

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tikus merupakan hewan yang sering digunakan sebagai model hewan coba dalam penelitian biomedis dan perilaku. Hal ini dikarenakan tikus memiliki beberapa keunggulan, seperti masa gestasi yang singkat, masa hidup relatif pendek, sifat yang jinak, serta latar belakang kesehatan dan genetika yang sudah diketahui. Secara umum, model hewan coba dapat diklasifikasikan menjadi dua, yaitu model hewan yang diinduksi secara spontan (genetik) dan model hewan yang diinduksi secara eksperimental (non-genetik) (Husna *et al.*, 2019). Salah satu penggunaan utama hewan laboratorium adalah untuk meneliti dampak stres terhadap fisiologi dan sistem neuroendokrin.

Stres merupakan respons tubuh terhadap berbagai stimulus eksternal maupun internal yang dikenal sebagai *fight or flight response*. Stresor dapat berupa faktor fisik, kimia, maupun psikologis yang mampu mengaktifkan sistem saraf simpatis dan respons adrenal. Namun, respons tubuh terhadap stres tidak selalu sama dan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti usia, jenis kelamin, serta kondisi fisiologis spesies. Selain itu, durasi stres juga berperan penting, di mana stres dapat bersifat akut (jangka pendek) atau kronis (jangka panjang) (Arief, 2011). Stres kronis diketahui berkontribusi terhadap gangguan homeostasis tubuh, termasuk pada sistem saraf, imun, endokrin, dan pencernaan, yang dapat memicu berbagai penyakit, termasuk sindrom metabolik (Hataul, 2018).

Salah satu sumber stres lingkungan yang sering terjadi adalah kebisingan. Kebisingan didefinisikan sebagai suara yang tidak diinginkan dan dapat berdampak negatif terhadap kesehatan manusia maupun hewan. Menurut WHO, polusi suara merupakan bentuk pencemaran lingkungan serius ketiga setelah polusi udara dan air. Kebisingan tidak hanya berdampak pada gangguan pendengaran, tetapi juga dapat menyebabkan gangguan psikologis seperti kecemasan, ketakutan, dan ketakutan. Dampak kebisingan terhadap kesehatan sangat bergantung pada intensitas, frekuensi, durasi, serta kompleksitas spektrum suara. Paparan kebisingan yang berkepanjangan dapat menyebabkan stres, peningkatan tekanan darah, sakit kepala, dan gangguan metabolisme (Dewanty dan Sudamarji, 2015).

Kebisingan merupakan stresor lingkungan kronis yang mampu menginduksi gangguan fisiologis dan struktural pada ginjal tikus. Paparan kebisingan intensitas tinggi (>90 dB selama 4 jam/hari) menyebabkan aktivasi respons stres melalui peningkatan sekresi hormon stres dari korteks adrenal. Aktivasi ini berdampak pada perubahan hemodinamika ginjal, termasuk vasokonstriksi pembuluh darah renal, yang selanjutnya menurunkan perfusi ginjal dan memicu stres oksidatif pada jaringan ginjal. Kondisi tersebut berkontribusi terhadap gangguan fungsi ginjal yang ditandai dengan peningkatan kadar kreatinin serum serta terjadinya perubahan histopatologis ginjal berupa atrofi glomerulus, kerusakan epitel tubulus proksimal yang ditandai dengan ruptur brush border, dilatasi tubulus distal, infiltrasi sel inflamasi, serta area perdarahan dan nekrosis fokal. Kebisingan tidak hanya berpengaruh pada sistem

pendengaran, tetapi juga bertindak sebagai stresor sistemik yang melalui mekanisme neuroendokrin dan oksidatif mampu menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi ginjal pada tikus (Shawer et al., 2016).

Dalam penelitian mengenai stres pada tikus, salah satu metode yang sering digunakan adalah stres imobilisasi (*restraint stress*). Stres ini merupakan bentuk stres yang menyerupai stres fisik dan psikologis. Stres imobilisasi telah terbukti mempengaruhi metabolisme dan sistem saraf melalui regulasi hormon, khususnya dalam aktivasi aksis hipotalamus-pituitary-adrenal (HPA) (Hataul, 2018). Efek dari stres imobilisasi meliputi hipertrofi kelenjar adrenal, ulserasi lambung, serta involusi *thymicolymphatic*. Stres ini merupakan kombinasi antara stresor fisik (ketidakmampuan bergerak) dan stresor psikologis (rasa terancam dan tidak nyaman) (Okatiranti, 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perubahan histopatologi pada ginjal dan kelenjar adrenal tikus Sprague Dawley yang diberikan perlakuan stres imobilisasi dan stres kebisingan, serta mengidentifikasi apakah paparan kedua jenis stres tersebut dapat menyebabkan perubahan patologis yang signifikan pada kedua organ tersebut. Respons stres pada tikus tidak hanya dapat diamati melalui perubahan struktural jaringan ginjal dan kelenjar adrenal, tetapi juga melalui perubahan parameter hematologi, khususnya rasio neutrofil terhadap limfosit (N/L). Rasio N/L merupakan indikator stres sistemik yang mencerminkan aktivasi aksis hipotalamus-hipofisis-adrenal dan perubahan respons imun akibat peningkatan sekresi glukokortikoid. Parameter ini telah banyak digunakan sebagai penanda stres akut maupun kronis pada hewan laboratorium karena bersifat sensitif dan relatif mudah diukur, sehingga dapat memberikan gambaran awal mengenai tingkat stres fisiologis yang dialami hewan coba. Dengan demikian, hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan yang lebih komprehensif mengenai dampak stres lingkungan terhadap sistem fisiologis dan endokrin, serta menjadi dasar bagi pengembangan penelitian selanjutnya terkait efek stres terhadap kesehatan hewan.

1.2 Teori

1.2.1 Taksonomi

Tikus *Sprague Dawley* merupakan strain tikus yang banyak digunakan dalam penelitian biomedis karena karakteristiknya yang mendukung berbagai jenis studi. Tikus *Sprague Dawley* memiliki tubuh yang lebih besar dengan berat badan maksimum, menjadikannya pilihan yang sesuai untuk penelitian yang membutuhkan volume sampel besar, seperti studi farmakologi dan toksikologi kimia. Selain itu, tikus *Sprague Dawley* memiliki insiden penyakit ginjal progresif kronis (*chronic progressive nephropathy*, CPN) yang lebih tinggi, yang dapat memengaruhi hasil penelitian tertentu.

Pemilihan tikus *Sprague Dawley* dalam penelitian ini didasarkan pada karakteristiknya yang cocok untuk mengevaluasi efek perlakuan stres imobilisasi dan kebisingan pada jaringan ginjal dan kelenjar adrenal, terutama karena ukuran tubuhnya yang mendukung pengambilan sampel jaringan secara optimal (Weber et al., 2011). Tikus *Sprague Dawley* merupakan galur yang banyak digunakan dalam

penelitian dengan pertimbangan perkembangbiakannya yang cepat, temperamennya yang tenang dan relatif mudah penanganannya. Tikus *Sprague-Dawley* dapat mencapai usia hingga 3,5 tahun, berat badan tikus dewasa berkisar 250–300 g untuk betina dan 450–520 g untuk tikus jantan (Rosidah *et al.*, 2020).



Gambar 1.1 Tikus Spraguen dawley (Rosidah *et al.*, 2020).

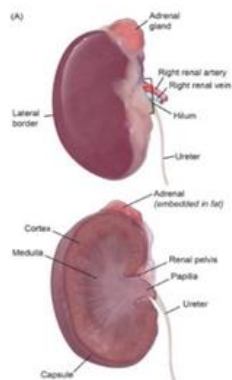
Menurut Wati *et al.* (2014), tikus Sprangue Dawley diklasifikasi sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Class	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Sub Famili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus Norvegicus</i>
Galur/Strain	: <i>Spraguen Dawley</i>

1.2.2 Ginjal

Ginjal pada hewan pengerat terletak secara retroperitoneal dan umumnya diselubungi oleh jaringan adiposa putih, dengan keberadaan kantong jaringan adiposa cokelat di sekitar pelvis renalis dan terkadang mengelilingi kapsul ginjal. Kedua ginjal berada di bagian dorsal abdomen tengah, sejajar dengan vertebra lumbalis. Secara anatomis, ginjal kanan terletak lebih kranial dan berdekatan dengan lobus kanan hati, sedangkan ginjal kiri berada sedikit lebih kaudal akibat pergeseran posisi oleh organ hati. Ginjal hewan pengerat bersifat unilobar atau unipiramidal, ditandai dengan keberadaan satu papila renalis yang memanjang langsung ke dalam pelvis renalis. Struktur internal ginjal terdiri atas korteks dan medula yang tersusun jelas; korteks memiliki labirin kortikal berbentuk kerucut yang berisi korpuskulus renalis serta tubulus kontortus, dan sinar medula yang memanjang dari medula luar menuju korteks. Medula sendiri terbagi menjadi medula luar (lapisan luar dan dalam) serta medula dalam, yang berakhir pada papila renalis. Papila ini menonjol ke dalam pelvis renalis dan berlanjut ke ureter sebagai jalur pengeluaran urin. Susunan

anatomi tersebut mencerminkan organisasi struktural ginjal hewan pengerat yang relatif sederhana dibandingkan ginjal multilobar pada spesies lain (Treuting et al., 2018).

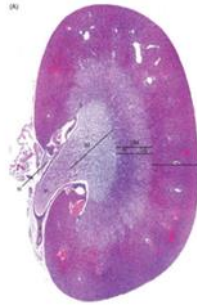


Gambar 1.2 Ginjal tikus (Treuting et al., 2018)

Ginjal unilobar pada tikus memiliki permukaan kapsular yang halus dan berbentuk pipih secara *dorsoventral*. Hilus yang terletak di bagian medial ginjal mengandung pembuluh darah, saraf, dan ureter. Papila medula tunggal memanjang jauh ke dalam *pelvis renalis*, yang sering kali berisi jaringan adiposa putih dan cokelat. Pada potongan melintang atau longitudinal, korteks ginjal tampak berupa labirin kortikal berbentuk kerucut dan sinar medula yang memanjang dari medula luar, yang terbagi menjadi dua lapisan: lapisan luar dan lapisan dalam. Papila merupakan bagian terdalam dari medula. Ureter yang kecil terletak di ruang *retroperitoneal*, berada di dorsal saluran reproduksi dan kandung kemih. Ureter masuk secara miring ke dalam *trigone* kandung kemih (Treuting et al., 2018).

1.2.3 Histologi Ginjal Tikus

Struktur ginjal, khususnya Lengkung Henle, memiliki bentuk khas menyerupai huruf U dan terdiri dari beberapa bagian, yaitu: ruas tebal *descenden* yang menyerupai tubulus kontortus proksimal, ruas tipis *descenden*, ruas tipis *ascenden*, dan ruas tebal *ascenden* yang menyerupai tubulus kontortus distal. Sekitar satu dari tujuh nefron terletak di dekat batas korteks-medula, disebut sebagai nefron jukstamedula, sementara sisanya disebut nefron kortikal. Semua jenis nefron berperan dalam proses filtrasi, absorpsi, dan sekresi. Ruas *ascenden* dari Lengkung Henle yang menembus korteks akan mengalami perubahan menjadi tubulus kontortus distal, yang merupakan bagian akhir dari nefron. Bagian ini dilapisi epitel selapis kuboid. Pada korteks ginjal, tubulus kontortus proksimal dan distal memiliki epitel kuboid, namun keduanya memiliki perbedaan histologis. Sel-sel pada tubulus kontortus proksimal cenderung lebih besar, memiliki *brush border* (batas sikat) yang khas, dan lebih asidofil karena kandungan mitokondria yang tinggi. Sebaliknya, lumen tubulus kontortus distal lebih besar, dengan sel-sel yang lebih kecil dan pendek, sehingga pada potongan histologis terlihat lebih banyak sel dengan inti lebih padat. Sel-sel tubulus distal juga kurang asidofil dibandingkan dengan tubulus proksimal dan tidak memiliki brush border atau mikrovili yang melimpah (Al-Samawy et al., 2012).

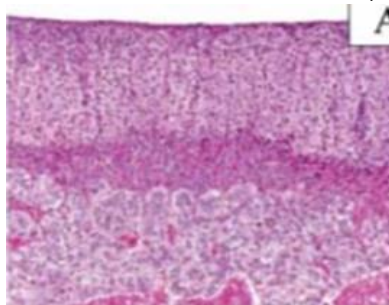


Gambar 1.3 Histologi ginjal tikus (Treuting et al., 2018).

Pada korteks ginjal, tubulus kontortus proksimal dan distal memiliki epitel kuboid, namun keduanya memiliki perbedaan histologis. Sel-sel pada tubulus kontortus proksimal cenderung lebih besar, memiliki *brush border* yang khas, dan lebih asidofil karena kandungan mitokondria yang tinggi. Sebaliknya, lumen tubulus kontortus distal lebih besar, dengan sel-sel yang lebih kecil dan pendek, sehingga pada potongan histologis terlihat lebih banyak sel dengan inti lebih padat. Sel-sel tubulus distal juga kurang asidofil dibandingkan dengan tubulus proksimal dan tidak memiliki *brush border* atau mikrovili yang melimpah (Al-Samawy et al., 2012).

1.2.3.2 Histologi Kelenjar Adrenal Tikus

Kelenjar adrenal merupakan organ endokrin yang terdiri dari dua bagian utama, yaitu korteks dan medula, dengan fungsi yang saling mendukung. Korteks adrenal terdiri dari tiga zona, yaitu zona glomerulosa, zona fasikulata, dan zona retikularis, yang masing-masing menghasilkan hormon dengan fungsi spesifik. Zona glomerulosa memproduksi mineralokortikoid, seperti aldosteron, yang berperan dalam pengaturan keseimbangan elektrolit dan tekanan darah (Rumlaklak et al., 2018).



Gambar 1.4 Histologi kelenjar adrenal tikus (Rumlaklak et al., 2018).

Pada gambar diatas tampak susunan jaringan yang terdiri atas korteks adrenal di bagian perifer dan medula adrenal di bagian sentral. Korteks adrenal tersusun atas sel-sel epitel endokrin yang terorganisasi dalam beberapa zona yang berbeda, sedangkan medula adrenal tersusun atas sel-sel kromafin yang tersusun lebih longgar dan tampak lebih pucat dibandingkan korteks. Korteks adrenal dapat dibedakan menjadi tiga zona utama, yaitu zona glomerulosa, zona fasikulata, dan zona retikularis. Zona glomerulosa merupakan lapisan terluar yang tersusun atas kelompok sel kecil berbentuk bulat atau oval yang tersusun tidak teratur. Di

bawahnya terdapat zona fasikulata yang merupakan lapisan tertebal, tersusun atas sel-sel besar berbentuk poligonal yang tersusun dalam berkas lurus memanjang, dengan sitoplasma eosinofilik pucat dan inti sel bulat yang terletak sentral. Lebih ke dalam, zona retikularis tersusun atas sel-sel yang lebih kecil dan lebih rapat, membentuk jaringan seperti jala dengan sitoplasma lebih gelap. Medula adrenal terletak di bagian tengah kelenjar dan tersusun atas sel-sel kromafin yang berkelompok di sekitar pembuluh darah sinusoidal yang relatif besar (Rumlaklak et al., 2018)

1.2.4 Immobilization Stress

Immobilisasi adalah keadaan hewan dalam kondisi tidak bergerak secara aktif sebagai akibat adanya gangguan pada organ tubuh baik fisik maupun mental. Kemampuan setiap individu dalam bergerak adalah salah satu kebutuhan dasar yang harus dipenuhi. Untuk memenuhi kebutuhan dasar tersebut dengan melakukan aktivitas berupa gerak yang teratur dan kontinue. Gerak tersebut dalam bentuk mobilisasi yang bertujuan memenuhi kebutuhan dasar dengan melakukan aktivitas dalam kehidupan sehari-hari dan mempertahankan diri dari trauma, konsep diri, mengekspresikan emosi dengan berbagai gerakan. Immobilisasi adalah suatu keadaan dimana seseorang mengalami keterbatasan gerak fisik. Sedangkan immobilisasi dapat berbentuk tirah baring yang bertujuan mengurangi aktivitas fisik dan kebutuhan oksigen tubuh, mengurangi nyeri, dan untuk mengembalikan kekuatan. Seseorang yang mengalami tirah baring akan kehilangan kekuatan otot rata-rata 3% sehari (*atropi disuse*) (Rohman, 2019).

Stres karena restriksi biasanya dilakukan dengan mengimobilisasi hewan dalam alat khusus untuk merangsang stres fisik dan psikologis. Metode ini sebaiknya tidak menimbulkan rasa sakit, sederhana, dan tidak memiliki efek jangka panjang yang melemahkan. Pendekatan ini merangsang sumbu hipotalamus-pituitari-adrenal (HPA), yang meningkatkan kadar kortikosteron sebagai hormon respons stres. Sebagian besar penelitian berfokus pada efek restriksi terhadap parameter otak. Diketahui bahwa stres restriksi dapat merusak penghalang darah-otak, mengubah tingkat penembakan neuron di area dopaminergik, mengganggu perkembangan refleksi neurologis, menyebabkan perbedaan neurokimia, mengurangi reseptor glukokortikoid, memodifikasi fungsi brain-derived neurotrophic factor (BDNF), mengubah konsentrasi glutamat, serta menyebabkan defisit memori (Reyhanditya et al., 2022). Metode yang telah di modifikasi pengkodisian stres pada hewan coba tikus yaitu dengan meletakkan hewan coba selama 4 jam pada kandang *immobilization stress* yang berbentuk seperti tabung dengan ukuran 30 cm x 10 cm dengan ventilasi yang terbatas (Ricart-Jane et al., 2002).

1.2.5 Noise Stress

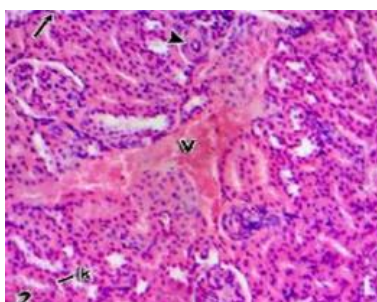
Kebisingan berasal dari istilah latin '*nausea*' dan telah didefinisikan sebagai suara yang tidak diinginkan, yang merupakan potensi bahaya bagi komunikasi serta kesehatan. Stres mengacu pada respons non-spesifik tubuh terhadap rangsangan yang tidak menyenangkan yang mengancam homeostatis dan integritas organisme.

Keadaan homeostatis yang terancam dipicu oleh stres psikologis, fisiologis dan lingkungan. Kebisingan sendiri diukur dalam satuan desibel (dB). Kebisingan dapat menyebabkan dampak buruk pada tubuh, yang dipicu oleh gangguan neurokimia dan hormon akibat stres. Respon tubuh terhadap kebisingan ini bisa mencakup perubahan perilaku, sistem otonom, neuroendokrin, atau imun. Biasanya, hal ini juga berkaitan dengan meningkatnya radikal bebas, yang memicu stres oksidatif (Isaac *et al.*, 2017).

Kebisingan digambarkan sebagai suara yang tidak diinginkan, baik kronis atau terputus-putus, dan dapat dijelaskan dalam istilah termasuk frekuensi, intensitas, spektrum frekuensi, dan bentuk tekanan suara dari waktu ke waktu. *Decibel* (dB) adalah satuan untuk mengukur intensitas suara. Pengaruh kebisingan terhadap perilaku dan produktivitas hewan dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti tingkat kebisingan (dB), frekuensi suara (Hz), durasi, pola, dan kemungkinan getaran. Selain itu, faktor biologis seperti kemampuan pendengaran spesies dan ras, usia, serta kondisi fisiologis hewan selama paparan juga memainkan peran penting (Broucek, 2014).

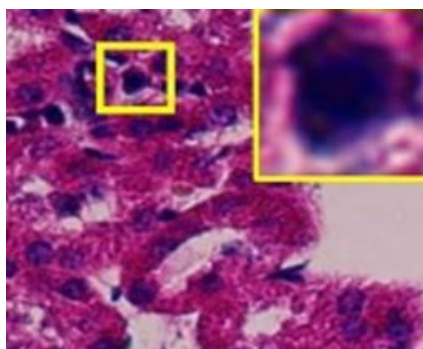
1.2.6 Pengaruh *Noise Stress* dan *Immobilization Stress* pada Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus

Paparan kebisingan memiliki dampak merusak pada jaringan ginjal, seperti yang ditunjukkan oleh berbagai perubahan histopatologi. Glomerulus ginjal menunjukkan atrofi parah dengan banyak inti piknotik, menandakan degradasi seluler. Selain itu, sel-sel pada tubulus proksimal dan distal mengalami pewarnaan samar, disertai kerusakan *brush border* pada tubulus proksimal serta pelebaran lumen tubulus distal. Dinding arteri juga terlihat menebal secara signifikan, dengan struktur vena yang bercabang dan berlekuk. Perubahan ini diperburuk oleh peningkatan serat kolagen pada dinding tubulus distal, glomerulus, dan area sekitar tubulus proksimal, yang menunjukkan fibrosis dan hemoragi yang meluas. Distribusi polisakarida dalam jaringan ginjal juga berkurang drastis, mengganggu fungsi normal ginjal, sementara total protein menunjukkan distribusi yang tidak merata. Dampak ini diduga diakibatkan oleh stres oksidatif yang dipicu oleh paparan kebisingan, yang menyebabkan hipertrofi sel otot polos vaskular dan penebalan dinding arteri (Helal *et al.*, 2011).



Gambar 1.5 Pengaruh *Noise Stress* Pada Histopatologi Ginjal Tikus (Helal *et al.*, 2011).

Preparat jaringan ginjal tikus yang dipaparkan stres kebisingan menunjukkan adanya berbagai perubahan distrofik. Perubahan tersebut meliputi atrofi glomerulus yang berat disertai banyak inti piknotik, pewarnaan sel dan inti yang tampak samar pada tubulus kontortus proksimal dan distal, serta pelebaran lumen tubulus kontortus distal disertai kerusakan *brush border* pada tubulus proksimal. Selain itu, tampak perubahan vaskular berupa penebalan dinding arteri serta kongesti vena dengan dinding yang bercabang dan berlekuk (Helal et al., 2011).



Gambar 1.6 Pengaruh *Immobilization* Pada Histopatologi Ginjal Tikus (Reyhanditya et al., 2021).

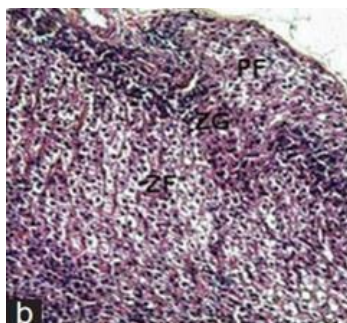
Pada tikus yang mengalami *restraint stress*, terdapat perubahan yang nyata pada histopatologi jaringan ginjal. Pemberian stres imobilisasi secara kronis menyebabkan peningkatan signifikan pada jumlah sel-sel nekrosis dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak mengalami perlakuan stres. Secara histologis, fase *piknosis* ditemukan lebih dominan dibandingkan fase *karioreksis* maupun *kariolisis*. Pada ginjal, fase *piknosis* ditandai dengan terjadinya kondensasi kromatin yang menyebabkan peningkatan densitas inti sel, merupakan tanda awal proses nekrosis. Selanjutnya, pada fase *karioreksis*, *kromatin* mengalami fragmentasi menjadi bagian-bagian kecil, menunjukkan tingkat lanjut dari cedera sel. Pada tahap akhir, yaitu fase *kariolisis*, terjadi hilangnya inti sel secara keseluruhan, menandai kerusakan struktural parah yang irreversibel pada jaringan ginjal (Reyhanditya et al., 2021).

Perubahan histopatologi ginjal pada stres akut ditandai oleh lesi ringan berupa degenerasi hidropik epitel tubulus dan kongesti vaskular tanpa disertai nekrosis atau kerusakan struktur jaringan yang luas, sehingga arsitektur ginjal masih terpelihara (Nwogueze et al., 2023). Sebaliknya, pada stres kronis ditemukan kerusakan yang lebih berat berupa nekrosis tubulus, pelebaran ruang *Bowman*, penyusutan glomerulus, serta infiltrasi sel radang interstisial yang menunjukkan cedera jaringan progresif (Sánchez et al., 2024). Pada kelenjar adrenal, stres akut umumnya hanya menyebabkan peningkatan aktivitas sekretorik tanpa perubahan morfologi permanen. Namun, paparan stres kronis menyebabkan hipertrofi zona fasikulata dan penebalan korteks adrenal sebagai respons terhadap stimulasi ACTH yang berkepanjangan (Ulrich-Lai et al., 2006). Temuan ini menunjukkan bahwa stres

akut bersifat reaktif dan reversibel, sedangkan stres kronis menimbulkan perubahan struktural adaptif hingga patologi pada organ target.

1.2.7 Pengaruh immobilization dan noise stress pada histopatologi Kelenjar Adrenal tikus

Paparan kebisingan dalam jangka waktu lama dapat menyebabkan perubahan pada struktur kelenjar adrenal. Tikus yang terpapar kebisingan 70 dB(A) selama 3 bulan mengalami perubahan susunan sel di zona glomerulosa dan zona fasciculata. Pada paparan 5 bulan, sel-sel di zona fasciculata mengalami kerusakan lebih parah, kehilangan bentuk normalnya, dan mengalami nekrosis (kematian sel). Selain itu, ketebalan zona korteks adrenal juga berubah akibat paparan kebisingan. Pada paparan 3 bulan, zona *reticularis* menjadi lebih tebal, tetapi zona glomerulosa dan *fasciculata* tetap hampir sama dengan kelompok kontrol. Namun, setelah paparan 5 bulan, zona glomerulosa dan *fasciculata* menjadi lebih tipis, sementara zona *reticularis* semakin menebal. Perubahan ini menunjukkan bahwa paparan kebisingan kronis menyebabkan stres pada kelenjar adrenal, yang dapat berdampak pada produksi hormon stres seperti kortisol. Jika terus berlanjut, hal ini dapat memengaruhi metabolisme dan sistem kekebalan tubuh (Gannouni *et al.*, 2014).

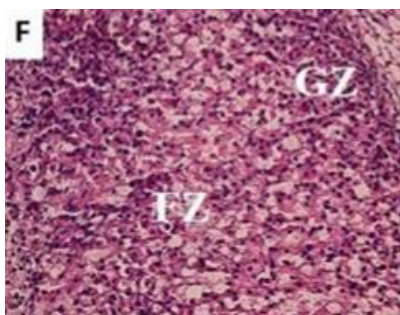


Gambar 1.7 Pengaruh *Noise Stress* Pada Histopatologi Kelenjar Adrenal Tikus (Gannouni *et al.*, 2014).

Pada korteks adrenal hewan yang dipaparkan kebisingan, ditemukan disorganisasi seluler pada zona glomerulosa dan zona fasikulata. Sel-sel pada zona glomerulosa kehilangan susunan khasnya dalam bentuk kelompok ovoid. Sebagian sel zona fasikulata menembus zona glomerulosa dan menyebabkan elevasi kapsula adrenal. Selain itu, sel-sel zona fasikulata tidak lagi tersusun dalam korda paralel, melainkan menunjukkan susunan yang tidak teratur. Lapisan pertama zona fasikulata memperlihatkan sel-sel kecil eosinofilik yang menyerupai sel zona glomerulosa, suatu gambaran yang tidak ditemukan pada kelompok kontrol (Gannouni *et al.*, 2014).

Paparan stres yang berulang pada tikus telah terbukti memberikan dampak yang signifikan terhadap struktur dan fungsi kelenjar adrenal, yang merupakan organ kunci dalam respons tubuh terhadap stres. Stres ini dapat memengaruhi kelenjar adrenal melalui perubahan histopatologi yang mencolok, yang mengarah pada penurunan jumlah sel normal serta peningkatan sel nekrotik. Secara lebih khusus,

perubahan ini terlihat dalam fase piknosis yang lebih dominan dibandingkan dengan fase karioreksis dan kariolisis. Piknosis adalah bentuk degenerasi sel di mana inti sel mengecil dan mengental, sementara karioreksis dan kariolisis adalah bentuk degenerasi lainnya yang melibatkan fragmentasi atau pelarutan inti sel. Keberadaan piknosis sebagai bentuk utama degenerasi menunjukkan bahwa sel-sel adrenal tersebut sedang mengalami kerusakan yang cukup berat, yang mengindikasikan adanya gangguan fungsional yang lebih lanjut pada kelenjar tersebut. (Reyhanditya *et al.*, 2021).



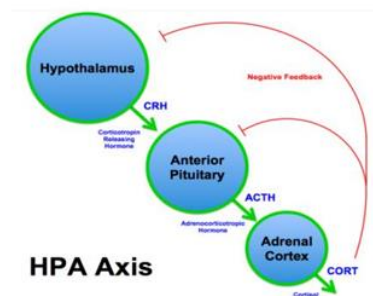
Gambar 1.8 Pengaruh *Immobilization* Pada Histopatologi Kelenjar Adrenal Tikus (Reyhanditya *et al.*, 2021).

Perubahan arsitektur histologis pada kelenjar adrenal juga sangat mencolok, dengan terganggunya pola zona glomerulosa dan zona fasikulata yang biasanya tersusun dengan rapi mengarah ke medula. Zona glomerulosa bertanggung jawab untuk produksi mineralokortikoid seperti aldosteron, sedangkan zona fasikulata memproduksi glukokortikoid seperti kortisol yang terlibat dalam respon tubuh terhadap stres. Gangguan pada pola arsitektur ini dapat mengindikasikan penurunan fungsi fisiologis kelenjar adrenal, sehingga memengaruhi kemampuan tubuh untuk beradaptasi dengan stres yang terjadi (Reyhanditya *et al.*, 2021).

1.2.8 Hormonal Kortisol

Kortisol merupakan hormon glukokortikoid utama yang disekresikan oleh korteks adrenal, terutama zona fasciculata, sebagai respons terhadap aktivasi aksis hipotalamus–pituitari–adrenal (HPA) akibat paparan stres. Stres fisik maupun lingkungan akan merangsang hipotalamus untuk melepaskan *corticotropin releasing hormone* (CRH), yang selanjutnya menstimulasi kelenjar hipofisis anterior untuk mensekresikan adrenocorticotrophic hormone (ACTH). ACTH kemudian memicu peningkatan sintesis dan sekresi kortisol oleh kelenjar adrenal. Selain berperan dalam pengaturan metabolisme, kortisol juga berkontribusi dalam mempertahankan homeostasis cairan tubuh dan mekanisme osmoregulasi. Kortisol memengaruhi fungsi ginjal melalui pengaturan hemodinamika renal serta modulasi proses reabsorpsi air dan elektrolit. Pada kondisi stres, peningkatan kadar kortisol dapat memengaruhi keseimbangan natrium dan air, baik secara langsung maupun melalui interaksinya dengan sistem hormonal lain yang terlibat dalam regulasi cairan tubuh. Ginjal sebagai organ utama osmoregulasi memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan cairan dan elektrolit tubuh. Aktivasi aksis HPA yang disertai

peningkatan sekresi kortisol berpotensi memengaruhi fungsi ginjal dalam proses filtrasi dan reabsorpsi. Apabila paparan stres berlangsung dalam jangka waktu lama, kondisi ini dapat menimbulkan perubahan fungsional yang berkaitan dengan mekanisme osmoregulasi tubuh. Dengan demikian, keterkaitan antara kortisol, kelenjar adrenal, dan ginjal menjadi dasar fisiologis penting dalam memahami dampak stres terhadap keseimbangan cairan tubuh (Yuliadi, 2021).



Gambar 1.9 Hipotalamus Pituitari Adrenal Aksis (Yuliadi, 2021).

Sebagaimana telah dijelaskan sebelumnya, kortisol berperan sebagai mediator hormonal dalam respons stres yang memengaruhi fungsi ginjal dan mekanisme osmoregulasi tubuh melalui aksis hipotalamus–pituitari–adrenal (HPA). Aktivasi aksis HPA dimulai ketika hipotalamus menerima rangsangan stresor dan mensekresikan *corticotropin releasing hormone* (CRH), yang selanjutnya merangsang hipofisis anterior untuk melepaskan *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH). ACTH kemudian menstimulasi korteks adrenal, khususnya zona fasciculata, untuk meningkatkan sintesis dan sekresi kortisol. Kortisol yang dilepaskan ke sirkulasi sistemik berperan dalam mempertahankan homeostasis tubuh, termasuk melalui pengaruhnya terhadap fungsi ginjal dalam regulasi keseimbangan cairan dan elektrolit. Peningkatan kadar kortisol pada kondisi stres dapat memengaruhi hemodinamika renal serta proses reabsorpsi air dan natrium, sehingga berkaitan dengan mekanisme osmoregulasi tubuh. Aksis HPA dikendalikan oleh mekanisme umpan balik negatif, di mana peningkatan kadar kortisol akan menghambat sekresi CRH dan ACTH untuk mencegah respons stres yang berlebihan. Namun, pada stres yang berlangsung kronis, mekanisme ini dapat mengalami gangguan sehingga sekresi kortisol tetap meningkat dan berpotensi memengaruhi fungsi adrenal dan ginjal (Yuliadi, 2021).

1.2.9. Rasio N/L

Darah merupakan komponen yang sangat penting karena berfungsi untuk mengedarkan substansi yang masuk ke dalam tubuh maupun yang dihasilkan tubuh dari proses-proses metabolisme. Nilai hematologi (profil darah) berguna untuk menilai kondisi kesehatan dan sebagai acuan nilai awal (*baseline*) atau kontrol dalam

suatu penelitian. Adanya gangguan metabolisme, penyakit, kerusakan struktur dan/atau fungsi organ, pengaruh agen/obat, dan stres dapat diketahui dari perubahan profil darah (Fitria dan Sarto, 2014).

Perbandingan jumlah neutrofil dan limfosit atau rasio N/L merupakan salah satu parameter hematologis yang banyak digunakan untuk menilai tingkat stres fisiologis pada hewan. Zulkifli et al. (2000) menjelaskan bahwa rasio ini dapat mencerminkan derajat stres yang dialami hewan dan dinilai sebagai indikator yang cukup andal. Hal tersebut diperkuat oleh Davis et al. (2014) yang menyatakan bahwa rasio N/L berpotensi menjadi parameter penting dalam mengevaluasi respons hewan terhadap stres, termasuk pada model penelitian menggunakan tikus. Secara umum, nilai normal rasio neutrofil terhadap limfosit (NLR) berada pada kisaran 1,0–2,0, dengan rentang referensi yang lazim digunakan antara 0,7–2,2. Nilai tersebut mencerminkan keseimbangan antara respons imun bawaan yang dimediasi oleh neutrofil dan respons imun adaptif yang diperankan oleh limfosit. NLR dianggap meningkat secara abnormal apabila melebihi 3,0, dan nilai di atas 5,0 sering dikaitkan dengan kondisi inflamasi berat, infeksi serius seperti sepsis, maupun penyakit keganasan dengan prognosis kurang baik. Sebaliknya, nilai NLR yang sangat rendah, yaitu di bawah 0,7, juga dinilai tidak normal karena dapat mengindikasikan gangguan atau supresi sistem imun. Rentang 2,3–3,0 sering disebut sebagai zona transisi atau "*gray area*" yang dapat menunjukkan adanya inflamasi ringan atau kondisi subklinis. Secara luas, NLR dimanfaatkan sebagai indikator respons imun terhadap stres, infeksi, dan inflamasi sistemik, serta sebagai parameter prognostik pada berbagai kondisi klinis (Roman, 2021).

BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober-Desember 2025 di fasilitas pemeliharaan hewan percobaan non-komersial yang berlokasi di Kecamatan Daya, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi Selatan. Fasilitas pemeliharaan memiliki kondisi lingkungan yang terkontrol, jauh dari aktivitas penduduk dan sumber kebisingan eksternal. Selanjutnya, kegiatan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Patologi Rumah Sakit Hewan Pendidikan serta Balai Besar Veteriner (BBVet) Maros.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, kandang imobilisasi, tempat makan tikus, wadah pembiusan, alat bedah minor, peralatan untuk pembuatan preparat histopatologi yaitu bak *paraffin*, *dissecting set*, botol flakon, gelas objek, gelas penutup, oven, pengeras suara, *rotary microtome*, *staining kit*, *base molt*, *holder*, cawan petri, pipet tetes, mikroskop cahaya, *micrometer* objektif dan *micrometer* okuler.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih 24 ekor, sarung tangan lateks, masker bedah, kapas *tissue*, bahan untuk pembuatan histopatologi menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS), *aquadest*, NaCl fisiologis, xylol bertingkat, alkohol bertingkat, PFA 4%, blok parafin, pewarna *Hematoxyline Eosin* (HE), alkohol 70%, alkohol 90% dan alkohol 95%.

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menerapkan metode eksperimental dengan melibatkan empat kelompok perlakuan. Evaluasi dilakukan pada hari ke-14 setelah pemberian perlakuan untuk menilai perubahan profil darah sebagai indikator stres atau gangguan imun, serta untuk mengamati perubahan histologi otak pada tikus Sprague Dawley. Rancangan penelitian ini disusun guna membandingkan perubahan histologis otak yang terjadi setelah paparan immobilization dan kebisingan.

Populasi penelitian terdiri atas tikus putih strain Sprague Dawley yang sehat dan memenuhi kriteria inklusi sebagai hewan coba. Penentuan sampel dilakukan menggunakan teknik simple random sampling, sehingga setiap individu memiliki kesempatan yang sama untuk terpilih sebagai sampel penelitian.

Alokasi sampel penelitian menggunakan *Simple Random Sampling*. Sampel ini di ambil dari populasi tikus putih dan besar sampel ditentukan dengan rumus Federer:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan:

n: jumlah sampel

t: jumlah kelompok/perlakuan

Dengan menggunakan rumus di atas, maka dapat diperoleh jumlah sampel perkelompok, yaitu:

$$\begin{aligned}(n-1)(t-1) &\geq 15 \\(n-1)(4-1) &\geq 15 \\(n-1)(3) &\geq 15 \\3n-3 &\geq 15 \\3n &\geq 15+3 \\3n &\geq 18 \\n &\geq 18:3 \\n &\geq 6\end{aligned}$$

Penelitian ini melibatkan 24 ekor tikus yang dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, dengan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus putih. Perlakuan dibagi menjadi 3 jenis, yaitu stres imobilisasi, stres bising dan gabungan imobilisasi dan bising.

2.4 Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Pemeliharaan Hewan Uji Coba

Sebelum percobaan dimulai, tikus-tikus menjalani proses adaptasi di dalam kandang selama 7 hari untuk menyesuaikan pola hidup dan makanannya. Setiap tikus ditempatkan secara terpisah di kandang individu. Kondisi kesehatan tikus dipantau setiap hari. Tikus-tikus ini diberi pakan diet standar serta akses air minum secara *ad libitum* di kandangnya masing-masing.

2.4.2 Uji Coba pada Hewan Percobaan

Penelitian ini menggunakan sprague dawley sebagai hewan coba karena cocok digunakan sebagai model penelitian. Tikus-tikus tersebut akan dibagi ke dalam empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol yang dipelihara tanpa perlakuan stres, kelompok stres imobilisasi yang ditempatkan dalam perangkat imobilisasi selama durasi tertentu setiap hari, kelompok stres bising yang dipaparkan pada suara dengan intensitas tertentu, dan kelompok kombinasi yang menerima perlakuan gabungan antara stres imobilisasi dan bising. Setelah perlakuan selesai, analisis histopatologi akan dilakukan untuk mengamati perubahan pada jaringan ginjal dan kelenjar adrenal, meliputi identifikasi sel nekrotik (fase piknosis, karioreksis, dan kariolisis) serta evaluasi perubahan arsitektur jaringan. Seluruh prosedur akan dilakukan sesuai dengan pedoman etika penelitian hewan coba, guna memastikan kesejahteraan hewan tetap terjaga selama penelitian berlangsung.

2.5.3 Induksi Noise Stress

Pemberian kebisingan dilakukan dengan menggunakan pengeras suara, dipasang pada jarak 30 cm di atas kandang, tingkat suara yang digunakan hingga 100 dB secara seragam di dalam kandang dan berlangsung selama 4 jam dalam sehari, 2 jam yang di mulai pukul (17.00-19.00) dan kemudian di istirahatkan selama 2 jam (19.00-21.00) kemudian di perlakukan stres kembali selama 2 jam (21.00-23.00) pemberian perlakuan ini dilakukan selama 14 hari.

2.5.4 Induksi *Immobilization*

Perlakuan stres imobilisasi pada tikus dilakukan dengan menempatkan hewan ke dalam kandang khusus berukuran 30 cm × 10 cm dengan ventilasi terbatas sehingga ruang gerak menjadi sangat terbatas. Perlakuan ini diberikan pada kelompok 1 dan kelompok 3. Paparan stres berlangsung selama total 4 jam per hari yang dibagi menjadi dua tahap, masing-masing selama 2 jam. Tahap pertama dilaksanakan pukul 17.00–19.00, kemudian tikus dipindahkan kembali ke kandang pemeliharaan untuk masa istirahat selama 2 jam (19.00–21.00). Selanjutnya, tahap kedua dilakukan pukul 21.00–23.00. Setelah seluruh rangkaian perlakuan selesai, tikus dikembalikan ke kandang besar untuk beristirahat hingga keesokan harinya. Prosedur imobilisasi ini dilakukan setiap hari secara berturut-turut selama 14 hari.

2.5.5 Pengambilan Darah dan Perhitungan Rasio N/L

pengambilan darah pada tikus sprague dawley dilakukan dengan cara retro orbital dimana sebelum dilakukan pengambilan darah, tikus dibius terlebih dahulu menggunakan eter. Pengambilan darah dilakukan menggunakan pipet hematokrit dengan menusukkan pipet pada sudut kemiringan 45°. Setelah ditusukkan biarkan darah mengalir lalu dikumpulkan dalam tabung mikrosentrifus yang berisi EDTA sebagai antikoagulan. volume darah yang diperoleh berkisar antara 100–200 µL, cukup untuk dilakukan pemeriksaan hematologi.

Penghitungan jumlah neutrofil dan limfosit dilakukan menggunakan alat *hematology analyzer*. Rasio neutrofil terhadap limfosit (N/L) dinyatakan dalam bentuk persen dan dihitung dengan membandingkan persentase neutrofil terhadap persentase limfosit berdasarkan hasil analisis darah yang diperoleh.

Tabel 1. Interpretasi Rasio Neutrofil terhadap Limfosit (N/L) dan Jenis Respons Stres

Nilai N/L	Kategori	Jenis Respons Stres
<0,7	Tidak normal	Supresi imun atau gangguan regulasi imun
0,7 – 2,0	Normal	Tidak ada stres bermakna
2,1 – 3,0	Zona abu-abu	Stres ringan / adaptif awal
3,1 – 7,0	Tidak normal	Stres akut atau kronis awal (inflamasi ringan-sedang)
7,1 – 11,0	Tidak normal	Stres kronis sedang
11,1 – 17,0	Tidak normal	Stres kronis berat
>17,0	Tidak normal (Kritis)	Stres kronis patologis atau suprapisiologis

Rasio neutrofil terhadap limfosit (N/L) merupakan salah satu parameter hematologis yang digunakan untuk menggambarkan keseimbangan respons imun serta tingkat stres fisiologis dan inflamasi sistemik. Nilai N/L dalam kisaran 0,7–2,0 umumnya mencerminkan kondisi fisiologis yang stabil dan sering digunakan sebagai nilai acuan, terutama pada kelompok kontrol. Nilai N/L antara 2,1–3,0 dapat diinterpretasikan sebagai kondisi transisional yang menunjukkan adanya respons stres ringan atau inflamasi tingkat rendah yang masih bersifat kompensatorik. Apabila nilai N/L meningkat pada kisaran 3,1–7,0, kondisi tersebut mengindikasikan aktivasi respons stres yang lebih jelas, baik akibat paparan stres akut maupun fase awal stres kronis. Peningkatan yang lebih tinggi dari rentang tersebut berkaitan dengan paparan stres berkepanjangan yang berpotensi menimbulkan gangguan fungsi jaringan. Sebaliknya, nilai N/L yang berada di bawah batas normal juga tidak dianggap fisiologis karena dapat mencerminkan adanya penurunan respons imun atau kondisi immunosupresi. Dengan demikian, interpretasi nilai N/L perlu mempertimbangkan rentang normal serta konteks klinis atau eksperimental yang menyertainya.

2.5.6 Pembuatan Preparat dan Pewarnaan Histologi

Proses pembuatan preparat histopatologi pada jaringan otak meliputi langkah-langkah fiksasi, dehidrasi, *clearing*, infiltrasi, *embedding*, *sectioning*, dan pewarnaan hematoxylin-eosin (HE). Jaringan difiksasi dalam *Buffer Neutral Formalin* (BNF) 10% selama 3 jam, dicuci dengan air mengalir, lalu didehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (70%-100%). *Clearing* dilakukan dengan xylol I dan II untuk menghilangkan alkohol. Selanjutnya, infiltrasi jaringan dilakukan dengan parafin cair pada suhu 57-59°C selama 1,5 jam, dilanjutkan dengan *embedding* dalam cetakan parafin hingga mengeras. Jaringan dipotong menggunakan mikrotom setebal 5 µm, direndam dalam *waterbath* bersuhu 50°C, ditempelkan ke kaca objek, dan diinkubasi di *hot plate* pada suhu 40°C selama 20 menit. Pewarnaan diawali dengan deparafinasi menggunakan xylol, direhidrasi melalui alkohol bertingkat, dan dicuci dengan air. Inti sel diwarnai dengan hematoxylin selama 7 menit, kemudian dicuci dan diwarnai eosin selama 30 detik. Preparat didehidrasi, melalui *clearing* dengan xylol, dan *dimounting* menggunakan balsam Canada untuk menjaga keawetan dan kejernihan preparat.

2.5.7 Pengamatan Preparat Histologi

Preparat diamati menggunakan mikroskop perbesaran 4x, 10x dan 40x dengan menilai perubahan histologi otak besar, otak kecil dan hipotalamus.

2.5.8 Parameter Evaluasi

Parameter evaluasi dalam penelitian ini meliputi analisis jumlah sel normal dan sel nekrotik pada jaringan ginjal dan kelenjar adrenal, termasuk fase piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Selain itu, perubahan arsitektur jaringan juga diamati, seperti gangguan pola zona pada kelenjar adrenal atau kerusakan tubulus pada ginjal. Keberadaan infiltrasi sel inflamasi akan dievaluasi sebagai indikasi

peradangan, sementara tingkat kerusakan vaskular pada jaringan juga dianalisis untuk menilai dampak stres terhadap pembuluh darah.

2.6 Analisis Data

Analisis data kualitatif dalam penelitian ini dilakukan melalui pengamatan morfologi dan perubahan histopatologi pada jaringan ginjal dan kelenjar adrenal secara mikroskopis. Fokus pengamatan mencakup keberadaan sel nekrotik, fase nekrosis (piknosis, karioreksis, kariolisis), serta kerusakan pada zona glomerulosa dan fasikulata di kelenjar adrenal atau deformasi tubulus ginjal. Hasilnya disajikan dalam bentuk deskripsi naratif dan gambar mikroskopis preparat jaringan, yang digunakan untuk menjelaskan dampak stres imobilisasi dan bising terhadap struktur seluler dan jaringan.