secara kontinu setiap 1–2 menit dan disesuaikan bila terjadi deviasi suhu lokal. Selama paparan 15 menit, tikus diamati terus-menerus untuk mendeteksi tanda distress, dan paparan segera dihentikan apabila suhu melebihi batas yang ditetapkan atau muncul tanda ketidaknyamanan berat, sehingga prosedur ini tidak menyebabkan luka bakar maupun trauma termal berlebih.

Asesmen Depresi (Perilaku Anhedonia)

Nest building test. Pada hari ke 27 pemaparan stress, masing-masing tikus ditempatkan pada kandang individu. Pada hari ke 28 pemaparan stress, setiap kandang tikus dimasukkan kapas murni berbentuk persegi panjang dengan ukuran 20x10 cm sebagai bahan pembuat sarang. Pada 24 jam kemudian, diperiksa kembali setiap kandang untuk menilai bangunan sarang yang dibuat oleh tikus. Setiap kandang kemudian difoto dan dilakukan skoring berdasarkan penggunaan kapas oleh tikus untuk membuat sarang. Skor 1 untuk kapas yang tidak digunakan sama sekali, skor 2 untuk kapas yang digunakan (disobek) tetapi tidak digunakan untuk membuat sarang, skor 3 untuk kapas yang digunakan untuk membuat sarang namun tidak lengkap, skor 4 untuk kapas yang digunakan membuat sarang yang lengkap (dengan dinding dan bentukan atap). Skor yang rendah menunjukkan perilaku anhedonia yang tinggi dan tingkat depresi yang tinggi. Skor akan dianalisis secara statistika dengan uji independent t-test, dilanjutkan dengan uji dampak dengan uji Cohen's d.

Spontaneous grooming test. Pada 24 jam setelah hari terakhir paparan stress, tikus dimasukkan ke ruang uji untuk adaptasi selama 15 menit. Masing-masing tikus kemudian dimasukkan ke dalam kotak uji. Disemprotkan larutan gula dengan viskositas tinggi pada bagian punggung masing-masing tikus, kemudian diamati perilakunya selama 8 menit. Perilaku tikus direkam dengan menggunakan perekam video dan dianalisis melalui video hasil rekaman. Parameter perilaku yang dinilai adalah waktu latensi *grooming* (jeda waktu dari penyemprotan hingga perilaku *grooming* pertama), dan durasi *grooming*. Waktu latensi *grooming* yang besar dan durasi *grooming* yang kecil menunjukkan tingginya perilaku anhedonia dan kondisi depresi. Skor akan dianalisis secara statistika dengan uji independent t-test, dilanjutkan dengan uji dampak dengan uji Cohen's d.

Rasio neutrofil limfosit. Pada 1 jam setelah paparan stress terakhir, darah tikus diambil melalui metode retro orbital. Sampel darah setiap tikus dibuat menjadi preparat apusan darah dengan pewarna giemsa, kemudian dihitung rasio neutrofil limfosit di bawah mikroskop. Skor akan dianalisis secara statistika dengan uji independent t-test, dilanjutkan dengan uji dampak dengan uji Cohen's d.

Analisis Data

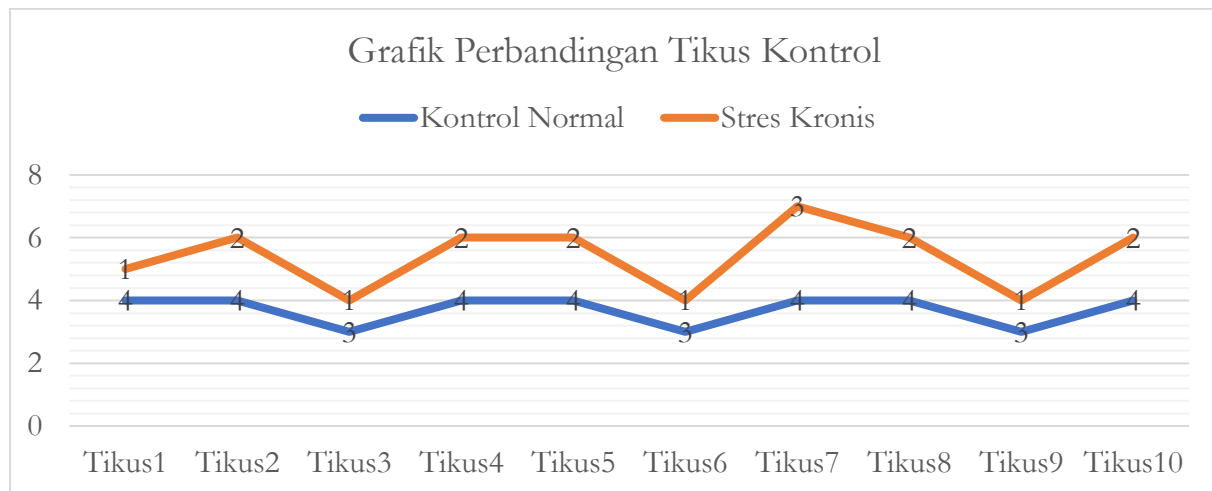
Data skor yang didapatkan dianalisis secara statistika dengan uji independent t-test, dilanjutkan dengan uji dampak dengan uji Cohen's d menggunakan aplikasi SPSS.

HASIL

Pemaparan keempat stresor selama 28 hari menunjukkan adanya perubahan perilaku keseharian yang tidak diukur secara kuantitatif pada tikus serta perubahan kondisi rambut tubuh pada tikus. Pada hari-hari terakhir paparan stresor, tikus menunjukkan respon perilaku yang semakin waspada, mudah panik dan menunjukkan perilaku cemas ketika didekati. Perubahan rambut tubuh di bagian kepala, tengkuk dan punggung secara umum terlihat sepanjang waktu paparan stresor, yakni semakin kusam, berantakan, kotor, semakin berkurang warna putihnya, dan membentuk kerucut-kerucut menggumpal.

Tabel 1. Skor Kapas yang Digunakan untuk *Nest Building Test*

Kelompok	Skor <i>Nest Building Test</i> per Tikus										Mean $\pm$ SD
	Tikus1	Tikus2	Tikus3	Tikus4	Tikus5	Tikus6	Tikus7	Tikus8	Tikus9	Tikus10	
Kontrol Normal	4	4	3	4	4	3	4	4	3	4	3.70 $\pm$ 0.48
Stres Kronis	1	2	1	2	2	1	3	2	1	2	1.70 $\pm$ 0.67

**Gambar 1.** Perbandingan Tikus Kontrol

Setelah 28 hari paparan stres kronis, tikus pada kelompok stres kronis menunjukkan penurunan signifikan pada perilaku *nest building* dibandingkan dengan kelompok kontrol normal. Skor *nest building* pada kelompok kontrol normal berada pada tingkat tinggi dan relatif homogen (mean $\pm$ SD: 3.70 $\pm$ 0.48), menggambarkan penggunaan kapas yang hampir selalu membentuk sarang yang lengkap. Sebaliknya, tikus yang dipaparkan stres kronis menunjukkan skor yang secara bermakna lebih rendah (1.70 $\pm$ 0.67), ditandai oleh kapas yang sebagian besar tidak digunakan atau hanya sedikit dimodifikasi. Analisis perbedaan antar kelompok menggunakan uji t independen menunjukkan bahwa penurunan skor nest building pada kelompok stres kronis sangat signifikan secara statistik ($t(18) = 7.66, p < 0.001$) (Tabel 1 dan Gambar 1). Selain signifikansi statistik, ukuran efek menunjukkan besarnya dampak stres kronis terhadap perilaku ini, dengan nilai Cohen's d sebesar 3.45 yang mengindikasikan efek yang sangat besar. Temuan ini menegaskan bahwa paparan stres kronis secara kuat mengganggu perilaku membangun sarang atau bersarang, yang berkaitan dengan motivasi dan kesejahteraan. Hal ini secara luas digunakan sebagai indikator fungsi afektif dan integritas sirkuit limbik pada model hewan.

Tabel 2. Skor Perilaku *Grooming* Spontan pada *Spontaneous Grooming Test*

Kelompok	Parameter	Tikus										Mean $\pm$ SD
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Kontrol Normal	Latensi (s)	18	22	20	25	19	21	23	17	24	20	20.9 $\pm$ 2.6
	Frekuensi (kali)	7	6	8	7	6	7	8	6	7	7	7.0 $\pm$ 0.7
	Durasi (s)	145	138	152	140	147	150	155	135	142	148	145.2 $\pm$ 6.6
Stres Kronis	Latensi (s)	52	60	55	63	58	57	61	54	59	56	57.5 $\pm$ 3.4
	Frekuensi (kali)	3	2	3	2	3	3	2	3	2	3	2.6 $\pm$ 0.5
	Durasi (s)	65	58	62	55	60	63	57	61	59	64	60.4 $\pm$ 3.1

Hasil *spontaneous grooming test* menunjukkan bahwa tikus yang terpapar stres kronis mengalami peningkatan latensi *grooming*, penurunan frekuensi, dan durasi *grooming* dibandingkan kontrol normal. Pola ini mencerminkan gangguan inisiasi dan pemeliharaan perilaku merawat diri yang merupakan karakteristik kondisi menyerupai depresi, bukan anhedonia berbasis reward.

Tabel 3. Skor Perilaku *Grooming* Spontan pada *Spontaneous Grooming Test*

Parameter	t (df = 18)	p-value	Cohen's d	Interpretasi Efek
Latensi (s)	-27.16	< 0.001	12.15	Efek sangat besar
Frekuensi (kali)	15.10	< 0.001	6.75	Efek sangat besar
Durasi (s)	37.43	< 0.001	16.74	Efek sangat besar

Uji *spontaneous grooming* menunjukkan adanya perubahan perilaku *grooming* yang signifikan pada tikus yang dipaparkan stres kronis dibandingkan dengan kelompok kontrol normal. Tikus pada kelompok stres kronis memperlihatkan peningkatan waktu latensi untuk memulai *grooming* setelah penyemprotan larutan gula kental, yang mengindikasikan penurunan inisiasi perilaku merawat diri. Selain itu, frekuensi episode *grooming* pada kelompok stres kronis lebih rendah dibandingkan kontrol normal, disertai dengan penurunan durasi total *grooming* selama periode observasi. Analisis statistik menggunakan uji t independen mengonfirmasi bahwa perbedaan antara kedua kelompok signifikan pada seluruh parameter *grooming* ($p < 0.001$). Besarnya perbedaan antar kelompok juga ditunjukkan oleh ukuran efek yang sangat besar, menegaskan bahwa stres kronis secara kuat mengganggu perilaku perawatan diri. Secara keseluruhan, pola peningkatan latensi disertai penurunan frekuensi dan durasi *grooming* mencerminkan gangguan motivasi dan penarikan perilaku yang khas pada kondisi menyerupai depresi.

Tabel 4. Rasio Neutrofil per Limfosit Tikus

Kelompok	Tiku s1	Tiku s2	Tiku s3	Tiku s4	Tiku s5	Tiku s6	Tiku s7	Tiku s8	Tiku s9	Tikus 10	Mean $\pm$ SD
Kontrol Normal	0.92	1.05	0.98	1.10	1.00	0.95	1.08	0.90	1.02	0.97	1.00 $\pm$ 0.07
Stres Kronis	1.65	1.80	1.72	1.90	1.78	1.85	1.92	1.70	1.88	1.75	1.80 $\pm$ 0.09

Analisis rasio neutrofil–limfosit (RNL) menunjukkan bahwa tikus yang dipaparkan stres kronis mengalami peningkatan RNL yang signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol normal. Kelompok stres kronis menunjukkan nilai RNL yang lebih tinggi dan relatif homogen, mengindikasikan adanya perubahan profil imun yang konsisten akibat paparan stres berkepanjangan. Uji t independen mengonfirmasi bahwa perbedaan RNL antara kedua kelompok signifikan secara statistik ($p < 0.001$), dengan ukuran efek yang sangat besar, menandakan dampak biologis yang kuat dari stres kronis terhadap respons imun perifer. Peningkatan RNL ini mencerminkan pergeseran keseimbangan antara kompartemen neutrofil dan limfosit, yang secara luas dikaitkan dengan aktivasi respons inflamasi sistemik pada kondisi stres kronis dan gangguan afektif.

PEMBAHASAN

Membangun sarang atau *nest building* merupakan perilaku *self-directed* bawaan yang secara etologis bersifat kuat terprogram pada tikus dan merupakan indikator penting dari kesejahteraan, motivasi, dan fungsi saraf tingkat tinggi dalam hewan rodensia. Perilaku ini bukan sekadar respon tikus terhadap materi sarang (dalam hal ini kapas) yang diberikan, namun juga merupakan perilaku yang melibatkan integrasi sensorik, motivasi, dan kebutuhan fisiologis untuk tidur, termoregulasi,

dan perlindungan terhadap lingkungan eksternal (Tagawa et al., 2025). Perilaku membangun sarang merupakan perilaku kompleks yang dipertahankan sepanjang evolusi. Hal ini menyebabkan keberadaan perubahan dalam kemampuan atau kecenderungan membangun sarang pada hewan rodensia termasuk tikus sering kali mencerminkan adanya gangguan pada domain perilaku yang berkaitan dengan motivasi, keadaan afektif, dan kesejahteraan umum (Neely et al., 2019). Literatur eksperimental yang telah dilaporkan menunjukkan bahwa pengurangan aktivitas pembangunan sarang, atau kurangnya kualitas hasil sarang yang dibuat berhubungan dengan kondisi patologis atau stres kronis yang mempengaruhi kesehatan dan perilaku dasar hewan. Penelitian pada tikus menunjukkan bahwa stres sosial atau paparan kronis terhadap stres menunda inisiasi serta kualitas nest building, yang diinterpretasikan sebagai gangguan terhadap motivasi dan kesehatan perilaku (Otabi et al., 2017).

Penurunan *skor nest building* diinterpretasikan sebagai gangguan motivasi dan afektif menyerupai depresi, kemungkinan kontribusi kelelahan fisik akibat stresor guncangan dan berenang perlu dipertimbangkan. Stresor fisik dapat menimbulkan kelelahan sementara yang berpotensi menurunkan aktivitas perilaku. Namun, pengukuran nest building dilakukan setelah paparan stres kronis 28 hari, sehingga efek kelelahan akut kemungkinan telah mereda. Selain itu, temuan paralel berupa gangguan *spontaneous grooming* dan peningkatan rasio neutrofil-limfosit menunjukkan perubahan sistemik yang konsisten dengan disfungsi afektif akibat stres berkepanjangan. Dengan demikian, penurunan skor nest building lebih merefleksikan gangguan motivasional dan afektif dibandingkan kelelahan fisik semata.

Hasil penelitian ini dengan jelas menunjukkan kelompok tikus yang diberikan paparan stresor tidak terprediksi secara kronis selama 28 hari mempengaruhi kondisi tikus dalam membuat sarang, yakni menurunkan keinginan membuat sarang dan menurunkan kualitas sarang yang terbentuk. Hal ini menggambarkan bahwa stress kronis yang diberikan dapat meningkatkan kondisi menyerupai depresi pada tikus. Hasil ini konsisten dengan temuan lain bahwa nesting behavior sangat sensitif terhadap tantangan fisiologis dan lingkungan, termasuk kondisi penyakit, nyeri, atau distress, sehingga perubahan skor nest building dapat menjadi indikator awal dari disfungsi perilaku pada model hewan (Gaskill et al., 2013).

Nollet (2021) melaporkan penelitian yang menjelaskan bahwa paparan *stress* kronis pada mencit menurunkan penggunaan bahan sarang dan kualitas sarang yang dibuat oleh mencit, sedangkan kelompok tikus yang dipaparkan stress dan diberikan obat anti depresi mengembalikan motivasi membangun sarang dan kualitas sarang yang dibuat oleh tikus stres mendekati kondisi tikus normal. Selain kesesuaian dengan penelitian sebelumnya, hasil penelitian ini relevan secara translasi karena nest building mirip dengan aktivitas keseharian pada manusia yang terganggu dalam gangguan *mood* seperti depresi, di mana motivasi dan fungsi perilaku dasar menurun secara nyata (Jirkof, 2014).

Penurunan skor *nest building* pada kelompok stres diinterpretasikan sebagai gangguan motivasi dan anhedonia, namun tidak dapat sepenuhnya dikesampingkan bahwa kelelahan fisik akibat paparan stresor seperti guncangan dan berenang turut berkontribusi terhadap penurunan performa tersebut. Meskipun demikian, evaluasi dilakukan setelah periode istirahat yang memadai dan stresor yang digunakan bersifat ringan serta tidak menimbulkan cedera fisik, sehingga kecil kemungkinan adanya gangguan motorik persisten. Selain itu, temuan ini konsisten dengan perubahan perilaku lain yang mencerminkan gangguan afektif, sehingga penurunan *nest building* lebih mungkin merefleksikan disfungsi motivasional daripada kelelahan fisik semata; namun demikian, penggunaan uji kontrol fungsi motorik pada penelitian selanjutnya tetap diperlukan

untuk memperkuat interpretasi ini.

Parameter *grooming* dalam konteks *spontaneous grooming test* dengan semprotan gula pekat juga mencerminkan perubahan perilaku mitovasional dan merawat diri. Abnormalitas pada perilaku *grooming*, yang ditandai dengan peningkatan latensi, penurunan frekuensi, dan durasi yang berkurang, telah diinterpretasikan sebagai bentuk perilaku menarik diri (mengabaikan diri) dan penurunan perhatian terhadap perawatan diri pada tikus yang mengalami stres kronis, yang paralel dengan komponen afektif dan motivasional yang terganggu akibat depresi (Bonorino et al., 2024). Kombinasi penurunan perilaku bersarang dan membangun sarang, serta penurunan perilaku *grooming* pada penelitian ini memperkuat bahwa tikus stres mengalami gangguan perilaku yang melibatkan disfungsi perawatan diri dan motivasi, bukan sekadar adaptasi sementara terhadap lingkungan baru, yang merupakan karakteristik penting dari kondisi menyerupai depresi pada tikus.

Secara fisiologis, gangguan perilaku ini berjalan bersamaan dengan perubahan sistemik pada kondisi imunitas. Perubahan ini diindikasikan oleh peningkatan rasio neutrofil–limfosit (NLR). NLR merupakan marker inflamasi perifer yang telah digunakan untuk mengevaluasi status stres kronis pada hewan coba, di mana tikus yang dipaparkan stres kronis menunjukkan peningkatan NLR dan perilaku distress dalam tes *elevated plus maze* dibandingkan tikus control control (Hickman, 2017). Hal ini mengkonfirmasi bahwa NLR mencerminkan stres kronis yang konsisten dengan persepsi kondisi stres dan depresi. Pada manusia, meta-analisis juga menunjukkan bahwa NLR yang lebih tinggi secara konsisten dikaitkan dengan risiko dan keparahan depresi mayor, menunjukkan relevansi biologis imunitas sistemik terhadap kondisi neuropsikiatrik seperti depresi (Cheng et al., 2017). Peningkatan NLR yang kami temukan dalam studi ini mendukung konsep bahwa stres kronis tidak hanya memengaruhi jalur *neurobehavioral* tetapi juga memicu perubahan inflamasi perifer yang berpotensi berkontribusi pada mekanisme neurinflamasi yang terkait dengan perkembangan depresi. Secara teori, peningkatan rasio (NLR) pada kondisi stres kronis dipahami sebagai refleksi dari redistribusi dan kesalahan regulasi sistem imun yang dipicu oleh aktivasi neuroendokrin jangka panjang.

Stres kronis mengaktifkan sumbu *hipotalamus–pituitari–adrenal* (HPA), yang meningkatkan pelepasan hormon stres seperti glukokortikoid dan katekolamin. Hormon-hormon ini mengubah perilaku sel imun dengan memobilisasi neutrofil ke sirkulasi darah serta menghambat proliferasi dan fungsi limfosit, sehingga secara neto meningkatkan proporsi neutrofil relatif terhadap limfosit dalam darah tepi (Balakin et al., 2025). Selain itu, respon terhadap stres kronis juga dikaitkan dengan peningkatan sitokin pro-inflamasi dan perubahan dalam jalur inflamasi yang memperkuat respons imun bawaan sementara menekan komponen imun adaptif, sehingga mendukung keadaan low-grade systemic inflammation yang tercermin oleh nilai NLR yang lebih tinggi pada individu atau hewan yang terpapar stres berkepanjangan. Dalam kerangka ini, nilai NLR bukan hanya indikator numerik distribusi leukosit, tetapi juga cerminan perubahan biologis mendasar dalam sistem imun yang berkaitan dengan paparan stres kronis dan potensi pengaruhnya terhadap pathophysiology gangguan afektif (Liu et al., 2017).

Secara keseluruhan, kombinasi penurunan perilaku nest building dan spontaneous grooming yang merefleksikan berkurangnya perilaku perawatan diri dan behavioral withdrawal, bersama dengan peningkatan rasio neutrofil–limfosit sebagai indikator inflamasi sistemik terkait stres, menunjukkan bahwa paparan stres kronis dalam penelitian ini berhasil menginduksi depression-like state yang melibatkan interaksi erat antara disfungsi sirkuit neuroperilaku dan aktivasi respons imun perifer.

KESIMPULAN DAN SARAN

Durasi 28 hari berada di rentang yang umum digunakan untuk memodelkan stres kronis pada tikus dan mampu menghasilkan perubahan perilaku maupun fisiologis signifikan. Namun tidak otomatis menjadi “batas optimal” permanen, karena efek perilaku bisa bertahan, mereda, atau berubah setelah stres dihentikan tergantung jenis parameter yang diukur dan perlu periode pemulihan (*recovery period*) untuk menilai keberlanjutan atau reversibilitas efek stres tersebut.

Penelitian ini menunjukkan bahwa Paparan stres kronis selama 28 hari mampu menginduksi perubahan perilaku dan respons fisiologis yang konsisten dengan kondisi depresi pada tikus. Hal ini ditunjukkan oleh penurunan kemampuan membangun sarang pada nest building test, peningkatan latensi serta penurunan frekuensi dan durasi *grooming* pada *spontaneous grooming test*, yang mencerminkan berkurangnya perilaku perawatan diri dan perilaku mengabaikan diri. Selain itu, peningkatan rasio neutrofil–limfosit mengindikasikan aktivasi respons inflamasi sistemik yang berkaitan dengan stres kronis. Secara keseluruhan, temuan ini mendukung bahwa kombinasi parameter perilaku dan biomarker imun perifer dapat digunakan secara komplementer untuk mengevaluasi dampak stres kronis terhadap fungsi neuroperilaku.

Penelitian selanjutnya disarankan untuk menambahkan pengukuran biomolekuler, seperti sitokin proinflamasi, hormon stres, atau penanda neuroplastisitas, guna memperkuat keterkaitan antara perubahan perilaku dan mekanisme neuroimun yang mendasarinya. Selain itu, penggunaan lebih dari satu model uji perilaku afektif, serta evaluasi lintas waktu (*time-course analysis*), dapat memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai dinamika perkembangan depression-like state akibat stres kronis. Pendekatan ini diharapkan dapat meningkatkan validitas translasi temuan ke konteks gangguan afektif pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Balakin, E., Yurku, K., Ivanov, M., Izotov, A., Nakhod, V., & Pustovoyt, V. (2025). Regulation of stress-induced immunosuppression in the context of neuroendocrine, cytokine, and cellular processes. *Biology*, 14(1), 76. <https://doi.org/10.3390/biology14010076>.
- Bekhat, M., & Neigh, G. N. (2018). Sex differences in the neuro-immune consequences of stress: Focus on depression and anxiety. *Brain, Behavior, and Immunity*, 67, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.02.006>.
- Bijata, M., Bączńska, E., & Włodarczyk, J. (2022). A chronic unpredictable stress protocol to model anhedonic and resilient behaviors in C57BL/6J mice. *STAR Protocols*, 3(3), 101659. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101659>.
- Bonorino, K. C., Kraus, S. I., Martins, G. H. C., Probst, J., Moeke, D. M. P., Sumar, A. H. D. S., Casal, Y. R., Oliveira, F. R. M. B., Sordi, R., Assreuy, J., Duarte da Silva, M., & Kunzler, D. C. H. (2024). Lung-brain crosstalk: Behavioral disorders and neuroinflammation in septic survivor mice. *Brain, Behavior, and Immunity - Health*, 40, 100823. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2024.100823>.
- Burstein, O., & Doron, R. (2018). The unpredictable chronic mild stress protocol for inducing anhedonia in mice. *Journal of Visualized Experiments*, (140), 58184. <https://doi.org/10.3791/58184>.
- Cheng, Y., Wang, Y., Wang, X., Jiang, Z., Zhu, L., & Fang, S. (2022). Neutrophil-to-lymphocyte ratio, platelet-to-lymphocyte ratio, and monocyte-to-lymphocyte ratio in depression: An updated systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Psychiatry*, 13, 893097. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.893097>.
- Cruz-Pereira, J. S., Rea, K., Nolan, Y. M., O'Leary, O. F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2020). Depression's unholy trinity: Dysregulated stress, immunity, and the microbiome. *Annual Review of Psychology*, 71, 49–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-122216-011613>.

- Gaskill, B. N., Karas, A. Z., Garner, J. P., & Pritchett-Corning, K. R. (2013). Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *Journal of Visualized Experiments*, (82), 51012. <https://doi.org/10.3791/51012>.
- Gokul, M., Kumar, N., Kini, R., Blossom, V., Kodavanji, B., Anupama, N., Murali, N., & Rai, S. (2019). Evaluation of biomarkers of stress in chronic stress-exposed comorbid depression model Wistar rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 30, Article 20180215. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2018-0215>.
- Hickman, D. L. (2017). Evaluation of the neutrophil:lymphocyte ratio as an indicator of chronic distress in the laboratory mouse. *Laboratory Animal*, 46(7), 303–307. <https://doi.org/10.1038/labam.1298>.
- Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 234, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001>.
- Liu, Y. Z., Wang, Y. X., & Jiang, C. L. (2017). Inflammation: The common pathway of stress-related diseases. *Frontiers in Human Neuroscience*, 11, 316. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00316>.
- Markov, D. D., & Novosadova, E. V. (2022). Chronic unpredictable mild stress model of depression: Possible sources of poor reproducibility and latent variables. *Biology*, 11(11), 1621. <https://doi.org/10.3390/biology11111621>.
- Monteiro S, Roque S, de Sá-Calçada D, Sousa N, Correia-Neves M, Cerqueira JJ. 2015. An efficient chronic unpredictable stress protocol to induce stress-related responses in C57BL/6 mice. *Frontiers in Psychiatry*, 6, Article 6. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00006>. PMID: 25698978. PMCID: PMC4313595.
- Neely, C. L. C., Pedemonte, K. A., Boggs, K. N., & Flinn, J. M. (2019). Nest building behavior as an early indicator of behavioral deficits in mice. *Journal of Visualized Experiments*, (152), 60139. <https://doi.org/10.3791/60139>.
- Nollet, M. (2021). Models of depression: Unpredictable chronic mild stress in mice. *Current Protocols*, 1(8), e208. <https://doi.org/10.1002/cpz1.208> pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.
- Otabi, H., Goto, T., Okayama, T., Kohari, D., & Toyoda, A. (2017). The acute social defeat stress and nest-building test paradigm: A potential new method to screen drugs for depressive-like symptoms. *Behavioural Processes*, 135, 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.12.003>.
- Ozkartal, C. S., Aricioglu, F., Tuzun, E., & Kucukali, C. İ. (2018). Chronic mild stress-induced anhedonia in rats is coupled with the upregulation of inflammasome sensors: A possible involvement of NLRP1. *Psychiatry and Clinical Psychopharmacology*, 28(3), 236–244. <https://doi.org/10.1080/24750573.2018.1426694>.
- Rossetti, A. C., Papp, M., Gruca, P., Paladini, M. S., Racagni, G., Riva, M. A., & Molteni, R. (2016). Stress-induced anhedonia is associated with the activation of the inflammatory system in the rat brain: Restorative effect of pharmacological intervention. *Pharmacological Research*, 103, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.10.022>.
- Sequeira-Cordero, A., Salas-Bastos, A., Fornaguera, J., & Brenes, J. C. (2019). Behavioural characterisation of chronic unpredictable stress based on ethologically relevant paradigms in rats. *Scientific Reports*, 9(1), 17403. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53624-1>.
- Song, J., & Kim, Y. K. (2021). Animal models for the study of depressive disorder. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 27(6), 633–642. <https://doi.org/10.1111/cns.13622>.
- Strekalova, T., Liu, Y., Kiselev, D., Khairuddin, S., Chiu, J. L. Y., Lam, J., Chan, Y. S., Pavlov, D., Proshin, A., Lesch, K. P., Anthony, D. C., & Lim, L. W. (2022). Chronic mild stress paradigm as a rat model of depression: Facts, artifacts, and future perspectives. *Psychopharmacology*, 239(3), 663–693. <https://doi.org/10.1007/s00213-021-05982-w>.
- Swan, M. P., & Hickman, D. L. (2014). Evaluation of the neutrophil–lymphocyte ratio as a measure of distress in rats. *Laboratory Animal*, 43(8), 276–282. <https://doi.org/10.1038/labam.529>.

- Tagawa, N., Tsuneoka, Y., & Funato, H. (2025). Nest-building behavior in laboratory mice: Multifunctional roles and neural mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 178, 106377. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2025.106377>.
- Wang, L., Xu, Y., Jiang, M., Wang, M., Ji, M., Xie, X., & Sheng, H. (2025). Chronic stress induces depression-like behavior in rats through affecting brain mitochondrial function and inflammation. *Psychoneuroendocrinology*, 172, 107261. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2024.107261>
- Willner, P., Muscat, R., & Papp, M. (1992). Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16(4), 525–534. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80194-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80194-0).