

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Hewan laboratorium atau hewan coba merupakan hewan yang sengaja dipelihara atau ditenakkan untuk mendukung kegiatan penelitian biologi. Salah satu hewan laboratorium yang paling banyak digunakan adalah tikus, karena memiliki kemiripan fisiologis dan patologis dengan manusia sehingga sering dimanfaatkan dalam pengujian sebelum diaplikasikan pada manusia. Ratusan jenis model tikus telah dikembangkan untuk menyerupai berbagai kondisi penyakit pada manusia (Intan dan Khariri, 2020). Salah satu strain yang sering digunakan adalah tikus Sprague dawley yang memiliki karakteristik albino putih, kepala kecil, serta ekor lebih panjang dari badan dan melengkung (Aisyah et al., 2023). Tikus Sprague Dawley banyak digunakan dalam penelitian praklinis, khususnya pada studi nyeri, ilmu saraf, fisiologi, dan farmakologi (Kristensen et al., 2017; Gileta et al., 2018), serta sering digunakan dalam penelitian stres karena menunjukkan respons aksis hipotalamus-hipofisis-adrenal (HPA) yang berbeda terhadap stres akut, berkepanjangan, dan berulang dibandingkan galur tikus lainnya (Dabhar et al., 1997).

Otak merupakan bagian dari sistem saraf pusat yang terletak di dalam cavum cranii dan berlanjut dengan medulla spinalis melalui foramen magnum. Secara anatomi, otak tikus terdiri atas dua bagian utama, yaitu cerebrum (otak besar) dan cerebellum (otak kecil). Cerebrum berperan dalam pengaturan pikiran, gerak, ingatan, kesadaran, pertimbangan, serta aktivitas mental lainnya, sedangkan cerebellum berfungsi dalam koordinasi gerakan dan pemeliharaan postur tubuh melalui integrasi sinyal sensorik dan motorik (Yustisia et al., 2020). Dengan fungsi yang sangat vital tersebut, perubahan struktural pada cerebrum maupun cerebellum dapat berdampak besar terhadap fungsi neurologis.

Stres merupakan respons biologis terhadap rangsangan yang mengganggu homeostasis tubuh, baik yang berasal dari faktor fisik maupun psikologis. Apabila stres berlangsung lama atau intensitasnya melebihi kemampuan adaptasi tubuh, maka dapat menimbulkan gangguan pada sistem saraf dan hormonal. Pada sistem saraf, stres memicu pelepasan hormon dan neurotransmiter sebagai respons adaptif terhadap stresor (Ron de Kloet, 2005). Stres kronis pada hewan diketahui dapat menurunkan status kesehatan, fungsi reproduksi, serta kemampuan belajar yang diperlukan untuk adaptasi lingkungan (Xue et al., 2009). Selain itu, stres kronis juga meningkatkan stres oksidatif yang dapat mengganggu keseimbangan prooksidan dan antioksidan, menyebabkan disfungsi mitokondria, gangguan metabolisme energi, kerusakan neuron, gangguan neurogenesis, serta menginduksi apoptosis sel saraf (Chung, 2010). Salah satu model stres fisik yang sering digunakan dalam penelitian adalah immobilization stress, yang terbukti mampu memicu respons stres sistemik dan kerusakan jaringan.

Selain stres fisik, kebisingan juga merupakan stresor lingkungan yang signifikan. Kerentanan terhadap kebisingan pada hewan bergantung pada spesies karena perbedaan spektrum dan sensitivitas pendengaran. Paparan kebisingan

dapat mengaktivasi hipotalamus dan hipofisis untuk merangsang korteks adrenal dan medula dalam melepaskan hormon stres, sehingga kebisingan dikategorikan sebagai pemicu stres potensial (Broucek, 2014). Paparan kebisingan yang tidak dapat dikendalikan, seperti pada lingkungan lalu lintas padat, menyebabkan individu menerima stresor secara pasif, yang terbukti memperberat aktivasi aksis HPA dan memengaruhi regulasi hormon stres oleh korteks prefrontal (Jafari et al., 2018). Stres akibat kebisingan juga menyebabkan peningkatan sekresi corticotropic releasing factor (CRF) di hipotalamus yang memicu pelepasan ACTH dan meningkatkan produksi glukokortikoid, terutama kortisol, dari korteks adrenal (Sumardiyono et al., 2019).

Meskipun berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa stres fisik maupun lingkungan dapat memengaruhi sistem saraf melalui mekanisme neuroendokrin dan stres oksidatif, sebagian besar penelitian masih berfokus pada perubahan hormonal dan perilaku, sementara bukti perubahan struktural jaringan otak secara histopatologis masih terbatas, khususnya pada cerebrum dan cerebellum secara bersamaan. Selain itu, penelitian yang mengkaji dampak stress immobilization dan kebisingan terhadap gambaran histopatologi otak pada tikus Sprague Dawley masih relatif sedikit. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah paparan stress immobilization dan kebisingan dapat menyebabkan kelainan pada organ otak, serta bagaimana gambaran histopatologi yang terjadi pada cerebrum dan cerebellum tikus Sprague dawley setelah pemberian perlakuan tersebut.

Berdasarkan uraian tersebut, maka secara implisit timbul pertanyaan apakah stress immobilization dan kebisingan mampu menimbulkan perubahan struktur jaringan otak, bagaimana bentuk perubahan histopatologi yang terjadi pada otak besar dan otak kecil. Dengan demikian, hipotesis penelitian ini adalah bahwa paparan stress immobilization dan kebisingan menyebabkan perubahan gambaran histopatologi pada organ otak tikus Sprague Dawley, yang ditandai dengan adanya kelainan jaringan seperti degenerasi neuron, pelebaran pembuluh darah, infiltrasi sel inflamasi, dan disorganisasi jaringan, dibandingkan dengan kelompok yang tidak mengalami stress.

1.2 Teori

1.2.1 Taksonomi

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 250-300g untuk betina dan 450-520g untuk tikus jantan (Rosidah et al., 2020). Karakteristik dari tikus *strain* sprague dawley yang digunakan sebagai hewan uji, kepala kecil dan ekor lebih panjang dari badan, melengkung (Aisyah et al., 2023).



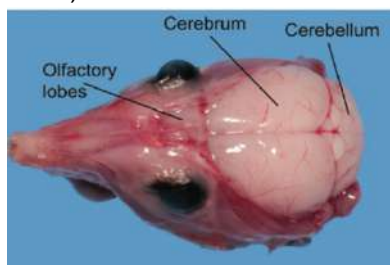
Gambar 1. Tikus Sprague dawley (Rosidah et al., 2020).

Menurut Komang 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>Sprague Dawley</i>

1.2.2 Otak

Otak tikus secara anatomis tersusun atas dua bagian utama, yaitu *cerebrum* (otak besar) dan *cerebellum* (otak kecil). *Cerebrum* merupakan bagian terbesar dari otak dan berperan penting dalam mengatur berbagai fungsi tingkat tinggi, seperti proses berpikir, pengendalian gerak sadar, perkembangan inteligensi, memori, kesadaran, penilaian, serta integrasi seluruh aktivitas mental. Selain itu, *cerebrum* juga berfungsi sebagai pusat penerimaan dan pengolahan rangsangan sensorik yang berasal dari lingkungan. Secara struktural, otak besar terbagi menjadi dua bagian yang disebut *hemisfer cerebri*, yaitu *hemisfer* kiri dan *hemisfer* kanan, yang masing-masing memiliki fungsi spesifik namun saling berkoordinasi dalam menjalankan aktivitas saraf pusat (Yustisia et al., 2020).



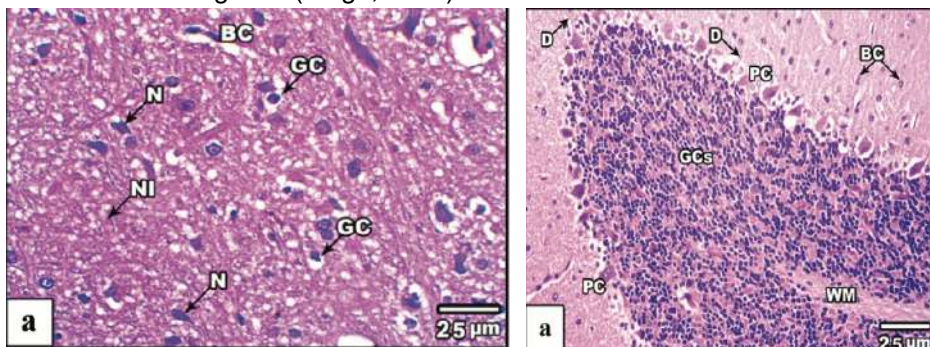
Gambar 2. Otak tikus (Treuting et al., 2018).

Cerebellum berperan sebagai pusat pengolahan dan integrasi berbagai input sensorik yang diterima dari *cerebrum* serta sistem sensorik lainnya. Informasi yang diproses oleh *cerebellum* selanjutnya digunakan untuk membantu mengoordinasikan sinyal-sinyal motorik yang berperan dalam pengaturan postur tubuh, keseimbangan, serta ketepatan dan kelancaran gerakan anggota tubuh. Dengan demikian,

cerebellum memiliki peran penting dalam memastikan gerakan motorik berlangsung secara terkoordinasi dan presisi, sehingga tubuh mampu beradaptasi terhadap perubahan posisi dan aktivitas secara optimal (Yustisia et al., 2020).

1.2.3 Histologi Cerebrum dan Cerebellum Tikus

Cerebrum bertanggung jawab atas berbagai fungsi penting, termasuk pemrosesan kognitif yang lebih tinggi, kesadaran, dan pembentukan memori (Zhang, 2024). *Cerebellum* secara tepat mengoordinasikan gerakan spontan yang terampil dengan mengendalikan kekuatan, durasi dan kekuatan kontraksi, sehingga gerakan tersebut halus, seimbang dan akurat. *Cerebellum* juga bertanggung jawab untuk menjaga keseimbangan, kekencangan otot dan postur tubuh. Hal ini dicapai melalui penggunaan informasi sensorik somatik dalam memodulasi output motorik dari *cerebrum* dan batang otak (Singh, 2020).



Gambar 3. Histologi cerebrum dan cerebellum tikus normal (Otayf dan Gadallah, 2024).

Pada gambar histologi otak tikus normal, korteks *cerebrum* menunjukkan gambaran histologis normal yang ditandai oleh distribusi neuron piramidal, sel glial, dan neuropil interstitial yang tersusun dengan baik. *Cerebellum* memperlihatkan organisasi lapisan yang normal, terdiri atas korteks luar (*gray matter*) dan medula dalam (*white matter*) yang tersusun rapi. Korteks *cerebellum* menunjukkan tiga lapisan utama, yaitu lapisan granular, lapisan sel Purkinje, dan lapisan molekuler. Lapisan granular tampak padat dengan sel bulat hingga oval berwarna gelap, lapisan Purkinje tersusun dalam satu baris sel yang teratur dengan inti basofilik, sedangkan lapisan molekuler menunjukkan kepadatan sel yang lebih jarang dengan keberadaan akson, dendrit, dan kapiler (Gambar 3) (Otayf dan Gadallah, 2024).

1.2.4 Immobilization Stress

Protokol *gold standard* untuk menginduksi stres pada hewan laboratorium dengan melumpuhkan tikus dengan jangka waktu tertentu. Setelah itu, metode ini menjadi salah satu model stres yang paling sering digunakan untuk hewan pengerat. Imobilisasi adalah stresor yang kompleks dan memiliki dimensi fisik maupun psikologis. Gerakan meronta dan pengerahan tenaga otot selama imobilisasi adalah bentuk latihan fisik yang intens. Selama paparan stres imobilisasi yang pertama, tikus berjuang keras untuk membebaskan diri selama 5-10 menit. Setelah itu, mereka

berhenti berjuang dan tetap tidak bergerak. Namun, pada paparan imobilisasi berulang selama sehari-hari, hewan cenderung mengembangkan tanda-tanda pembiasaan terhadap stresor dan berhenti berjuang lebih awal. Perjuangan dan pengerahan tenaga otot dalam proses membebaskan diri merupakan komponen fisik dari stres. Di sisi lain, gerakan terbatas selama posisi tidak bergerak dan paparan di area terbuka merupakan stres psikologis. Imobilisasi dapat ditoleransi dengan baik oleh tikus dan tikus laboratorium, dan digunakan dalam studi stres kronis yang berlangsung selama berminggu-minggu atau bahkan berbulan-bulan. Stresor ini cukup kuat untuk mengaktifkan sistem respons stres dalam tubuh, termasuk aksis HPA dan sistem saraf simpatis. Jenis stres fisik dan psikologis ini sangat berguna untuk mempelajari degenerasi saraf yang diinduksi oleh stres, gangguan pasca trauma dan deregulasi sistem kekebalan tubuh (Bali dan Jaggi, 2014). 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

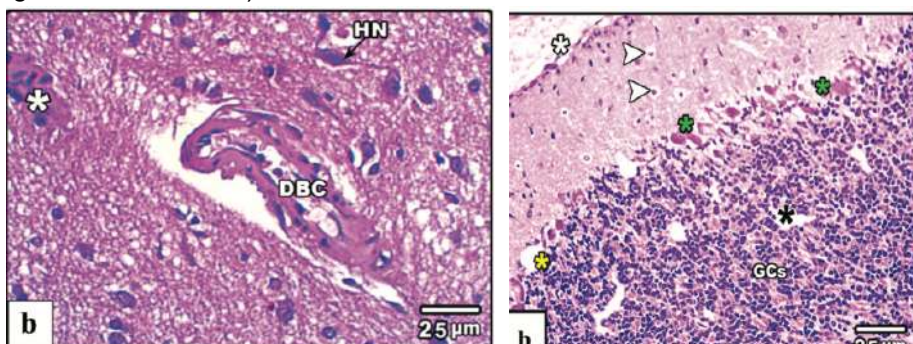
Suara yang tidak diinginkan, tidak menyenangkan, atau berpotensi membahayakan disebut sebagai kebisingan. Efek kebisingan bervariasi tergantung pada karakteristiknya, seperti intensitas dan frekuensi suara, waktu serta bentuk paparan, usia, jenis kelamin, dan kondisi kesehatan individu. Otak berperan sebagai organ utama dalam mengenali tingkat suara dan menafsirkan potensi stres yang ditimbulkan. Dalam waktu yang sangat singkat, otak menginstruksikan seluruh tubuh untuk menyesuaikan diri terhadap stresor melalui pelepasan berbagai hormon stres, sekaligus mengatur aktivasi dan terminasi respons stres sebagai bagian dari proses adaptasi fisiologis (Samson et al., 2007).

Secara fisiologis, kebisingan mampu mengaktifkan sistem saraf simpatis dan memicu respons stres. Aktivitas yang dipicu oleh kebisingan ditransmisikan melalui jalur saraf dari talamus auditorius menuju amigdala sentral, hipotalamus lateral dan medial, hingga mencapai nukleus paraventrikular serta *regio arcuata*. Aktivasi jalur ini selanjutnya merangsang dua komponen utama sistem endokrin, yaitu aksis hipotalamus-hipofisis-adrenal (HPA) dan *regio arcuata*. Aktivasi aksis HPA menyebabkan peningkatan pelepasan kortikotropin dan kortikosteron, sedangkan stimulasi *regio arcuata* meningkatkan sintesis hormon adrenokortikotropik (ACTH) serta substansi mirip beta-endorfin yang disalurkan ke berbagai wilayah otak di luar hipotalamus. Selain intensitas dan waktu paparan, tingkat kontrol individu terhadap stresor merupakan faktor penting yang memengaruhi respons aksis HPA. Paparan kebisingan lingkungan yang bersifat tidak terkendali, seperti yang dialami oleh individu yang tinggal atau bekerja di kawasan perkotaan dengan lalu lintas padat atau di sekitar jalan raya, menyebabkan stresor diterima secara pasif dan berada di luar kendali individu. Baik pada manusia maupun hewan percobaan, kondisi ini terbukti memengaruhi regulasi hormon stres oleh korteks prefrontal (Jafari et al., 2018).

Efek kebisingan terhadap produktivitas dan perilaku hewan tidak hanya dipengaruhi oleh intensitas (dB), frekuensi (Hz), durasi, dan pola paparan, tetapi juga oleh kemampuan pendengaran spesifik tiap spesies, umur, serta kondisi fisiologis hewan. Tikus memiliki rentang pendengaran yang lebih luas dibandingkan manusia, dengan sensitivitas maksimum pada frekuensi sekitar 8-50 kHz, frekuensi terendah yang dapat didengar sekitar 0,25 kHz, dan tertinggi hingga 80 kHz. Sebaliknya, manusia paling sensitif terhadap suara pada kisaran 500 Hz-4 kHz dengan ambang kenyaringan 10-20 dB lebih tinggi dibandingkan tikus (Broucek, 2014). Perbedaan ini menunjukkan bahwa paparan kebisingan lingkungan, seperti kebisingan lalu lintas perkotaan, berpotensi menjadi stresor yang signifikan bagi tikus dan relevan digunakan sebagai model *noise stress* dalam penelitian stres kronis.

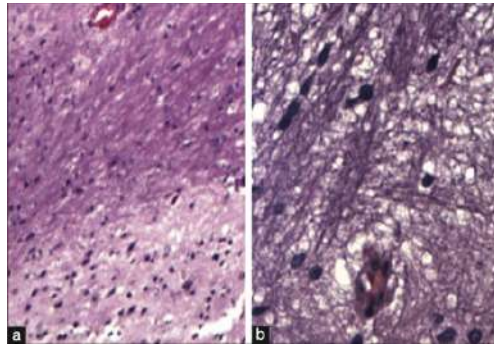
1.2.6 Pengaruh Immobilization Stress dan Noise Stress pada Gambaran Histopatologi Otak

Stres adalah pemicu yang mapan untuk sejumlah gangguan neuropsikiatri, karena stres mengubah struktur dan fungsi beberapa daerah otak dan jaringannya. Stres kronis menyebabkan atrofi struktural dan mengubah konektivitas fungsional di otak tikus, dengan perbedaan antara kelompok yang mengalami stres tinggi dan rendah (Magalhaes et al., 2017).



Gambar 4. Histopatologi otak tikus setelah perlakuan immobilization stress (Otayf dan Gadallah, 2024).

Pada gambar histologi di atas terlihat bahwa pada tikus dengan perlakuan stres imobilisasi, korteks *cerebrum* menunjukkan perubahan histopatologis berupa hipertrofi neuron piramidal, infiltrasi sel glial, serta kapiler dengan dinding menebal. Pada *cerebellum* tampak perubahan yang lebih berat, ditandai oleh fragmentasi materia pia, pergeseran lapisan granular dengan keberadaan beberapa sel yang mengalami vakuolisasi, serta sel Purkinje dan sel keranjang (*basket cells*) yang menunjukkan gambaran pyknotik (Gambar 4) (Otayf dan Gadallah, 2024).



Gambar 5. Jaringan otak tikus setelah perlakuan noise stress (Xue et al., 2014).

Pada gambar diatas terlihat perubahan histopatologis yang paling menonjol pada jaringan otak setelah perlakuan *noise stress* yaitu termasuk kelainan longgar, hiperemia, edema, perluasan pembuluh darah, hyperplasia sel glial, dan atypia ringan di beberapa area seperti inti hyperchromatic dan kariotipe yang tidak teratur (Gambar 5) (Xue et al., 2014).

Kategori kerusakan jaringan dinilai menggunakan skoring deskriptif yang dibagi menjadi kerusakan ringan, sedang, dan berat. Berdasarkan klasifikasi Fadila et al. (2015), kerusakan ringan ditandai dengan infiltrasi sel radang minimal dan bersifat lokal disertai perubahan vaskular ringan seperti pelebaran pembuluh darah tanpa disertai kerusakan struktural sel yang nyata, sehingga arsitektur jaringan masih relatif terpelihara. Kerusakan sedang ditandai dengan infiltrasi sel radang yang lebih jelas dan mulai menyebar, perubahan vaskular yang lebih nyata seperti kongesti dan edema. Kerusakan berat ditandai dengan infiltrasi sel radang yang masif dan difus, perubahan vaskular berat seperti kongesti luas, perdarahan, dan edema signifikan, disertai kerusakan struktural jaringan yang nyata hingga nekrosis serta hilangnya arsitektur jaringan normal.

1.2.7 Rasio N/L

Darah memiliki peran vital dalam tubuh karena berfungsi mengedarkan berbagai zat baik yang berasal dari luar maupun hasil metabolisme internal (Fitria dan Sarto, 2014). Profil hematologi merupakan komponen penting untuk mengetahui kondisi fisiologi hewan percobaan dan mengevaluasi keadaan darah dan komponen-komponennya. Pemeriksaan hematologi sangat penting dilakukan untuk menilai kesehatan awal hewan coba, sehingga penelitian yang dilakukan mendapatkan data yang valid. Nilai profil hematologi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya praanalitik dan analitik. Faktor praanalitik diantaranya umur, jenis kelamin, kebutuhan pakan, teknik pemeliharaan, tingkat *stress*, penggunaan antikoagulan, kecepatan sentriguasi dan kondisi penyimpanan sampel. Sedangkan yang mempengaruhi faktor analitik yaitu metodologi yang digunakan, kualitas reagen, stabilitas analit dan variabel biologi (Rosidah et al., 2020).

Perbandingan antara jumlah neutrofil dan limfosit (rasio N/L) merupakan indikator hematologis yang bisa digunakan untuk menilai stres fisiologis pada hewan. Zulkifli et al. (2000) menyebutkan bahwa rasio ini menggambarkan tingkat stres yang

dialami hewan dan dapat dijadikan ukuran stres yang terpercaya. Pernyataan ini didukung oleh Davis et al. (2014) yang menyatakan bahwa rasio N/L adalah indikator potensial dalam menilai respons hewan terhadap stres, termasuk pada model hewan seperti tikus. Rasio neutrofil terhadap limfosit (NLR) yang normal berada dalam rentang 1,0 hingga 2,0, dengan nilai referensi umum antara 0,7 hingga 2,2. Nilai NLR ini mencerminkan keseimbangan antara sistem imun bawaan (neutrofil) dan adaptif (limfosit). NLR dianggap tidak normal jika melebihi 3,0 dan nilai di atas 5,0 sering dikaitkan dengan inflamasi berat, infeksi serius seperti sepsis, atau kondisi kanker dengan prognosis buruk. Sebaliknya, nilai NLR yang sangat rendah, di bawah 0,7 juga dianggap patologis dan bisa mengindikasikan gangguan atau supresi sistem imun. Rentang NLR antara 2,3 hingga 3,0 disebut sebagai zona abu-abu, yang bisa menunjukkan adanya inflamasi ringan atau subklinis. NLR digunakan secara luas sebagai indikator respon imun terhadap stres, infeksi, inflamasi sistemik, serta sebagai alat prognostik dalam berbagai kondisi klinis (Roman, 2021).

1.3 Tujuan dan Manfaat

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah paparan stress immobilization dan kebisingan dapat menyebabkan kelainan pada organ otak tikus, serta untuk mengetahui gambaran histopatologi cerebrum (otak besar) dan cerebellum (otak kecil) setelah pemberian perlakuan stress immobilization dan noise stress pada tikus Sprague dawley. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran yang jelas mengenai perubahan struktur jaringan otak akibat paparan stres fisik dan stres lingkungan.

Manfaat penelitian ini bagi khalayak umum adalah sebagai sumber informasi ilmiah yang dapat menambah wawasan dan pengetahuan mengenai dampak stres terhadap kesehatan otak, khususnya perubahan histopatologi jaringan saraf. Secara akademis, penelitian ini bermanfaat untuk melatih kemampuan peneliti dalam melakukan penelitian eksperimental serta dapat menjadi bahan rujukan bagi penelitian selanjutnya yang berfokus pada pengaruh stres terhadap perubahan histopatologi otak.

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, pengeras suara, hematology analyzer, tabung EDTA, pipet hematokrit, peralatan untuk pembuatan preparat histopatologi yaitu bak *paraffin*, *dissecting set*, botol flakon, gelas objek, gelas penutup, oven, *rotary microtome*, *staining kit*, *base molt*, *holder*, pipet tetes, mikroskop cahaya, *micrometer* objektif dan *micrometer* okuler.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus sprague dawley 24 ekor, sekam, sarung tangan lateks, masker bedah, kapas *tissue*, underpad, trash bag 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 menggunakan metode eksperimental yang melibatkan empat kelompok perlakuan. Pengukuran dilakukan pada hari ke-14 sesudah perlakuan untuk mengevaluasi perubahan profil darah sebagai indikator stres atau kelainan imun dan perubahan histologi otak tikus Sprague dawley. Desain ini bertujuan untuk membandingkan perubahan yang terjadi pada histologi otak tikus pasca penerapan *immobilization* dan pemberian kebisingan.

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih strain Sprague dawley yang sehat dan memenuhi kriteria inklusi sebagai hewan coba. Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *simple random sampling*, sehingga setiap tikus memiliki peluang yang sama untuk terpilih sebagai sampel penelitian.

Penentuan jumlah sampel menggunakan rumus Federer, yaitu:

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

Keterangan:

n: jumlah sampel

t: jumlah kelompok/perlakuan

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

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

$$(n-1)(4-1) \geq 15$$

$$(n-1)(3) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15+3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 18:3$$

$$n \geq 6$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, jumlah minimal sampel adalah 6 ekor tikus per kelompok, sehingga total sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor tikus yang dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol (K0), kelompok stress *immobilization* (K1), kelompok *noise stress* (K2), dan kelompok kombinasi stress *immobilization* dan *noise stress* (K3).

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 dibagi secara acak ke dalam empat kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol (K0) yang dipelihara tanpa pemberian stres, kelompok stres imobilisasi (K1) yang ditempatkan dalam perangkat imobilisasi selama durasi tertentu setiap hari, kelompok stres kebisingan (K2) yang dipaparkan suara dengan intensitas tertentu, serta kelompok kombinasi (K3) yang menerima perlakuan gabungan antara stres imobilisasi dan stres kebisingan. Setelah seluruh rangkaian perlakuan selesai, dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk mengamati perubahan pada jaringan cerebrum dan cerebellum, meliputi identifikasi kelainan jaringan seperti hiperemia, edema, pelebaran pembuluh darah, hiperplasia sel, serta atypia sel. Seluruh prosedur penelitian dilaksanakan sesuai dengan pedoman etika penelitian hewan coba untuk menjamin kesejahteraan hewan selama penelitian berlangsung.

2.4.3 Induksi Kebisingan

Perlakuan stres kebisingan diberikan pada kelompok 2 dan kelompok 3 dengan menggunakan pengeras suara sebagai sumber suara. Speaker dipasang pada jarak ± 30 cm di atas kandang untuk memastikan distribusi suara yang relatif merata di dalam kandang. Intensitas suara pada perlakuan noise stress dijaga pada kisaran 95-100 dB dan dikontrol secara kontinu agar tidak melebihi atau berada di bawah rentang tersebut selama periode perlakuan. Paparan kebisingan diberikan selama

total 4 jam per hari, yang dibagi menjadi dua sesi, yaitu sesi pertama selama 2 jam pada pukul 17.00-19.00, kemudian diberikan waktu istirahat selama 2 jam (19.00-21.00), dan dilanjutkan sesi kedua selama 2 jam pada pukul 21.00-23.00. Perlakuan stres kebisingan ini dilakukan secara konsisten setiap hari selama 14 hari berturut turut.

2.4.4 Induksi Immobilization

Perlakuan stres imobilisasi pada tikus dilakukan dengan memasukkan tikus ke dalam kandang imobilisasi dengan ukuran 30 cm × 10 cm dan ventilasi terbatas sehingga pergerakan hewan sangat minimal. Perlakuan ini diberikan pada kelompok 1 dan kelompok 3. Paparan stres diberikan selama total 4 jam per hari yang dibagi menjadi dua sesi, yaitu sesi pertama selama 2 jam pada pukul 17.00-19.00, kemudian tikus dikembalikan ke kandang besar untuk istirahat selama 2 jam (19.00-21.00), dan dilanjutkan sesi kedua selama 2 jam pada pukul 21.00-23.00. Setelah perlakuan selesai, tikus dikembalikan ke kandang besar untuk beristirahat semalaman. Prosedur stres imobilisasi ini dilakukan secara berulang setiap hari selama 14 hari berturut-turut.

2.4.5 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.

Perbandingan antara jumlah neutrofil dan limfosit (rasio N/L) merupakan indikator hematologis yang bisa digunakan untuk menilai stres fisiologis pada hewan. Penghitungan jumlah neutrofil dan limfosit dilakukan menggunakan alat hematology analyzer. Rasio neutrofil terhadap limfosit (N/L) digunakan sebagai indikator keseimbangan sistem imun dan tingkat respons stres serta inflamasi sistemik.

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

Nilai N/L	Kategori	Jenis Respons Stres
< 0,7	Tidak normal (rendah)	Supresi imun atau gangguan regulasi imun
0,7 – 2,0	Normal (baseline)	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

Nilai N/L	Kategori	Jenis Respons Stres
> 17,0	Tidak normal (kritis)	Stres kronis patologis atau suprapisiologis

Rasio neutrofil terhadap limfosit (N/L) digunakan sebagai indikator keseimbangan sistem imun dan tingkat respons stres serta inflamasi sistemik. Nilai N/L dalam rentang 0,7–2,0 mencerminkan kondisi fisiologis normal dan umumnya dijadikan sebagai baseline, khususnya pada kelompok kontrol. Rentang N/L 2,1–3,0 berada pada zona abu-abu yang menunjukkan stres ringan atau inflamasi subklinis yang masih bersifat adaptif. Peningkatan N/L pada rentang 3,1–7,0 mengindikasikan aktivasi stres yang lebih nyata, baik stres akut maupun kronis awal, sedangkan nilai N/L yang lebih tinggi mencerminkan stres kronis dengan derajat yang semakin berat dan berpotensi menimbulkan gangguan jaringan. Sebaliknya, nilai N/L yang sangat rendah juga dianggap tidak normal karena dapat mengindikasikan gangguan atau supresi sistem imun.

2.4.6 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 Pengamatan dan Pengukuran

Pengamatan preparat diamati menggunakan mikroskop perbesaran 40x, 100x dan 400x dengan menilai perubahan histologi otak besar dan otak kecil. Analisis data kualitatif dalam penelitian ini dilakukan melalui pengamatan morfologi dan perubahan histopatologi pada jaringan otak besar dan otak kecil secara mikroskopis. Fokus pengamatan meliputi keberadaan sel inflamasi, kelainan jaringan berupa kongesti atau hemoragi, pelebaran pembuluh darah, vakuolisasi jaringan, serta adanya hiperplasia sel dan atypia apabila ditemukan. 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.