PENGARUH ASAP VAPOR DENGAN PERBEDAAN DOSIS NIKOTIN TERHADAP KADAR RELATIF TNF-α DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI TRAKEA TIKUS PUTIH *(Rattus norvegicus)*

SKRIPSI

Oleh:
HENDRO AJI LEGOWO
155130101111062

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PENGARUH ASAP VAPOR DENGAN PERBEDAAN DOSIS NIKOTIN TERHADAP KADAR RELATIF TNF-α DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI TRAKEA TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
HENDRO AJI LEGOWO
155130101111062

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH ASAP VAPOR DENGAN PERBEDAAN DOSIS NIKOTIN TERHADAP KADAR RELATIF TNF-α DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI TRAKEA TIKUS PUTIH *(Rattus norvegicus)*

Oleh:

HENDRO AJI LEGOWO
155130101111062

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 18 Juli 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I	Pembimbing II
Dr. Agung Pramana Warih M, M.Si	**drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed**
NIP. 19650616 199111 1 001	NIP. 19800904 200812 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc
NIP. 19631216 198803 1 002

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:
Nama : Hendro Aji Legowo
NIM : 155130101111062
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Asap Vapor dengan Perbedaan Dosis Nikotin terhadap Kadar Relatif TNF-α dan Gambaran Histopatologi Trakea Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi skripsi yang saya buat adalah benar-benar hasil karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang tercantum di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala risiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 18 Juli 2019
Yang menyatakan,

(Hendro Aji Legowo)
NIM. 155130101111062

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Pengaruh Asap Vapor dengan Perbedaan Dosis Nikotin terhadap Kadar Relatif TNF-α dan Gambaran Histopatologi Trakea Tikus Putih *(Rattus norvegicus)*

ABSTRAK

Vapor merupakan inovasi rokok yang dapat menarik minat pemakainya dan sebagai alternatif mengganti pembakaran bahan tembakau yang berasal dari rokok kretek yaitu dengan metode NRT (*Nicotine Replacement Therapy*). Alat ini dapat menguapkan liquid menjadi asap yang kemudian akan disedot oleh pemakainya dan terdapat kandungan nikotin, propilen glikol dan perasa. Asap vapor yang dihasilkan menyebabkan stres oksidatif apabila dihirup karena radikal bebas akan meningkat dan menyebabkan kerusakan seperti membran, lipid, protein sel, dan kematian sel. Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan, strain *Wistar*, berumur 8-12 minggu, berat badan rata-rata 150-200 g. Penelitian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan terdiri dari 4 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) setiap kelompok. Kelompok 1 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang tidak diberi asap vapor (kontrol negatif). Kelompok 2 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap vapor dengan 0 mg nikotin selama 14 hari. Kelompok 3 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap vapor dengan 3 mg nikotin selama 14 hari. Kelompok 4 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap vapor dengan 6 mg nikotin selama 14 hari. Kelompok 5 adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap vapor dengan 9 mg nikotin selama 14 hari. Kadar TNF-α trakea diuji menggunakan teknik *flowcytometry* dan histopatologi trakea dengan pewarnaan HE. TNF-Alpha trakea dianalisa menggunakan uji *One-Way* ANOVA dan dilanjut uji Tukey ($p<0,05$). Pada pemeriksaan histopatologi organ trakea dianalisa secara deskriptif. Hasil penelitian paparan asap vapor berbeda signifikan ($P<0,05$) dengan perubahan struktur epitel trakea dan kenaikan kadar TNF-α.

Kata Kunci: Vapor, Trakea, Histopatologi, TNF-Alpha

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

The Effect of Smoke Vapor with Difference of Nicotine Dosage on Relative Levels of TNF-α and Histopathological Description of Trachea in White Rats (*Rattus norvegicus*)

ABSTRACT

Vapor is an innovation of cigarettes that can attract the wearer's interest and as an alternative to replacing the burning of tobacco ingredients derived from clove cigarettes, namely the NRT (*Nicotine Replacement Therapy*) method. This tool can vaporize liquid into smoke which will then be sucked by the wearer and there is a content of nicotine, propylene glycol and flavorings. Vapor smoke produced will cause oxidative stress when inhaled because free radicals increase and will cause damage such as membranes, lipids, cell proteins, and cell death. In this study using experimental animals male white rats (*Rattus norvegicus*), Wistar strain, aged 8-12 weeks, average body weight of 150-200 g. The research was divided into 5 treatment groups and consisted of 4 white rats (*Rattus norvegicus*) in each group. Group 1 is a white rats (*Rattus norvegicus*) that is not given vapor (negative control). Group 2 were white rats (*Rattus norvegicus*) given vapor exposure with 0 mg of nicotine for 14 days. Group 3 were white rats (*Rattus norvegicus*) given vapor exposure with 3 mg of nicotine for 14 days. Group 4 were white rats (*Rattus norvegicus*) given vapor exposure with 6 mg of nicotine for 14 days. Group 5 were white rats (*Rattus norvegicus*) given vapor exposure with 9 mg of nicotine for 14 days TNF-α levels in the trachea was tested using flowcytometry technique and tracheal histopathology using HE staining technique. TNF-Alpha in trachea was analyzed using the One Way ANOVA test and continued with the Tukey test ($P<0.05$). Histopathological examination the tracheal were analyzed descriptively. The results of research showed that vapor smoke exposure differed significantly ($P<0.05$) white changes in tracheal epithelial structure and increase in TNF-α levels.

Keywords: Vapor, Trachea, Histopathology, TNF-Alpha

repository.ub.ac.id

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

KATA PENGANTAR

Puji syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadirat Allah SWT karena atas limpahan rahmat, taufiq dan hidayah-Nya. Sholawat dan salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyusun skripsi yang berjudul "Pengaruh Asap Vapor dengan Perbedaan Dosis Nikotin terhadap Kadar Relatif TNF-α dan Gambaran Histopatologi Trakea Tikus Putih *(Rattus norvegicus)*" dengan lancar.

Selama proses penulisan dan penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.
2. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si., selaku pembimbing I atas segala bantuan, nasihat, bimbingan, arahan, serta saran kepada penulis.
3. drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed., selaku pembimbing II atas segala bantuan, nasihat, bimbingan, arahan, serta saran kepada penulis.
4. drh. Nurina Titisari, M.Sc., selaku dosen penguji I atas segala bantuan, nasihat, bimbingan, arahan, serta saran kepada penulis.
5. drh. Mira Fatmawati, M.Si., selaku dosen penguji II atas segala bantuan, nasihat, bimbingan, arahan, serta saran kepada penulis.
6. Pihak dekanat FKH UB yang seringkali memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.
7. Seluruh staf dan karyawan FKH UB, yang telah membantu jalannya proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
8. Keluarga penulis yang sangat luar biasa, Bapak Suwar, Ibu Masriatun, Novi Wahyu Wulandari, Safitri Dian Andini dan Sinta Maharani yang selalu memberikan cinta, dukungan dan semangat kepada penulis dalam segala kondisi.
9. Keluarga besar *Classy Class* 2015 C atas cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan dan mimpi-mimpi yang luar biasa.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

10. Teman-teman kontrakan penulis yang selalu semangat dan saling menyemangati dalam berbagai kondisi.
11. Kelompok penelitian "TIM VAPOR HUHA" yang terdiri dari Mila, Atiqoh, Ninik dan Rowena yang selama ini telah banyak bekerjasama dengan penulis, selalu semangat dan saling menyemangati dalam berbagai kondisi.
12. Angel Vape Shop yang telah banyak membantu dalam penelitian kali ini.
13. Tim Assistant Jas Lab Biru Laut "Higiene Makanan" atas semangat dan dukungannya selama ini.
14. Tim Assistant Jas Lab Hijau "Bedah" atas semangat dan dukungannya selama ini.
15. Kakak-kakak angkatan 2008-2014 yang banyak memberikan nasihat dan petuah kepada penulis.
16. Kolega FKH UB angkatan 2015, 2016, 2017, dan 2018 yang selalu memberi keceriaan dan inspirasi.
17. Semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa naskah skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu penulis memohon maaf atas kekurangan tersebut.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan naskah skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca, Aamiin Aamiin Ya Rabbal Alamin.

Malang, 18 Juli 2019

Penulis

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL ii
LEMBAR PENGESAHAN iii
LEMBAR PERNYATAAN iv
ABSTRAK v
ABSTRACT vi
KATA PENGANTAR vii
DAFTAR ISI x
DAFTAR TABEL xii
DAFTAR GAMBAR xiii
DAFTAR LAMPIRAN xiv
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG xv
BAB 1 PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 4
1.3 Batasan Masalah 4
1.4 Tujuan Penelitian 5
1.5 Manfaat Penelitian 5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 6
2.1 Radikal Bebas 6
2.2 Peroksidasi Lipid 7
2.3 Rokok Elektrik 8
2.4 Nikotin 11
2.5 Tikus Putih 12
2.6 Trakea 14
2.6.1 Anatomi Trakea 14
2.6.2 Histologi Trakea 15
2.6.3 Fisiologi Pernafasan 17
2.7 TNF-Alpha 17
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN 20
3.1 Kerangka Konseptual 20
3.2 Hipotesis Penelitian 23
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN 24
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian 24
4.2 Populasi dan Sampel 24
4.3 Alat dan Bahan 24
4.3.1 Alat 24
4.3.2 Bahan 25
4.4 Variabel Penelitian 25
4.5 Rancangan Penelitian 25
4.6 Penetapan Jumlah Perlakuan dan Ulangan 26
4.7 Prosedur Penelitian 27

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4.7.1 Aklimatisasi 27
4.7.2 Pemaparan Asap Vapor 27
4.7.3 Pengambilan Organ Trakea 27
4.7.4 Pembuatan Preparat Histopatologi Trakea dengan Pewarnaan HE 28
4.7.5 Pengamatan Histopatologi Trakea 29
4.7.6 Pengujian TNF-α Menggunakan Teknik *Flowcytometry* 29
4.7.7 Pengukuran Kadar TNF-α Menggunakan Teknik *Flowcytometry* 31
4.8 Analisis Data 31
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN 33
5.1 Pengaruh Asap Vapor dengan Perbedaan Dosis Nikotin terhadap Kadar Relatif TNF-α Trakea Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) 33
5.2 Pengaruh Asap Vapor dengan Perbedaan Dosis Nikotin terhadap Histopatologi Trakea Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) 35
BAB 6 PENUTUP 43
6.1 Kesimpulan 43
6.2 Saran 43
DAFTAR PUSTAKA 44

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

2.1 Biologis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) 14
4.1 Rancangan Penelitian.....26
5.1 Rata-rata Kadar Relatif TNF-α Trakea Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) 33

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

2.1 Rokok Elektrik Vapor 11
2.2 Struktur Nikotin 12
2.3 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*).....13
2.4 Anatomi Trakea.....15
2.5 Mikroskopis Organ Trakea Normal 16
2.6 Mikroskopis Organ Trakea Abnormal 17
5.1 Histopatologi Trakea Kelompok Kontrol.....36
5.2 Histopatologi Trakea Kelompok Perlakuan 1 37
5.3 Histopatologi Trakea Kelompok Perlakuan 2 38
5.4 Histopatologi Trakea Kelompok Perlakuan 3 39
5.5 Histopatologi Trakea Kelompok Perlakuan 4 40

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran **Halaman**

1. Sertifikat Laik Etik Penelitian 50
2. Skema Kerja Penelitian 51
3. Diagram Kerja Penelitian 52
4. Hasil Uji Kadar TNF-α 56
5. Hasil Uji Statistika Kadar TNF-α 58
6. Perhitungan Dosis Nikotin dalam *E-Liquid* Vapor 61
7. Dokumentasi Kegiatan 62

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

%	:	Persen
/	:	Per
=	:	Sama dengan
^{0}C	:	Derajat celcius
±	:	Kurang lebih
ROS	:	*Reactive Oxygen Spesies*
TNF-Alpha	:	*Tumor Necrosis Factor Alpha*
NRT	:	*Nicotine Replacement Therapy*
DNA	:	*Deoxyribonucleic Acid*
H_2O_2	:	Hidrogen Peroksida
HOCl	:	Asam hipokloris
O_2	:	Oksigen
VG	:	*Vegetable Gliserin*
PG	:	Propilen Glikol
NK	:	*Natural Killer*
PBS	:	*Phosphate Buffer Saline*
NaCl	:	*Natrium Chloride*
PFA	:	*Paraformaldehide*
pH	:	*Power of Hydrogen*
FSC	:	*Forward Scatter*
SSC	:	*Side Scatter*
WHO	:	*World Health Organization*
RAL	:	Rancangan Acak Lengkap
ANOVA	:	*Analysis of Variance*
BNJ	:	Beda Nyata Jujur
SPSS	:	*Statistical Package for The Social Science*

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rokok merupakan salah satu penyebab angka mortalitas tinggi yang dapat menimbulkan penyakit apabila mengkonsumsi rokok dalam jangka waktu panjang dengan prevalensi terkena penyakit seperti *artherosclerosis* dan *chronic pulmonary disease* (COPD) serta dampak sistemik secara signifikan (Kemenkes RI, 2013). Dampak buruk yang dapat disebabkan oleh rokok diantaranya efek kecanduan, permasalahan kesehatan hingga angka kematian meningkat karena konsumsi rokok secara berlebihan. Perokok yang paling banyak berasal dari negara berkembang (Yanbaeva dkk., 2007). Negara Indonesia merupakan pengguna tembakau terbesar ketiga di dunia, serta menempati peringkat pertama di kawasan Asia Tenggara. Perokok di Indonesia mencapai 62.800.000 jiwa, lebih dari sepertiga (36,3%) masyarakat Indonesia saat ini merupakan perokok aktif. Perokok laki-laki mempunyai prevalensi sebesar 64,9% sedangkan perokok perempuan mencapai 2,1% pada tahun 2013. Prevalensi di Indonesia untuk perokok laki-laki berjumlah 56.860.457 orang dan perokok perempuan prevalensinya telah meningkat 400% dalam 20 tahun terakhir yang berjumlah 1.890.135 orang (Istiqomah dkk., 2016). Jumlah perokok mengalami peningkatan dikarenakan berkembangnya pola pikir dari rokok yang sudah menjadi sebuah *trend* dikalangan masyarakat. Bahan utama dari rokok konvensional yaitu tembakau. Kandungan tembakau yang memberikan efek gangguan kesehatan antara lain nikotin, tar, gas karbon monoksida (CO) dan berbagai logam berat.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Merokok selain berbahaya bagi perokok aktif tetapi juga berbahaya bagi perokok pasif. Perokok pasif mempunyai kemungkinan untuk mengalami gangguan kesehatan yang diakibatkan oleh asap rokok yang terhirup mencapai 30% (Barber, 2008). Partikel-partikel terdispersi dan campuran substansi-substansi kimia dalam bentuk gas terdapat pada asap rokok. Akibat yang ditimbulkan dari paparan asap rokok mempunyai relasi kuat terhadap kerusakan DNA yang dipicu oleh stres oksidatif (Patel dan Rawal, 2008). Merokok dapat meningkatkan level dari radikal bebas yang akan memicu perusakan DNA dan dapat mengindikasikan dalam pertumbuhan kanker pada manusia, seperti kanker paru-paru, mulut, laring, faring, esofagus, lambung, pankreas, ginjal (Lodovici dan Bigagli, 2009).

Gangguan kesehatan akibat dari rokok banyak berkaitan dengan efek pembakaran dari bahan tembakau dan senyawa berbahaya yang terdapat didalam rokok. Menurut WHO (2009), adanya upaya untuk menghentikan pembakaran bahan tembakau yang berasal dari rokok konvensional dengan metode NRT (*nicotine replacement therapy*). Metode NRT menggunakan suatu media dengan pemberian nikotin yang diperlukan oleh perokok tanpa melalui pembakaran bahan tembakau yang sangat merugikan (Gayatri dan Susanto, 2012). *Nicotine replacement therapy* mempunyai beberapa jenis namun sekarang ini yang menjadi *trend* dalam beberapa tahun terakhir yaitu rokok elektrik dan salah satu jenisnya itu adalah rokok elektrik vapor. Rokok elektrik vapor mempunyai beberapa jenis diantaranya jenis pen, jenis portable dan jenis dekstop. Rokok elektrik merupakan suatu metode NRT yang menggunakan sumber daya listrik dengan tenaga baterai yang digunakan untuk memberikan nikotin dalam bentuk uap dan tetap

memberikan sensasi yang sama dengan merokok kepada konsumen (Tanuwihardja dan Agus, 2012).

Penggunaan rokok elektrik di Indonesia semakin banyak baik dari kalangan remaja maupun dewasa. Menurut Kemenkes RI (2013), sekitar 3% remaja laki-laki dan 1,1% remaja perempuan menghisap rokok elektrik. Rokok elektrik sangat mudah ditemukan dengan berbagai macam variasi bentuk desain. Rokok elektrik vapor mempunyai 3 komponen yaitu baterai, *atomizer* (bagian yang akan memanaskan dan menguapkan cairan nikotin) dan *cartridge* (berisi larutan nikotin). Kandungan yang terdapat dalam rokok elektrik berbeda dengan kandungan dari rokok konvensional. Kandungan dari rokok konvensional diantaranya tembakau yang didalamnya terdapat tar, nikotin dan CO sebagai hasil pembakaran. Rokok elektrik vapor mempunyai kandungan didalamnya berupa nikotin, propilen glikol, gliserol dan berbagai macam perasa (Badan Pengawasan Obat dan Makanan, 2015).

Food and drugs administration (FDA) memperingatkan masyarakat mengenai bahaya zat toksik dan karsinogen yang terdapat dalam rokok elektrik yang tidak aman bagi kesehatan (Westernberger, 2009). Rokok elektrik vapor termasuk kedalam golongan *electronic delivery system* (EDS) yaitu sebagai alat dengan menggunakan sumber listrik dari baterai untuk memberikan nikotin kepada konsumen melalui uap. Penggunaan rokok elektrik sekarang ini mengalami peningkatan dan masih belum ada bukti mengenai pengaruh rokok elektrik terhadap fisiologis tubuh apakah rokok elektrik (*electronic cigarette*) dapat meningkatkan kadar relatif TNF-α dan histopatologi trakea seperti asap rokok konvensional atau bisa lebih sedikit efek yang ditimbulkan. Risiko menghirup rokok elektrik tidak

jauh berbeda dengan rokok biasa dan menghirup uap rokok vapor telah dikaitkan dengan penyakit asma, stroke dan penyakit jantung. Berdasarkan penelitian dengan menggunakan hewan coba tikus yang dikondisikan sebagai perokok pasif selama 14 hari dengan pemberian liquid berbeda-beda. Jumlah liquid yang digunakan setiap kali pemaparan berdasarkan nilai LD_{50} nikotin untuk tikus yaitu 50 mg/kgBB/hari atau 10 mg/200gBB/hari (Adyttia dkk., 2014). Oleh karena itu, penelitian kali ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh paparan asap vapor yang akan menyebabkan perubahan terhadap kadar relatif TNF-α dan gambaran histopatologi trakea pada tikus putih *(Rattus norvegicus)***.**

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, dapat dapat ditarik rumusan permasalahan sebagai berikut:

1) Apakah pemberian paparan asap vapor dapat mempengaruhi kadar relatiif TNF-α trakea pada tikus putih *(Rattus norvegicus)*?
2) Apakah pemberian paparan asap vapor dapat mempengaruhi histopatologi trakea tikus putih *(Rattus norvegicus)*?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, penelitian ini mempunyai batasan masalah diantaranya:

1) Hewan coba yang digunakan adalah tikus putih *(Rattus norvegicus)* jenis kelamin jantan, strain *Wistar* dengan kriteria umur 8-12 minggu dan berat badan rata-rata 150-200 gram. Penggunaan hewan telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2) Rokok elektrik yang digunakan adalah vapor. Vapor diperoleh di toko yang berada di sekitar wilayah kota Malang. Pemaparan asap vapor diberikan selama 14 hari, 15 menit setiap pagi, siang dan sore dan pemberian dengan dosis yang berbeda. Tikus ditempatkan pada kotak kaca yang diberi lubang, selanjutnya pemaparan asap vapor menggunakan *smooking pump chamber* (Triantara, 2016).
3) Variabel yang akan diamati dalam penelitian ini diantaranya mengetahui kadar relatif TNF-α pada trakea menggunakan metode *flowcytometry* dan pengamatan gambaran histopatologi trakea dengan menggunakan metode pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) untuk mengamati kerusakan sel akibat paparan asap vapor.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, penelitian ini mempunyai tujuan diantaranya:

1) Mengetahui efek pemberian paparan asap vapor yang mengandung nikotin terhadap kadar relatif TNF-α trakea tikus putih *(Rattus norvegicus).*
2) Mengetahui efek pemberian paparan asap vapor yang mengandung nikotin terhadap gambaran histopatologi trakea tikus putih *(Rattus norvegicus).*

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat mengenai pengaruh yang ditimbulkan dari menggunakan vapor.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radikal Bebas

Menurut Winarsi (2007), Radikal bebas merupakan suatu molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital yang berada di luarnya. Radikal bebas dapat di netralisir oleh tubuh yang ditimbulkan oleh asap contohnya asap rokok melalui enzim SOD (*Superoksida dismutase*) yang dimiliki. Enzim *superoksida dismutase* (SOD) adalah suatu indikator yang dapat digunakan untuk mencegah terbentuknya senyawa radikal. Enzim *superoksida dismutase* (SOD) tersebar didalam tubuh baik yang berada didalam organ, maupun didalam darah. Radikal bebas mirip dengan oksidan yang sifatnya sebagai penerima elektron (menarik elektron). Radikal bebas lebih berbahaya daripada oksidan dikarenakan reaktivitas yang sangat tinggi dan kecenderungan membentuk radikal bebas yang baru. Radikal bebas jika bertemu dengan molekul lain akan membentuk radikal bebas yang baru lagi, dan demikian seterusnya sehingga terjadi reaksi rantai (Yasa, 2013). Radikal bebas dapat dihasilkan dari proses metabolisme yang terjadi didalam tubuh (endogen) dan faktor lingkungan (eksogen). Radikal bebas yang berasal dari endogen terbentuk pada membran plasma dan organel-organel (mitokondria, retikulum endoplasmik, peroksisom, dan sitosol) melalui suatu reaksi enzimatik yang berlangsung pada saat proses metabolisme pada sel dan diantara sumber radikal bebas yaitu berasal dari asap rokok (eksogen) (Sunarjo, 2012).

Tubuh mempunyai sistem pertahanan terhadap berbagai bentuk radikal bebas berupa antioksidan primer. Antioksidan primer akan bereaksi dengan radikal

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

bebas dan kemudian akan mengubah menjadi produk stabil. Jumlah radikal bebas yang berlebihan didalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menyebabkan suatu kerusakan oksidatif dari tingkat sel, jaringan, hingga sampai organ tubuh yang bisa menyebabkan berbagai penyakit salah satunya yaitu penyakit jantung (Megasari, 2010). Radikal bebas dan turunannya dapat menyebabkan gangguan metabolisme sel berupa kerusakan lipid peroksida, protein membran, dan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) pada inti sel dan prosesnya yang terjadi disebut dengan peroksidasi lipid (Sunarjo, 2012).

2.2 Peroksidasi Lipid

Peroksidasi lipid merupakan suatu proses yang bersifat kompleks yang diakibatkan reaksi asam lemak tak jenuh jamak, memiliki kemampuan sebagai penyusun fosfolipid membran sel dengan *reactive oxygen species* (ROS), kemudian membentuk *hidroperoksida*. Pertama, ROS merupakan senyawa turunan dari oksigen yang lebih reaktif dibandingkan dengan oksigen pada kondisi dasar (*ground state*). ROS tidak hanya terdiri dari molekul-molekul oksigen tanpa pasangan elektron seperti radikal hidroksil (OH), radikal superoksida (O_2-), dan nitrit oksida (NO), namun juga molekul reaktif yang memiliki elektron-elektron berpasangan. Molekul oksigen yang memiliki elektron berpasangan tersebut diantaranya, hidrogen peroksida (H_2O_2), asam hipoklorous (HOCl), dan anion peroksinitrit (ONOO-). Peroksidasi lipid yang terbentuk dari hasil radikal bebas ini akan selalu membentuk reaksi berantai yang akan terus berlanjut sampai radikal bebas ini dihilangkan oleh radikal bebas lain dan oleh sistem antioksidan yang berada dari dalam tubuh (Retno dkk., 2012).

Mekanisme kerusakan suatu sel yang terjadi dikarenakan radikal bebas reaktif yang didahului oleh kerusakan membran sel adalah sebagai berikut (Utami, 2010):

1. Terjadinya perubahan dari struktur dan fungsi reseptor karena adanya ikatan kovalen antara radikal bebas yang berikatan dengan komponen-komponen membran (enzim-enzim membran, komponen karbohidrat membran plasma).
2. Terganggunya transport lintas membran akibat adanya oksidasi gugus tiol, adalah gugus fungsi terdiri dari atom sulfur dan atom hidrogen yang merupakan analog sulfur gugus alkohol (OH-) pada komponen membran oleh radikal bebas.
3. Reaksi yang terjadi antara peroksidasi lipid dan kolesterol membran yang mengandung asam lemak tak jenuh.

2.3 Rokok Elektrik

Vapor merupakan inovasi dari rokok yang dapat menarik minat pemakainya, dan adanya upaya untuk mengganti pembakaran tembakau yang berasal dari rokok kretek dengan metode NRT atau *Nicotine Replacement Therapy* (terapi pengganti nikotin), metode ini menggunakan nikotin dalam bentuk liquid pada rokok elektrik (WHO, 2009). Vapor mempunyai kandungan didalamnya berupa propilen glikol, *vegetable glisrin*, perasa dan nikotin. Nikotin dalam vapor yang digunakan yaitu bertingkat seperti 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg dan seterusnya. Nikotin merupakan salah satu dari alkaloid yang sudah lama diketahui (Stedman, 1968). Nikotin di dalam asap rokok dengan cepat diabsorpsi dari paru-paru ke dalam darah dan hampir sama efisiensinya apabila diberikan secara intravena. Senyawa ini mencapai otak dalam waktu 8 detik setelah inhalasi. Nikotin dalam

jangka waktu lama akan terakumulasi dalam pembuluh darah dan mengakibatkan terjadinya penyempitan pada dinding pembuluh darah (Gilman dkk., 1991).

Masyarakat saat ini lebih menyukai rokok elektronik dibandingkan dengan rokok konvensional (rokok kretek) dikarenakan rokok elektronik sudah canggih dan telah dibekali dengan teknologi, model, warna, dan kapasitas baterai yang modern. Ketersedian rokok elektronik di Indonesia sudah sangatlah banyak dan mudah didapatkan secara langsung maupun *online*. Selain itu ketertarikan terhadap rokok elektronik dikarenakan uap yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan uap dari rokok konvensional (Damayanti, 2016). Kerugian yang diperoleh dari penggunaan rokok elektrik yaitu dapat menimbulkan masalah radikal dikarenakan kandungan nikotin dalam liquid vapor yang dapat menimbulkan efek ketagihan, meningkatnya tekanan darah dan mengganggu kesehatan (Alawiyah, 2017).

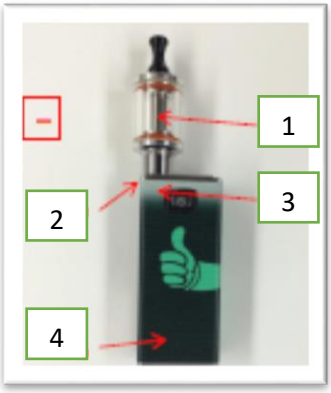
Rokok vapor yang digunakan yaitu merk *tesla* dengan komponen fisik rokok vapor terdiri dari drip tip, atomizer, charge, baterai dan peredam **(Gambar 2.1).** Vapor mempunyai mekanisme yaitu ketika coils (kawat) memiliki sumbu basah dengan 100% *vegetable gliserin* (VG), tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik yang terlihat antara pengukur kawat, jenis kawat, dan konfigurasi kawat. *Vegetable gliserin* (VG) adalah faktor pembatas suhu kawat. Kecenderungan adanya peningkatan suhu dengan penurunan ketebalan kawat dapat terjadi. Jenis kawat dan konfigurasi tersebut berdampak pada output dari temperatur kawat untuk menguapkan e-*liquid*. Tampaknya bahwa media yang gulungannya terendam oleh liquid memiliki dampak yang lebih signifikan dalam output temperatur kawat, juga

dapat menyebabkan dampak dalam ukuran partikel uap yang dihasilkan (Peace dan Turner, 2018).

Hasil proses pembakaran rokok vapor berupa asap yang diperoleh dari pemanasan zat cair yang akan diuapkan. Zat cair dari hasil uap rokok vapor disebut dengan *e-liquid*. Kandungan liquid dalam rokok vapor diantaranya campuran nikotin dalam bentuk cair, propilen glikol, gliserin serta perasa. Kadar nikotin mempunyai banyak inkonsistensi uap dan senyawa organik (seperti propilen glikol) dalam rokok vapor. Partikel-partikel terdispersi dan campuran substansi-substansi kimia dalam bentuk gas terdapat pada asap rokok vapor. Akibat yang ditimbulkan dari paparan asap rokok mempunyai relasi kuat terhadap kerusakan DNA yang dipicu oleh stres oksidatif (Patel dan Rawal, 2008).

Akumulasi oksidan (radikal bebas dalam tubuh yang berlebihan memicu terjadinya stres oksidatif dimana akan menyebabkan kerusakan seperti membran lipid, dan protein sel. Kerusakan sel dapat terjadi dikarenakan radikal bebas akan berikatan dengan komponen membran (*lipid bilayer*) dan kemudian akan menyebabkan perubahan permeabilitas membran, sehingga transport elektron didalam mitokondria menjadi terganggu dan menyebabkan terbentuknya reaksi peroksidasi lipid. Kelebihan radikal bebas dalam tubuh dapat menyebabkan sel mengalami kerusakan dan dapat menyebabkan timbulnya penyakit (Nasution dkk., 2016).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



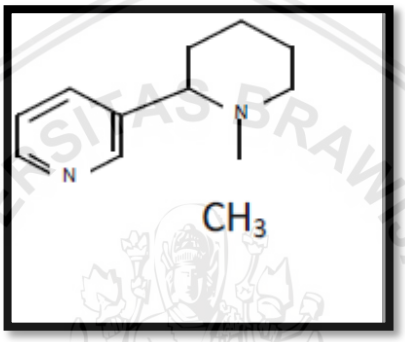
Gambar 2.1 Rokok Elektrik Vapor. Keterangan gambar: (1) drip tip, (2) atomizer tank, (3) steel atomizer (4) baterai dan peredam baterai

2.4 Nikotin ($C_{10}H_{14}N_2$)

Nikotin merupakan suatu senyawa alkaloid utama yang terdapat didalam daun tembakau. Nikotin mempunyai kadar 2-8% tergantung dari spesies tembakau. Nikotin yang terdapat dalam puntung rokok merupakan suatu zat aditif (menyebabkan kecanduan) yang akan mempengaruhi syaraf dan juga peredaran darah apabila mengkonsumsinya dan jika penggunaan nikotin dalam dosis yang tinggi dapat berpengaruh pada tubuh. Zat yang terdapat dalam nikotin mempunyai sifat karsinogenik yang mampu memicu terjadinya kanker paru-paru. Nikotin masuk kedalam golongan alkaloid beracun yang aktif, tidak mempunyai warna, berminyak, tersusun dari beberapa unsur karbon, hidrogen, dan juga nitrogen, mempunyai titik didih 246°C. Sifat kimia nikotin diantaranya larut dalam alkohol, eter, kloroform, dietil eter, dan bensin. Konsentrasi nikotin dalam rokok sekitar 5% dari berat tembakau. Rumus nikotin yaitu $C_{10}H_{14}N_2$ dengan berat molekul 162,23 gr/mol (Aji dkk., 2015).

Keracunan yang terjadi akibat nikotin dapat menyebabkan tubuh menjadi gemetar, kejang-kejang dan bahkan dapat menyebabkan kematian. (Pavia dkk.,

1976). Kadar nikotin sebanyak 4-6 mg yang dihisap oleh seseorang setiap harinya sudah dapat menyebabkan ketagihan. Nikotin berikatan pada reseptor asetilkolin di ganglia dan pada persimpangan neuromuskuler di otak. Nikotin adalah basa lemah yang kurang terionisasi dan akan mudah menembus membran dalam larutan alkali. Nikotin secara luas dimetabolisme di hepar, dan metabolit utama adalah kotinin yang digunakan sebagai suatu penanda asupan nikotin (Benowitz, 1988).



Gambar 2.2 Struktur Nikotin (Aji dkk., 2015)

2.5 Tikus Putih *(Rattus norvegicus)*

Menurut Akbar (2010), klasifikasi tikus putih *(Rattus norvegicus)* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Odontoceti

Familia : Muridae

Genus : Rattus

Spesies : *Rattus norvegicus*

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Gambar 2.3 Tikus Putih *(Rattus norvegicus)* (Akbar, 2010).

Menurut Akbar (2010), tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan pengerat yang memiliki ciri-ciri morfologis seperti albino, kepala kecil, dan ekor yang lebih panjang dibandingkan badannya, pertumbuhan cepat, temperamen baik, kemampuan laktasi tinggi, dan tahan terhadap arsenik tiroksid. Jenis kelamin tikus putih dapat ditentukan dengan membandingkan celah anogenital melalui pengukuran jarak antara alat genital dengan anus dan tonjolan genitalnya (Suckow dkk., 2006). Tikus putih jantan mempunyai ciri ukuran celah anogenital yang lebih panjang dan tonjolan genital yang besar (Fox, 2002).

Menurut Akbar (2010), perkembangbiakan tikus sangat cepat dan sekali beranak tikus mampu menghasilkan sampai 15 ekor, namun rata-rata 9 ekor. Tikus mempunyai nama lain di berbagai daerah di Indonesia, antara lain di Minangkabau orang menyebutnya mencit, sedangkan orang Sunda menyebutnya beurit. Tikus albino (tikus putih) banyak digunakan sebagai hewan percobaan di laboratorium. Tikus putih mempunyai sifat yang menguntungkan sebagai hewan dalam uji penelitian di antaranya perkembangbiakan cepat, mempunyai ukuran yang lebih besar dari mencit, pemeliharaan mudah dalam jumlah yang banyak (**Gambar 2.3).** penggunaan tikus jantan galur *Wistar* sangat mudah digunakan dalam penelitian

dikarenakan sifat yang mudah menyesuaikan diri dengan lingkungan dan sangat mudah ditangani (Smith dan Soesanto, 1987).

Tabel 2.1 Data Biologis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Kondisi Biologi	**Keterangan**
Lama hidup	2,5-3 tahun
Temperatur Tubuh	37,5ºC
Berat badan	- jantan: 300-500 gr - betina: 250-300 gr
Tekanan darah	- sistolik: 84-174 mmHg - diastolik: 58-145 mmHg
Volume darah	57-70 mL/kg
Frekuensi jantung	330-480 /menit
Frekuensi respirasi	66-115 /menit

(Malole dan Purnomo, 1989)

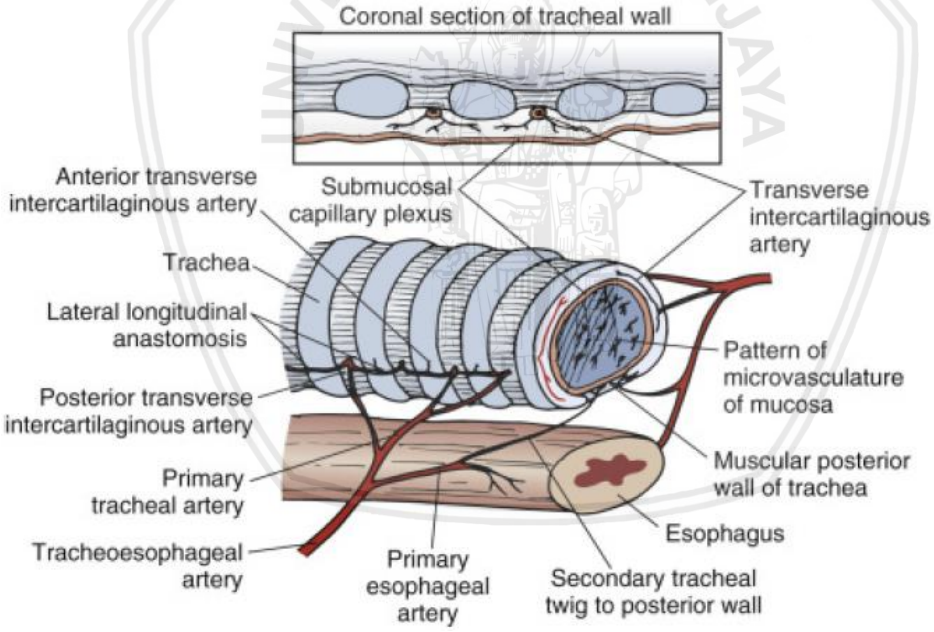
2.6 Trakea

2.6.1 Anatomi Trakea

Trakea merupakan organ dari saluran respirasi bagian atas yang terletak di bawah laring. Trakea dimulai dari setinggi *vertebrae cervicalis* VI dan akan berakhir hingga *angulus sterni* setinggi *vertebrae thoracicae* V-VI. Trakea memiliki percabangan dua yaitu *bronchus principalis dextra* dan *bronchus principalis sinistra.* Bagian sekitar trakea terdapat *arteri carotis communis* dan terdapat juga lobus-lobus *glandulae thyroida.* Trakea tersusun dari cincin kartilago yang berbentuk C (*annulus trachealis*) dan jumlahnya 15 buah (Moore dan Anne,

2013). Bagian posterior trakea yang berbatasan dengan esofagus dihubungkan oleh otot polos yaitu *Musculus* trachealis (G**ambar 2.4)**.

Trakea akan mengalami relaksasi pada saat menelan makanan untuk mempermudah *pasase* makanan dengan memungkinkan esofagus akan menonjol ke dalam lumen trakea dan lapisan esofagus akan mencegah peregangan berlebih di dalam lumen trakea. Trakea pada saat terjadi refleks batuk maka otot akan berkontraksi untuk menyempitkan lumen dari trakea dan kemudian akan meningkatkan kecepatan pengeluaran udara dan melonggarkan materi pada pasase udara (Mescher, 2011).

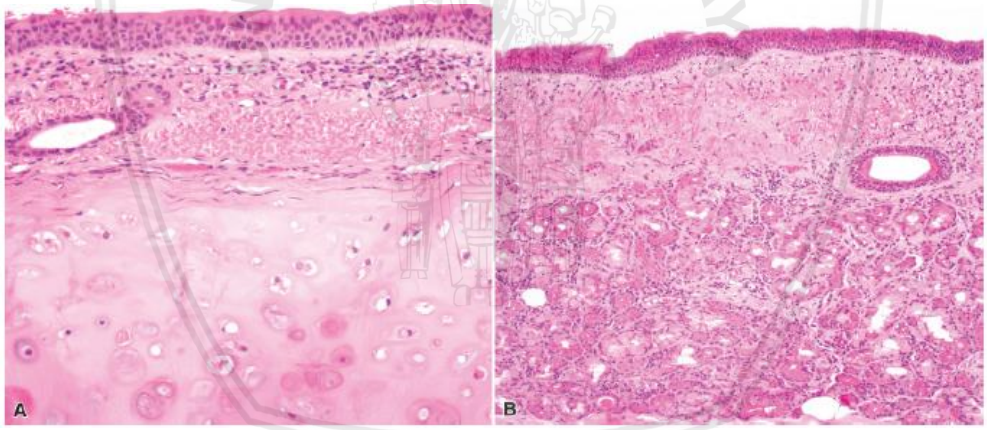


Gambar 2.4 Anatomi trakea (Ott dkk., 2016)

2.6.2 Histologi Trakea

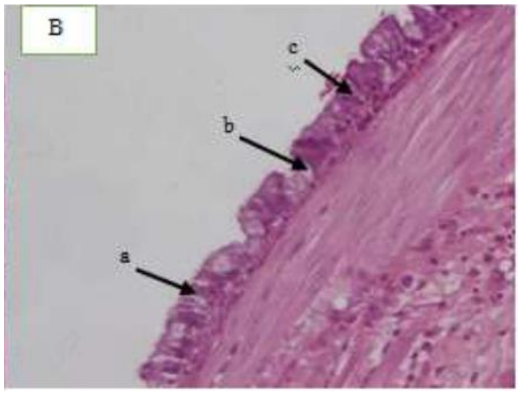
Trakea merupakan pintu gerbang dari saluran pernafasan menuju ke paru-paru. Trakea mempunyai cincin tulang rawan berbentuk huruf C yang kaku dan berfungsi sebagai pelindung dari cedera frontal dan juga mencegah kolaps selama perubahan negatif pada tekanan intratoraks yang terjadi selama respirasi. Sisi

terbuka cincin tulang rawan menghadap ke posterior, dimana otot trakeis mengelilingi trakea. Pengaturan ini memungkinkan esofagus untuk berbatasan dengan sisi trakea. Epitelium pernafasan (*pseudostratified ciliated columnar),* kelenjar submukosa **(Gambar 2.5),** sambil menjebak partikel debu dan tetesan uap kimia sebelum mencapai paru-paru perifer. Penyakit yang mempengaruhi organ trakea akan berpotensi menimbulkan dampak pada fungsi pernapasan dan umum terjadi secara signifikan (Ott dkk., 2016). Menurut Lan (2007), asap rokok dapat mengakibatkan struktur yang penting pada epitel pernafasan berubah, selain itu asap rokok akan mengakibatkan viabilitas sel dan induksi apoptosis pada sel-sel epitel pernafasan **(Gambar 2.6).**



Gambar 2.5 (A) Mukosa trakea erat pada bagian tulang rawan anterior, dengan jaringan subepitel kurang. (B) Posterior, tulang rawan tidak ada kelenjar trakea berlimpah, dan otot menonjol (Ott dkk., 2016).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Gambar 2.6 Gambaran mikroskopis abnormal trakea. (HE 400x). Desiliasi (a) Nekrosis epitel (b) Degenerasi epitel (c) (Wira dkk., 2018).

2.6.3 Fisiologi Pernafasan

Saluran pernafasan terdiri dari hidung, faring, laring, trakea, dan paru-paru. Saluran pernafasan pada laring dibagi menjadi 2 bagian yaitu saluran pernafasan bagian atas dan saluran pernafasan bagian bawah. Pernafasan eksternal (melalui paru-paru) oksigen akan dihirup dari bagian hidung dan juga mulut. Oksigen akan masuk melalui trakea menuju ke bronkus dan kemudian menuju alveolus (sebagai tempat pemisah oksigen (O_2) dan karbon monoksida (CO_2)) kemudian oksigen akan dibawa menuju ke jantung dan selanjutnya dipompa menuju ke seluruh tubuh. Pada tekanan oksigen 100 mmHg darah akan meninggalkan paru-paru dan tingkatan hemoglobinnya 95% (Pearce, 2002).

2.7 TNF Alpha

Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri gram negatif dan mikroba yang lainnya. Infeksi berat dapat memicu produksi dari TNF dalam jumlah yang besar dan menimbulkan reaksi sistemik. Sumber utama dari TNF-α yaitu fagosit mononuklear dan sel T yang kemudian diaktifkan oleh antigen, sel NK (*Natural Killer*), dan sel

mast. Sel mast tersebar luas didalam jaringan ikat dan disemua organ, biasanya ditemukan disekitar pembuluh darah kecil, dan sel mast akan melepaskan histamin. Histamin merupakan mediator utama yang dilepaskan sel mast dan mempunyai peran terhadap respon yang ditimbulkan setelah terpapar alergen. Histamin yang berada didalam tubuh disimpan di lisosom sel mast dan basofil berbentuk granul yang berikatan dengan proteoglikan (Merijanti, 1999). Lipopolisakarida adalah suatu rangsangan poten terhadap makrofag untuk menyekresi TNF. IFN-γ yang diproduksi sel T dan sel NK juga merangsang makrofag yaitu meningkatkan sintesis TNF (Baratawidjaya, 2010).

TNF-α mempunyai beberapa fungsi dalam proses inflamasi diantaranya dapat meningkatkan peran pro-trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang faktor pertumbuhan dan sitokin lain yang berfungsi sebagai regulator dari hematopoetik serta komitogen untuk sel T dan sel B serta aktivitas sel neutrofil dan makrofag. TNF-α juga memiliki fungsi tambahan yang menguntungkan termasuk peranannya dalam respon imun terhadap bakteri, virus, jamur, dan invasi parasit (Supit dan Marunduh, 2015).

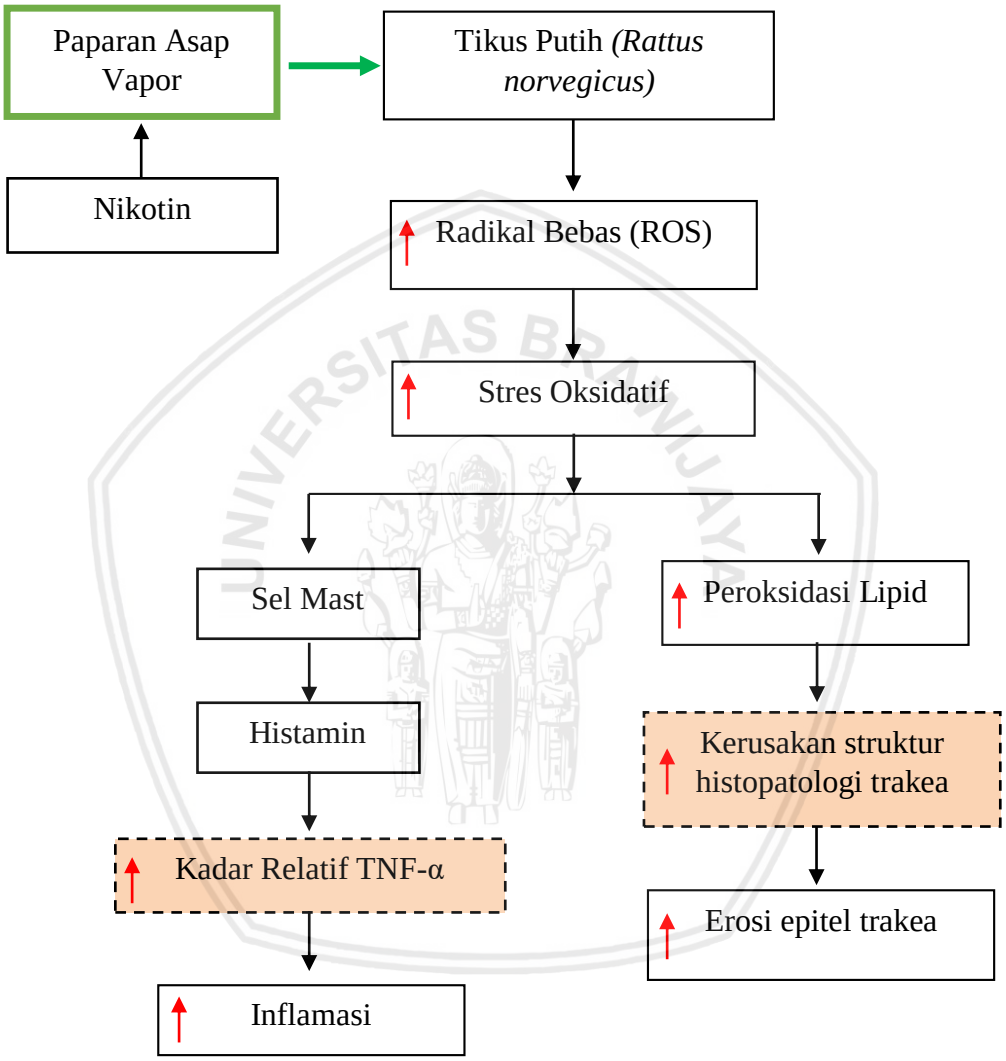
Epitel saluran pernafasan berfungsi sebagai penghalang yang melapisi trakea dan bronkus. Epitel sering mengalami kerusakan selama peradangan yang disebabkan oleh pathogen inhalasi, alergen dan *xenobiotic*. Agen-agen tersebut dapat merangsang epitel itu sendiri untuk melepaskan mediator inflamasi seperti eikosanoid, sitokin atau senyawa kemoterapi yang nantinya dapat mengaktifkan

sel-sel imun untuk menyusup kedalam epitel dan melepaskan sitokin tersebut. Epitel saluran napas secara aktif terlibat dalam respon inflamasi dan tidak hanya target, tetapi juga produsen lokal, dan agen inflamasi. *Tumor necrosis factor alpha* (TNF-α) dapat bertindak sebagai mitogen dan merupakan mediator penting dari respon imun. Hal ini diketahui terlibat dalam *septic shock*, gangguan autoimun. *Tumor necrosis factor alpha* (TNF-α) menjalankan fungsinya dengan mengikat reseptor permukaan sel tertentu (Bader dan Nettesheim, 1996).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangkan Konseptual



Keterangan :

Paparan asap vapor : →

Pengaruh paparan asap vapor : ↑

Variabel Kendali : ▭

Variabel Terikat : ▭

Asap vapor yang diberikan dan dipararkan pada tikus putih *(Rattus norvegicus)* akan terhirup dan masuk kedalam sistem pernafasan tikus. Partikel dan gas (radikal bebas) yang berbahaya bagi tubuh seperti nikotin akan terbawa masuk melewati saluran pernafasan seperti trakea hingga menuju ke paru-paru. Asap vapor yang mengandung nikotin jika dipaparkan secara terus menerus akan menyebabkan peningkatan radikal bebas. Komponen gas dan partikel yang berasal dari asap vapor merupakan sumber radikal bebas eksogen. Partikel-partikel yang berasal dari asap vapor yang menempel pada silia akan di fagosit oleh makrofag (Kristiawan dkk., 2017). Makrofag merupakan salah satu sistem dalam pertahanan tubuh yang akan melepaskan mediator inflamasi dan faktor kemotaktik seperti *tumor necrosis factor-α* (TNF-α). *Tumor necrosis factor-α* (TNF-α) merupakan molekul yang dihasilkan oleh sel, berperan sebagai mediator dari suatu sel yang menginduksi dari suatu sel ke sel lain maupun untuk menginduksi sel itu sendiri (Sudiana, 2008). Respon sistemik dapat muncul karena adanya infeksi yang berat sehingga memicu produksi TNF-α. Makrofag teraktivasi akan memproduksi NOS (*Nitric Oxide Synthase*). Adanya ikatan NOS dan kofaktor akan mengubah *L-arginin* dengan bantuan oksigen yang akan diaktivasi oleh TNF-α. Radikal bebas akan mengaktivasi reaksi hipersensitivitas pada sel mast yang mempengaruhi respons imun tubuh. Menurut Merijanti (1999), reaksi dimulai dengan adanya ikatan antara antigen IgE pada permukaan sel mast dan selanjutnya akan mengalami aktivasi dan melepaskan mediator kimia. Sel T yang merupakan sumber utama dari TNF-α akan disensitisasi melepas limfokin akibat dari pemaparan ulang dengan antigen yang sama. Limfokin akan mengaktifkan makrofag yang selanjutnya melepaskan

mediator serta akan menimbulkan respon inflamasi. Sel mast akan melepaskan histamin yang merupakan mediator kimia ke tempat terjadinya peradangan (Riansyah dkk., 2015). Respon peradangan akibat paparan asap vapor yang mengandung nikotin dapat menyebabkan terjadinya iritasi pada saluran napas (Suryadinata, 2018). Nikotin termasuk zat beracun yang bekerja sangat cepat.

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberikan paparan asap vapor yang mengandung nikotin, maka radikal bebas sebagai oksidan akan menumpuk dalam saluran pernafasan (efek langsung) dan akan mempengaruhi saluran pernafasan tersebut. Akumulasi radikal bebas dalam tubuh yang berlebihan akan mengakibatkan terjadinya stres oksidatif dimana akan menyebabkan kerusakan seperti membran, lipid, dan protein sel. Kerusakan sel dapat terjadi dikarenakan radikal bebas akan berikatan dengan komponen membran (*lipid bilayer*) dan kemudian akan menyebabkan perubahan permeabilitas membran, sehingga terganggunya transport membran, mengakibatkan rekasi perkosidasi lipid terbentuk. Radikal bebas dapat terbentuk karena adanya gangguan dalam transport elektron dalam mitokondria.

Partikel-partikel asap yang menempel pada saluran pernapasan akan menyebabkan kerusakan struktur histopatologi trakea dapat diamati dari adanya erosi, yang merupakan ciri dari kerusakan yang diakibatkan oleh aktivitas radikal bebas. Sel epitel kemudian akan terlepas dari membran basalis (Vegad, 2007). Asap vapor yang dipaparkan akan menyebabkan erosi silia dari epitel trakea, dikarenakan adanya iritasi dibagian lapisan mukosa trakea yang tersusun dari sel epitel (Febriyanti dan Suryati, 2014). Perubahan struktural pada epitel pernapasan

dikarenakan asap akan mengakibatkan penurunan viabilitas sel dan induksi apoptosis pada sel-sel silia epitel pernapasan (Lan dkk., 2007). Peningkatan jumlah sel goblet dan produksi mukus pada saluran pernafasan juga dapat ditimbulkan karena paparan asap. Sel goblet akan menghasilkan mukus yang mana mukus tersebut berfungsi sebagai pertahanan pada permukaan saluran pernafasan (Mc Gavin dan Zachary, 2007). Pemberian paparan yang lebih tinggi dapat mengakibatkan kehilangan silia epitel dan peradangan (Gaworski dkk., 1998).

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep penelitian diatas, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

a. Pemberian paparan asap vapor dapat mempengaruhi kadar relatif TNF-α pada trakea tikus putih *(Rattus norvegicus)*
b. Pemberian paparan asap vapor dapat mempengaruhi histopatologi trakea pada tikus putih *(Rattus norvegicus)*

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, yang digunakan sebagai tempat perlakuan dan penelitian, Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya Malang, yang digunakan sebagai tempat pembuatan preparat histopatologi trakea. Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang yang digunakan untuk pengujian kadar TNF-α organ trakea. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Februari 2018.

4.2 Populasi dan Sampel

Hewan coba yang digunakan pada penelitian kali ini dengan menggunakan tikus putih *(Rattus norvegicus)* jantan, strain *Wistar*, berumur 8-12 minggu, dan berat badan 150-200 gram.

4.3 Alat dan Bahan

4.3.1 Alat

Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini diantaranya; kandang hewan coba, botol air minum untuk hewan coba, kertas label, wadah pakan hewan coba, vapor, charger vapor, alat penyedot, tissue, glove, masker, pot sampel, alat bedah, setrifugasi, mortar, gelas ukur, vortex, tabung reaksi, *object glass, cover glass*,

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

tabung falcon, mikroskop cahaya, mikropipet, *flowcytometry* tube, *yellow tip, blue tip, ice box, flowcytometer*, rak tabung.

4.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini diantaranya; tikus putih jantan, strain *Wistar*, dengan umur 8-12 minggu, berat badan berkisar 150-200 gram sebanyak 20 ekor, *liquid* vapor dengan dosis berbeda, kapas vapor, air minum, pakan pellet, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), NaCl fisiologis, aquadest, *Xylol* bertingkat, alkohol bertingkat, larutan formalin 10%, blok parafin, pewarna *Hematoxylin Eosin* (HE), *paraformaldehyde* (PFA) 4%, parafin cair dan cetakan parafin cair dan Antibodi TNF-α.

4.4 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan 3 variabel yaitu veriabel bebas, variabel terikat dan variabel kontrol meliputi:

Variabel bebas : Dosis nikotin yang berada dalam *liquid vapor*, volume *liquid vapor*, dan lama paparan asap vapor

Variabel terikat : Kadar Relatif TNF-α dan histopatologi trakea

Variabel kontrol : Jenis kelamin, strain *Wistar*, umur, berat badan, suhu, kelembaban kandang, dan pakan hewan coba tikus *(Rattus norvegicus)*

4.5 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan kali ini bersifat eksperimental dengan desain *post-test only control group* menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan penelitian kali ini sebagai berikut:

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Keterangan	Variabel yang diamati
		Kadar Relatif TNF-α dan Histopatologi Trakea
Kontrol Negatif	Tanpa Perlakuan	
Perlakuan 1	Paparan asap rokok vapor selama 14 hari tanpa nikotin	
Perlakuan 2	Paparan asap rokok vapor selama 14 hari dengan nikotin 3 mg/hari	
Perlakuan 3	Paparan asap rokok vapor selama 14 hari dengan nikotin 6 mg/hari	
Perlakuan 4	Paparan asap rokok vapor selama 14 hari dengan nikotin 9 mg/ hari	

4.6 Penetapan Jumlah Perlakuan dan Ulangan

Penelitian kali ini menggunakan hewan coba tikus putih *(Rattus norvegicus)* jantan, strain *Wistar*, berumur 8-12 minggu, berat badan rata-rata 150-200 gram. Menurut Kusriningrum (2008), estimasi besar sampel dapat dihitung berdasarkan rumus:

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

$5\ (n-1) \geq 15$

$5n-5 \geq 15$

$5n \geq 20$

$n \geq 4$

Keterangan:

p = Jumlah kelompok perlakuan

n = Jumlah ulangan yang diberikan

Berdasarkan perhitungan yang dijelaskan diatas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok dan hewan coba yang diperlukan dalam penelitian sebanyak 20 ekor.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Aklimatisasi

Aklimatisasi atau adaptasi hewan coba dilakukan dengan cara tikus di letakkan dalam kandang selama 7 hari dengan tujuan mengadaptasikan hewan coba pada lingkungan yang baru. Tahapan kali ini dilakukan pengamatan terhadap keadaan umum hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*).

4.7.2 Pemaparan Asap Vapor

Pada penelitian kali ini kelompok perlakuan 1, 2, 3, dan 4 dimasukkan kedalam kotak kaca yang sudah diberi ventilasi udara dan lubang yang terletak diatas dinding kotak kaca untuk masuknya asap rokok vapor. Penyedot diletakkan pada lubang atas kotak kaca dan kemudian dihidupkan untuk menyedot asap dari alat vapor. Penggunaan alat vapor setiap pemaparan yaitu selama 15 menit yang dilakukan pada pagi, siang dan sore selama 14 hari. Menurut Adyttia dkk., (2014) menyebutkan bahwa tikus sebagai perokok pasif.

4.7.3 Pengambilan Organ Trakea

Pengambilan organ trakea pada tikus putih (*Rattus norvegicus)* akan dilakukan pada hari ke-22. Pengambilan bagian trakea dilakukan dengan bedah thorax. Langkah awal untuk mengambil organ trakea yaitu dengan melakukan dislokasi pada bagian leher tikus putih (*Rattus norvegicus),* kemudian akan dilakukan pembedahan dan organ trakea diisolasi. Setelah organ trakea berhasil diisolasi kemudian dimasukkan kedalam pot sampel yang sudah berisi larutan PBS steril untuk dilakukan pengujian kadar TNF-α dan sebagian trakea dimasukkan

kedalam pot sampel yang berisi formalin 4% untuk dilakukan pemeriksaan histopatologi.

4.7.4 Pembuatan Preparat Histopatologi Trakea dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan dan dimulai dengan melakukan fiksasi organ yaitu dengan merendam organ trakea dalam larutan *paraformaldehyde* (PFA) 4% selama kurang lebih 24 jam. Metode fiksasi mempunyai tujuan untuk mencegah jaringan mengalami kerusakan, menjaga komponen sitologi dan histologi tetap awet, menghentikan proses metabolisme, dan mengeraskan material-material yang lunak supaya jaringan bisa terwarnai. Menurut Junqueira dan Carneiro (2005)., proses pembuatan preparat histopatologi pada berbagai macam organ dapat dilakukan dalam beberapa tahapan yang terdiri dari *dehidrasi, clearing, embedding, sectioning, dan mounting*. Tahapan awal pembuatan preparat histopatologi yaitu dehidrasi, dilakukan dengan cara mengeluarkan air yang terdapat didalam jaringan agar dapat terisi oleh parafin sehingga memudahkan untuk diiris tipis. Kemudian organ trakea dimasukkan dalam alcohol bertingkat 70%, 80%, 90% dan 95% dengan waktu yang digunakan masing-masing selama 5 menit. *Clearing*, atau disebut dengan proses penjernihan organ. Organ trakea kemudian dimasukkan kedalam xylol I selama 1 jam, xylol II selama 30 menit, dan xylol III selama 30 menit. *Embedding*, yaitu organ yang dimasukkan kedalam parafin cair bersuhu 56^0C dengan waktu selama 2 jam dan kemudian akan diambil menggunakan alat pinset dan dilanjutkan ke blok parafin. *Sectioning*, merupakan tahapan dari proses pemotongan blok parafin dengan alat

yang digunakan yaitu mikrotom, pemotongan organ dengan ketrebalan sekitar 5 µm dengan tujuam agar tembus cahaya saat dilakukan pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya, setelah proses tersebut kemudian direndam kedalam water bath dengan suhu 40^0C. Awal proses pemotongan organ dilakukan *trimming* dikarenakan potongan jaringan masih belum sempurna. *Mounting*, merupakan proses penempelan blok parafin yang sudah dilakukan pemotongan dengan ditempel pada object glass. Setelah dilakukan penempelan, kemudian dikeringkan diatas hot plate bersuhu 38-40^0C sampai kering, dan dimasukkan kedalam mesin inkubator dengan suhu 37^0C selama 24 jam dan selanjutnya masuk ke tahapan pewarnnaan dan diwarnai menggunakan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*), dengan larutan *hematoxylin* tersebut akan memberikan warna biru tua pada atau ungu (basofilik) pada bagian inti selnya dan larutan *eosin* tersebut akan memberikan warna pink atau merah muda pada bagian sitoplasma (Wati dkk., 2013). Prosedur pewarnaan HE dapat dilihat pada **(Lampiran 3.2).**

4.7.5 Pengamatan Histopatologi Trakea

Pengamatan histopatologi organ trakea dilakukan secara kualitatif menggunakan mikroskop cahaya *Olympus* BX51 dengan perbesaran 100X dan 400X untuk melihat perubahan pada sel epitel organ trakea yang ditandai adanya erosi dan perubahan lainnya. Pengamatan dilakukan dengan mengamati 5 lapang pandang.

4.7.6 Pengujian TNF-α Menggunakan Teknik *Flowcytometry*

Flowcytometry adalah alat canggih yang memiliki fungsi untuk mengukur berbagai macam karakteristik fisik dari suatu sel seperti ukuran dan granularitas

secara bersamaan ketika sel mengalir dalam suspensi melalui alat pengukur. Kerja alat ini tergantung pada fitur hamburan cahaya sel yang diselidiki, bisa berasal dari pewarna atau antibodi monoklonal yang menargetkan molekul ekstraseluler yang terletak pada permukaan atau molekul intraseluler yang berada didalam sel (Adan dkk., 2016). Menurut Muti'ah (2016), *flowcytometry* merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk menganalisa berbagai jenis sel yang berada didalam suatu populasi sel. Teknologi yang digunakan ini secara simultan mampu menghitung dan mengkarakterisasi dari berbagai macam sifat fisika partikel tunggal (sel). *Flowcytometry* mampu menganalisa suspensi partikel atau sel yang mempunyai ukuran 0,2-150 μm. Prinsip kerja dari *flowcytometry* yaitu pada setiap sel akan dialirkan dalam sistem fluida, lalu ditembak dengan menggunakan pancaran sinar laser, kemudian disebarkan oleh setiap sel. Sinar laser tersebut akan mengaktivasi senyawa fluoresen yang terdapat dalam sel tersebut. Setiap sinyal sinar yang disebarkan atau yang difluoresensikan akan diubah menjadi impuls elektrik sehingga terdeteksi dan tersimpan sebagai data yang berada dalam sistem komputer yang tersambung dengan alat tesebut. Sel yang melewati berkas sinar laser yang ditembakkan akan menimbulkan sinyal elektronik yang nantinya dicatat oleh instrumen sebagai karakteristik sel bersangkutan. Setiap karakteristik molekul pada permukaan sel atau yang terdapat didalam sel dapat teridentifikasi menggunakan satu atau lebih *probe.* Instrumen tersebut mampu mengidentifikasi setiap jenis aktivitas sel dan menghitung jumlah masih-masing populasi campuran. Sel yang melewati berkas sinar laser akan menyebabkan sinar laser terpencar (*scattered*) ke dua arah, yaitu *forward scatter* (FSC), pararel dengan arah sinar

dan *side scatter* (SSC), mempunyai arah tegak lurus dengan arah sinar laser. Besarnya FSC akan berbanding lurus yang menggambarkan ukuran atau volume sel. Sel yang mati akan terlihat lebih kecil dibandingkan sel yang masih hidup. Sinyal kemudian dikonversikan menjadi angka-angka digital dengan hasil yang diperlihatkan pada suatu histogram yang dianalisis untuk memperoleh suatu informasi mengenai karakteristik sel bersangkutan (Koeswardani dkk., 2001).

4.7.7 Pengukuran Kadar TNF-α Menggunakan Teknik *flowcytometry*

Pengujian *flowcytometry* untuk menghitung kadar TNF-α yang didapatkan menggunakan sampel berupa organ trakea tikus putih (*Rattus norvegicus*). Nekropsi tikus dilakukan dengan mengambil organ trakea dan kemudian dibilas dengan NaCl fisiologis sebanyak 0,9%, dan diletakkan pada cawan petri yang telah berisi 5 ml NaCl fisiologis. Organ trakea lalu digerus menggunakan pangkal dari spuit, kemudian diambil menggunakan spuit dan dimasukkan dalam tabung eppendorf. Organ dalam tabung eppendorf disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm dengan durassi 5 menit bersuhu 4°C, dan dibuang cairan supernatant dalam tabung lalu diambil peletnya. Setelah pelet diambil kemudian ditambahkan 50 µl antibodi intraseluler staining TNF-α menggunakan FITC, dan dimasukkan dalam kuvet *flowcytometry* kemudian di lakukan *running*.

4.8 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini yaitu data kuantitatif dari hasil pengujian kadar relatif TNF-α dalam tersedia dalam bentuk histogram pada masing-masing kelompok perlakuan, dan akan dianalisis menggunakan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dengan taraf kepercayaan sebesar 95% (α=0,05). Selanjutnya apabila

terdapat perbedaan hasil diantara kelompok perlakuan makan hasil akan dianalisis dengan uji BNJ (Beda Nyata Jujur) atau uji Tukey (α=5%) dengan dibantu menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Package for The Social Science*) version 25.0 for windows. Sedangkan data kualitatif berupa gambaran histopatologi yang diperoleh dari masing-masing kelompok perlakuan akan dijelaskan secara deskriptif.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Asap Vapor Dengan Perbedaan Dosis Nikotin Terhadap Kadar Relatif TNF-α Trakea Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Pengaruh asap vapor dengan dosis nikotin yang berbeda terhadap kadar relatif TNF-α yang diukur menggunakan metode *flowcytometry* dan digunakan sampel berupa organ trakea tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Tabel 5.1 Rata-rata Kadar Relatif TNF-α pada Trakea Tikus Putih *(Rattus norvegicus)* Seluruh Kelompok

Kelompok	Rata-rata Kadar TNF-α (%) ± SD
Kontrol (-)	24,81 ± 2,608[a]
P1 (pemaparan asap vapor tanpa nikotin)	34,89 ± 3,576[ab]
P2 (pemaparan asap vapor dengan nikotin 3 mg/hari)	40,70 ± 6,448[b]
P3 (pemaparan asap vapor dengan nikotin 6 mg/hari)	54,19 ± 7,143[c]
P4 (pemaparan asap vapor dengan nikotin 9 mg/hari)	67,33 ± 3,082[d]

Keterangan: Notasi a, b, c dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p<0,05$) antar perlakuan

Hasil kadar relatif TNF-α dari kelompok perlakuan yang mempunyai nilai rata-rata kadar relatif TNF-α terendah, yaitu kelompok kontrol (-) sebesar 24,81%. Pada kelompok P1 (pemaparan asap vapor tanpa nikotin) mempunyai nilai rata-rata kadar relatif TNF-α sebesar 34,89%. Kelompok P2 (pemaparan asap vapor dengan nikotin 3 mg/hari) mempunyai nilai rata-rata kadar relatif TNF-α sebesar 40,70%. Kelompok P3 (pemaparan asap vapor dengan nikotin 6 mg/hari) mempunyai nilai

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

rata-rata kadar relatif TNF-α sebesar 54,19% dan kelompok P4 (pemaparan asap vapor dengan nikotin 9 mg/hari) mempunyai nilai rata-rata kadar relatif TNF-α sebesar 67,33%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kelompok P1 tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol (-). Sedangkan kelompok P2, kelompok P3 dan kelompok P4 menunjukkan hasil yang berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol (-) **(Tabel 5.1).**

Peningkatan yang terjadi akibat paparan asap vapor dengan perbedaan dosis nikotin yang diberikan selama 14 hari dapat menyebabkan sel mengalami kerusakan. Radikal bebas akan mengaktivasi reaksi hipersensitivitas pada sel mast yang mempengaruhi respons imun tubuh. Menurut Merijanti (1999), reaksi dimulai dengan adanya ikatan antara antigen IgE pada permukaan sel mast dan selanjutnya akan mengalami aktivasi dan melepaskan mediator kimia. Sel T yang merupakan sumber utama dari TNF-α akan disensitisasi melepas limfokin akibat dari pemaparan ulang dengan antigen yang sama. Limfokin akan mengaktifkan makrofag yang selanjutnya melepaskan mediator serta akan menimbulkan respon inflamasi. Sel mast akan melepaskan histamin yang merupakan mediator kimia ke tempat terjadinya peradangan (Riansyah dan Choesrina, 2015). Terjadinya inflamasi akan mengakibatkan kadar relatif TNF-α meningkat. Respon peradangan akibat paparan asap vapor yang mengandung nikotin dapat menyebabkan terjadinya iritasi pada saluran napas (Suryadinata, 2018). Pengaruh paparan asap vapor dengan pemberian dosis nikotin yang berbeda tersebut juga dapat menyebabkan viabilitas sel menurun dengan induksi apoptosis pada sel epitel trakea (Lan dkk., 2007). Partikel-partikel debu yang menempel pada silia akan di fagosit oleh makrofag

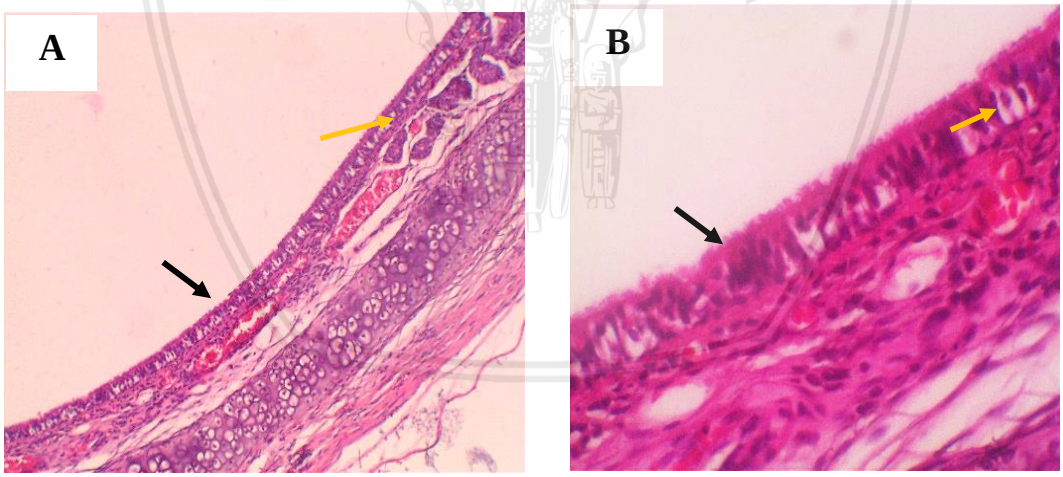
(Kristiawan dkk., 2017). Makrofag merupakan salah satu sistem dalam pertahanan tubuh dimana akan melepaskan mediator inflamasi dan faktor kemotaktik seperti *tumor necrosis factor-α* (TNF-α). *Tumor necrosis factor-α* (TNF-α) merupakan sitokin utama pada respon inflamasi. Sumber utama dari TNF-α yaitu fagosit mononuclear dan sel T yang kemudian akan diaktifkan oleh antigen, sel NK (*Natural Killer*), dan sel mast (Bratawidjaya, 2010). Radikal bebas yang berasal dari asap rokok vapor akan masuk kedalam tubuh dan kemudian terjadi respon inflamasi yang ditunjukkan dengan meningkatnya produksi mediator pro inflamasi.

Berdasarkan penelitian tersebut nilai rata-rata kadar relatif TNF-α mengalami kenaikan secara berturut-turut pada kelompok P2, kelompok P3, dan kelompok P4. Hal tersebut menunjukkan bahwa dosis nikotin yang diberikan semakin besar akan meningkatkan kadar TNF-α trakea tikus yang dipapar asap vapor. Hasil perbandingan kelompok P2, kelompok P3, dan kelompok P4 terhadap kelompok P1 menunjukkan bahwa kelompok yang mempunyai presentase kenaikan nilai kadar relatif TNF-α yang paling tinggi terdapat pada kelompok P4.

5.2 Pengaruh Asap Vapor Dengan Perbedaan Dosis Nikotin Terhadap Histopatologi Trakea Tikus Putih *(Rattus norvegicus)*

Pada penelitian untuk mengetahui pengaruh dari paparan asap vapor dengan perbedaan dosis nikotin terhadap gambaran histopatologi trakea pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat diwarnai menggunakan metode pewarnaan *Hematoxylin-Eosin* (HE). Pengamatan hasil kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran yang digunakan yaitu perbesaran 100x dan 400x.

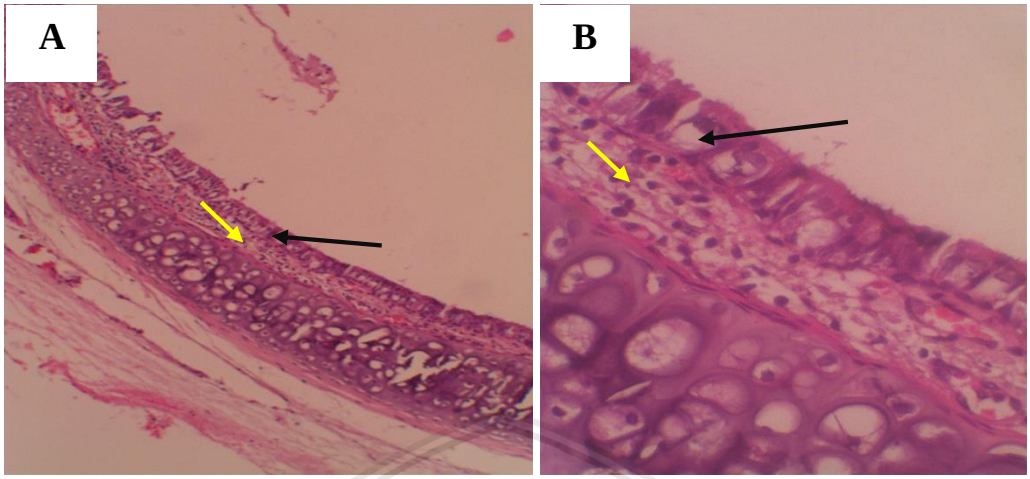
Pengaruh asap vapor dengan perbedaan dosis nikotin terhadap gambaran histopatologi organ trakea tikus putih *(Rattus norvegicus)* menunjukkan perbedaan dari 5 kelompok. Kelompok kontrol (-) merupakan gambaran normal dari organ trakea yang terdiri dari tunika mukosa, tunika sub mukosa, tunika muskularis dan tunika adventitia. Organ trakea mempunyai lapisan epitel kolumar dan pseudokomplek bersilia dengan sel goblet. Terdapat lamina propria dan submukosa yang terletak di bawah epitel trakea, namun tidak begitu jelas antara satu dengan lainnya. Trakea mempunyai tulang rawan hialin yang membentang secara dorsal untuk menopang dinding trakea. Pada bagian dorsal trakea terdiri dari otot polos, otot trakealis (Bacha dan Bacha, 2012). Sel epitel normal trakea masih mempunyai silia dan terdapat sel goblet (**Gambar 5.2**).



Gambar 5.2 Histopatologi Trakea Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Kelompok Kontrol (-) dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) perbesaran 100x (A) dan 400x (B).

Keterangan : ↑ : Sel Epitel normal, ↑ : Sel Goblet normal

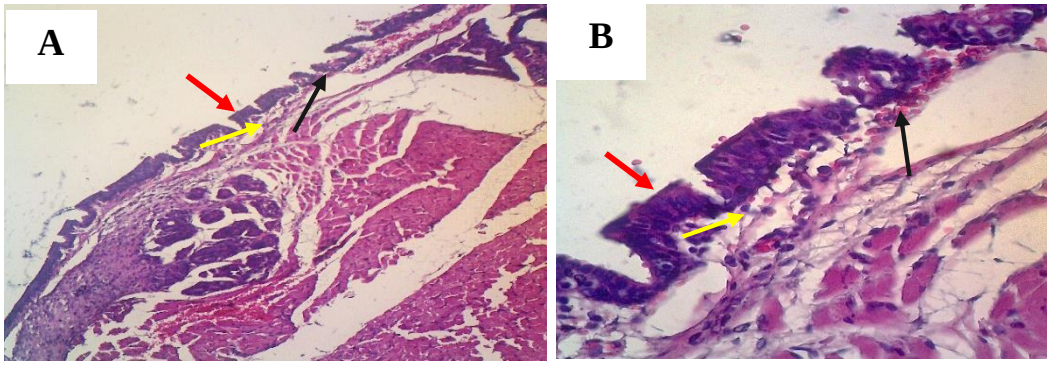
repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Gambar 5.3 Histopatologi Trakea Tikus Putih *(Rattus norvegicus)* Kelompok Perlakuan 1 (P1) dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) perbesaran 100x (A) dan 400x (B)

Keterangan : ↑ : Sel Makrofag ↑ : Nekrosis

Hasil gambaran histopatologi trakea yang diberi paparan asap vapor dengan dosis nikotin 0 mg/hari, pada kelompok perlakuan 1 (P1) dengan metode pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) tampak mengalami perubahan pada lapisan mukosa dengan ditandai adanya sel makrofag pada bagian mukosa trakea. Sel makrofag menginisiasi peningkatan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF-α). Peningkatan kemampuan sel makrofag atau makrofag teraktivasi merupakan kemampuan secara morfologis, metabolisme, dan fungsional untuk melenyapkan agen infeksi yang berada di dalam tubuh. Makrofag mempunyai kemampuan menghasilkan sekresi sel yang dikenal dengan *interleukin* (IL) dan *tumor necrosis factor-alpha* (TNF-α) juga akan mengalami meningkat (Besung dkk., 2016). Lapisan mukosa juga mengalami nekrosis dengan inti sel kariopiknotik atau inti sel menjadi gelap. Nekrosis merupakan sel yang mengalami kematian disebabkan karena injury atau infeksi (Lumongga, 2008).

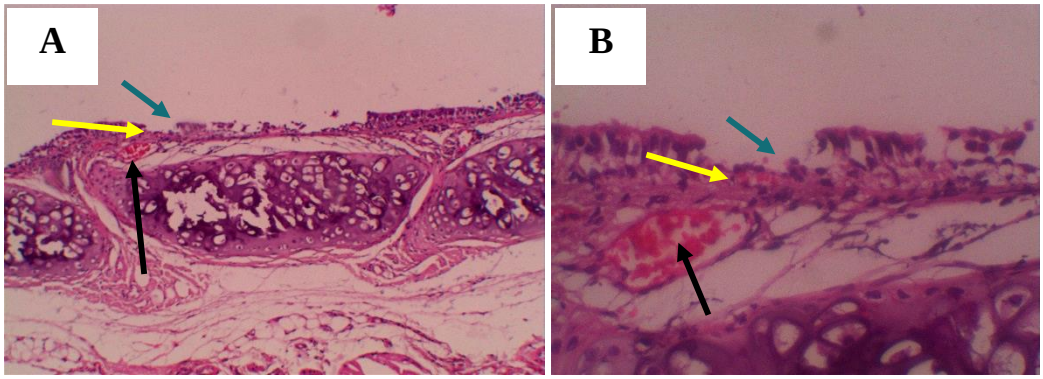


Gambar 5.4 Histopatologi Trakea Tikus Putih *(Rattus norvegicus)* Kelompok Perlakuan 2 (P2) dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin (HE)* perbesaran 100x (A) dan 400x (B)

Keterangan : ↑ : Degenerasi Epitel ↑ : Sel Makrofag ↑ : Hemoragi

Hasil pengamatan gambaran histopatologi trakea yang diberikan paparan asap vapor dosis nikotin 3 mg/hari pada kelompok perlakuan 2 (P2) dengan metode pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) nampak sel epitel mengalami degenerasi epitel dan pada bagian epitel trakea dan bagian mukosa trakea terdapat persebaran jumlah sel makrofag lebih banyak dibandingkan kelompok perlakuan 1 (P1). Degenerasi merupakan perubahan abnormalitas dari suatu jaringan atau sel. Perubahan morfologi akan berkaitan dengan abnormalitas fungsional (Pinem dkk., 2016). Infeksi yang berada di dalam tubuh akan menyebabkan munculnya berbagai macam respon imun yang berawal dari peningkatan sel fagosit menuju sumber infeksi. Sel fagosit seperti neutrofil maupun makrofag akan bergerak menuju sumber rangsangan, dan akan memfagosit sel yang dianggap asing (Besung dkk., 2016). Bagian mukosa trakea juga mengalami hemoragi tetapi tidak terlalu banyak. Hemoragi merupakan suatu keadaan darah yang keluar dari pembuluh darah (Adleend, 2015).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

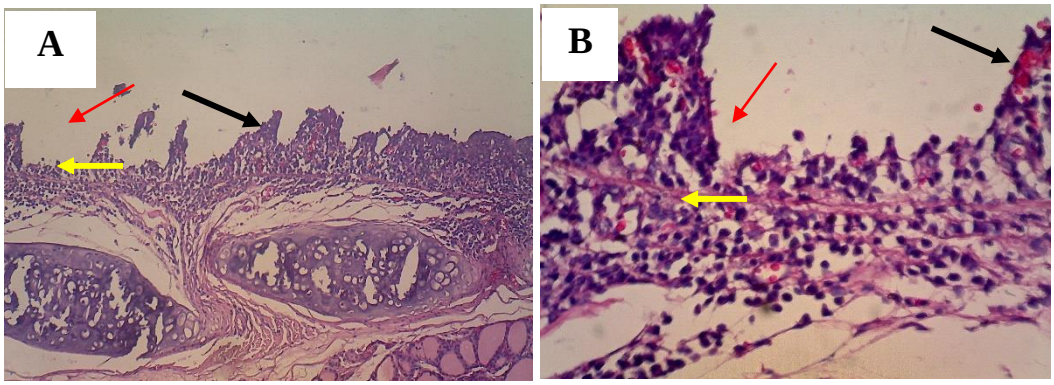


Gambar 5.5 Histopatologi Trakea Tikus Putih *(Rattus norvegicus)* Kelompok Perlakuan 3 (P3) dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) perbesaran 100x (A) dan 400x (B)

Keterangan : ↑ : Erosi Epitel ↑ : Sel Makrofag ↑ : Kongesti

Hasil pengamatan gambaran histopatologi trakea yang diberikan paparan asap vapor dosis nikotin 6 mg/hari pada kelompok perlakuan 3 (P3) dengan metode pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) nampak bagian epitel trakea sudah mengalami erosi. Erosi merupakan suatu daerah yang kehilangan sebagian mukosa (Wicaksono, 2002). Erosi epitel akan ditandai dengan lepasnya sel epitel dari membran basalis yang akan menyebabkan jumlah sel menjadi berkurang dan sel mengalami suatu kondisi yang disebut dengan atrofi (Vegad, 2007). Bagian mukosa trakea terlihat persebaran sel makrofag yang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 (P2). Bagian sub mukosa trakea terlihat mengalami kongesti. Kongesti merupakan keadaan dimana darah akan mengalami penimbunan darah didalam pembuluh darah yang melebar (Rosita, 2013).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Gambar 5.6 Histopatologi Trakea Tikus Putih *(Rattus norvegicus)* Kelompok Perlakuan 4 (P4) dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) Perbesaran 100x (A) dan 400x (B)

Keterangan : ↑ : Erosi Epitel ↑ : Sel Makrofag ↑ : Hemoragi

Hasil pengamatan gambaran histopatologi trakea yang diberikan paparan asap vapor dosis paling tinggi yaitu 9 mg/hari dengan metode pewarnaan *Hematoxylin Eosin* nampak terdapat perubahan pada bagian epitel trakea yang terlihat mengalami erosi epitel lebih parah dan pada bagian mukosa terdapat persebaran sel makrofag dengan jumlah banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan 3 (P3). Pemberian paparan asap vapor dengan dosis tertinggi menandakan peningkatan sel makrofag dalam jumlah banyak. Makrofag merupakan salah satu sistem dalam pertahanan tubuh dimana akan melepaskan mediator inflamasi dan faktor kemotaktik seperti *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) (Baratawidjaya, 2010). Bagian epitel trakea mengalami hemoragi namun tidak terlalu banyak. Hemoragi merupakan suatu keadaan darah yang keluar dari pembuluh darah (Adleend, 2015).

Pengamatan hasil histopatologi organ trakea tersebut, dapat diketahui bahwa pada kelompok P1, kelompok P2, kelompok P3, dan kelompok P4, kerusakan histopatologi trakea didominasi oleh erosi epitel dan terdapat persebaran

sel makrofag dengan jumlah sel makrofag paling banyak pada kelompok perlakuan 4 (P4). Pengaruh paparan asap rokok vapor dapat menyebabkan struktur epitel mengalami perubahan dan juga dapat menyebabkan viabilitas sel menurun dengan induksi apoptosis pada sel epitel trakea (Lan dkk., 2007). Partikel-partikel yang menempel pada silia akan di fagosit oleh makrofag (Kristiawan dkk., 2017). Makrofag merupakan salah satu sistem dalam pertahanan tubuh dimana akan melepaskan mediator inflamasi dan faktor kemotaktik seperti *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), interleukin IL-6, interleukin IL-8, *Monocyte Chemotactic Peptide* (MCP)-1 dan juga spesies oksigen reaktif. Faktor kemotaktik yang telah disekresikan dapat merangsang terjadinya pergerakan neutrofil menuju ke saluran pernapasan sehingga menyebabkan hipersekresi mukus pada submukosa dan juga sel goblet pada saluran pernafasan seperti trakea (Suryadinata, 2018).

Pada penelitian ini mikroskopis trakea terlihat mengalami perubahan histopatologi berupa jumlah sel makrofag meningkat yang menandakan menandakan adanya respon inflamasi. Terdapatnya sel makrofag dikarenakan paparan asap vapor secara berlebihan sehingga mengakibatkan radikal bebas yang berasal dari uap asap rokok vapor. Radikal bebas dapat menyebabkan stres oksidatif yang akan mengasilkan perlukaan secara langsung dan mengaktivasi terjadinya mekanisme molekuler yang menginisiasi inflamasi. Inflamasi merupakan suatu respon kompleks biologi yang berasal dari jaringan pembuluh darah terhadap suatu stimulus yang berbahaya seperti sel-sel tubuh yang rusak, patogen, atau iritan. Reaksi vascular yang hasilnnya diantaranya pengiriman cairan, zat-zat yang terlarut dan juga sel-sel dari sirkulasi darah menuju jaringan interstitial pada daerah cedera

atau nekrosis merupakan reaksi terjadinya suatu inflamasi (Nazarudin dkk., 2017). Tanda terjadinya inflamasi diantaranya rasa sakit, kemerahan, bengkak, nyeri, dan disfungsi jaringan maupun organ. Hal tersebut merupakan respon protektif oleh tubuh akibat kerusakan jaringan yang disebabkan oleh stimulus. Inflamasi merupakan gejala terjadinya suatu penyakit kronis (Ehlers dkk., 2010). Dampak yang ditimbulkan dari paparan asap vapor dapat mempengaruhi terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif dapat disebabkan peningkatan radikal bebas dalam tubuh (Kristiawan dkk., 2017).

Kerusakan sel disebabkan peningkatan radikal bebas oleh faktor eksternal asap rokok vapor. Sel akan kehilangan kontrol dalam mekanisme menjaga tekanan osmolaritas membran sel yang diakibatkan terjadinya lesi sel. Keseimbangan menjaga tekanan osmolaritas disebut *sodium pump,* yaitu mineral intraseluler sodium (Na) menekan cairan sel keluar dan mineral ekstraseluler potasium (K) mempunyai sifat menekan ke dalam membran sel. Seluruh reaksi yang terjadi memerlukan energi ATP-ase dan Na pada membran sel dari mitokondria. Jika adanya peningkatan tekanan dalam sel, maka cairan sitoplasma akan berpindah ke dalam sel dan terjadi pembengkakan (Pinem dkk., 2016).

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Pemberian paparan asap vapor yang diberikan selama 14 hari dengan kadar nikotin sebesar 0 mg/hari, 3 mg/hari, 6 mg/hari, dan 9 mg/hari mempengaruhi kadar relatif TNF-α organ trakea tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian paparan asap vapor yang diberikan selama 14 hari dengan kadar nikotin sebesar 0 mg/hari, 3 mg/hari, 6 mg/hari dan 9 mg/hari mempengaruhi histopatologi yang ditandai dengan kerusakan sel epitel trakea tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan meningkatnya jumlah sel makrofag.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diketahui saran yang dapat dilakukan yaitu perlu dilakukannya penelitian dengan durasi lebih lama dan perlu dilakukannya pengujian lain seperti uji kadar MDA atau uji kadar SOD untuk mengetahui seberapa besar kerusakan yang terjadi.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

DAFTAR PUSTAKA

Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, y., and Nalbant, A. 2016. *Flow cytometry: basic principles and applications*. Faculty of Life and Natural Sciences, Abdullah Gul University, Turkey.

Adleend. Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Setelah Pemberian Meloxicam Dosis Toksik [Skripsi]. Makassar: Universitas Hasanuddin.

Adyttia, A. E., Untari, K., dan Wahdaningsih S. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Buas-Buas (*Premna cordifolia*. LINN) terhadap Kadar MDA Tikus Wistar Jantan Pasca Paparan Asap Rokok. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 1(2): 35-40.

Aji, A., Maulinda, L., dan Amin, S. 2015. *Isolasi Nikotin dari Puntung Rokok Sebagai Insektisida*. Jurnal Teknologi Kimia Unima 4:1, 100-120.

Akbar, Budhi. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta: Adabia Press

Alawiyah, S. 2017. *Gambaran Persepsi Tentang Rokok Elektrik Pada Para Pengguna Rokok Elektrik di Komunitas Vaporizer Kota Tangerang* [skripsi]. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah: Jakarta.

Bacha J. R., and Bacha L. M. 2012. *Color Atlas of Veterinary Histology*. 3 rd Edition. Lowa: Wiley-Blackwell.

Badan Pengawasan Obat dan Makanan. 2015. *Info POM: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia*. Jakarta: Vol. 16 No.5.

Bader, T., and Nettesheim, P. 1996. Tumor Necrosis Factor-Alpha Modulates The Expression of its P60 Receptor and Several Cytokines in Rat Tracheal Epithelial Cells. *J Immunol; 157: 3089-3096.*

Baratawidjaya, K. G. 2010. *Imunologi Dasar (Edisi ke 9).* Jakarta: FKUI; p. 226.

Barber, S., Adioetomo, S. M., Ahsan, A., dan Setyonaluri, D. 2008. *Tembakau di Indonesia. Laporan Penelitian. Lembaga Demograf*i. Fakultas Ekonomi Universitas Indonesia. Jakarta.

Benowitz, N. L. 1988. *Pharmacologic Aspects of Cigarette Smoking and Nicotine Addiction.* The New England Journal of Medicine, 319: 1318-1330.

Besung, I. N. K., Astawa, N. M., Suata, K., dan Suwitri, N. K. 2016. Hubungan Antara Aktivasi Makrofag Dengan Kadar Interleukin-6 dan Antibodi Terhadap *Salmonella typhi* Pada Mencit. Jurnal Kedokteran Hewan, Vol. 10 No. 1.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Damayanti, A. 2016. *Penggunaan Rokok Elektronik di Komunitas Personal Vaporizer Surabaya.* Departemen Epidemiologi Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Airlangga. Surabaya, Jawa Timur, Indonesia.

Ehlers S, Kaufmann S. 2010. *Infection, Inflammation, and Chronic Disease: Consequences of a modern Lifestyle*. Trends Immunol; 31: 184-90.

Febrianti, N. Dan R. Y., Suryati. 2014. Pengaruh Jus Buah Jambu Biji Merah *(Psidium guajava L.)* Terhadap Gambaran Histopatologi Trakea Mencit *(Mus musculus)* Strain Swiss yang Dipaparkan Asap Rokok. *Jurnal Bioedukatika Vol. 2 No. 1.*

Fox, J. G. 2002. *Laboratory Animal Medicine 2nd*. New York: Academic pr.

Gaworski, C. L., Dozier M. M., Eldridge S. R., Morrisey R., Rajendran N., and Gerhart J. M. 1998. *Cigarette Smoke Vapor-Phase Effects in The Rat Upper Respiratory Tract*. Inhalation Toxicol 10:857-73.

Gayatri, A., dan Susanto, A. D. 2012. *A Nicotine Replacement Therapy*. CDK-189; 39 (1): 25-9.

Gilman, A. G., Hardman, J. G., and Limbird, L. E. 1991. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Vol.I, Pergamon Press, Singapore, 180-181, 545-549, 563.

Istiqomah, D. R., Cahyo, K., dan Indraswari, R. 2016. Gaya Hidup Komunitas Rokok Elektrik Semarang Vaper Corner. *Jurnal Kesehatan Masyarakat (e-Journal)*, Volume 4, Nomor 2 (ISSN: 2356-3346).

Junqueira, L. C. and Carneiro, J. 2005. *Basic Histology Text and Atlas: Female Reproductive System. 11th edition.* USA: McGraw Hill.

Kementerian Kesehatan RI. 2013. *Info DATIN: Hari Tanpa Tembakau Sedunia.* Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kementrian Kesehatan RI.

Koeswardani, Boentoro, dan Budiman. 2001. *Flow Cytometri dan Aplikasi Alat Hitung Sel Darah Technicon H-1 dan H-3*, diakses darihttp://www.tempo.co.id

Kristiawan, I. K. A., Suarni, N. M. R dan Yulihastuti, D. A. 2017. Struktur Histologi Trakea Tikus Putih (*Rattus sp.*) yang Terpapar Asap Rokok Setelah Diberi Ekstrak Buah Juwet (*Syzygium cumini* L.). Jurnal Simbiosis V (1): 11-15.

Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap.* Surabaya: Airlangga Univeristy Press.

Lan M. Y., Ho C. Y., Lee T. C., and Yang A. H. 2007. Cigarette Smoke Extract Cytotoxicity on Human Nasal Epithelial Cells. *Am J Rhinol* 21:218-23.

Lodovici, M., and Bigagli, E. 2009. Biomarkers of Induced Active and Passive Smoking Damage. *International Journal of Environment Research and Public Health*, 6: 874-888.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lumongga, Fitriani. 2008. *Apoptosis*. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.

Malole, M. B. M., dan C. S. V., Pramono. 1989. *Penggunaan Hewan Percobaan di Laboratorium*. Bogor: Pusat Antara Univeristas Bioteknologi: Institut Pertanian Bogor.

Mauliza, D., Rusli, Ruslizawaty, Rosmaidar, Rinidar dan Masyitha, D. 2018. The Total of Leukocytes Mice (*Mus musculus*) Exposed to Secondhand Smoke Extract and Given Watermelon (*Citrullus vulgaris*). Banda Aceh: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala.

Mc Gavin, Donald M., and Zachary, J. F. 2007. Pathologic Basic of Veterinary Disease. Missouri: *Mosby Elsevier*, 463-558.

Megasari, Noor Lianti. 2010. Pengaruh Lama Stres dan Diet Atherogenik Terhadap Pembentukan Foam Cell Pada Arteri Koroner Jantung Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Sprague Dawley) Jantan [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Merijanti, L. T. 1999. Peran Sel Mast Dalam Reaksi Hipersensitivitas Tipe-1. Jurnal Kedokteran Trisakti. Vol. 18, No. 3.

Mescher, A. L. 2011. *Histologi Dasar Junqueira Teks dan Atlas. Edisi ke-12*. Jakarta: EGC.

Moore, K. L., and Anne, M. R. A. 2013. *Anatomi Klinis Dasar*. Jakarta: Hipokrates.

Muti'ah, Roihatul. 2016. *TLC (Thin Layer Chromatography) Finger Printing dan aktivitas antikanker daun benalu (Macrosolen cochinchinensis) terhadap cell line kanker payudara T47D.* Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maliki Malang.

Nasution, A. S, B. Wirjatmadi dan M. Adriani. 2016. *Efek Preventif Pemberian Ekstrak Kulit Buah Berdaging Super Merah (Hylocereus costaricensis) terhadap Malondialdehid Tikus Wistar yang Dipapar Asap Rokok.* Jurnal Kedokteran Brawijaya, 29 (1): 23.

Nazarudin Z, Muhimmah I dan Fidianingsih I. 2017. *Segmentasi Citra untuk Menentukan Skor Kerusakan Hati secara Histologi.* Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia.

Ott, H. C., and Mathisen. D. J. 2016. *Tracheal Lesions*. Elsevier Inc.

Patel, B. P., dan Rawal, U. M. 2008. Tobacco, Antioxidant Enzymes, Oxidative Stress and Genetic Susceptibility in Oral Cancer. *Am. J. Clin. Oncol*, 31: 454-459.

Pavia, D. L., Garry, M. L., and Georges, S. K. 1976. *Introduction to Organic Laboratory Techniques a Contenporary Approach.* W. B Sounders Company, Philadelphia, London.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Peace, M., and Turner, J. 2018. *Characterization and Abuse of Electronic Cigarettes: The Efficacy of "Personal Vaporizers" as an Illicit Drug Delivery System.* National Criminal Justice Reference

Pearce, E. 2002. *Anatomi dan Fisiologi Untuk Paramedis*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.

Pinem, N. L., Adi, A. A dan Winarya I. B. O. 2016. Perubahan Histopatologi Saluran Pernapasan Bagian Atas Mencit (*Mus musculus*) Akibat Paparan Asap Obat Nyamuk. Indonesia Medicus Veterinus, 5 (4): 311-318.

Retno, T., Widyastuti, S. K., dan Suarsan, N. 2012. *Pengaruh Pemberian Isoflavon terhadap Peroksidasi Lipid pada Hati Tikus Normal*. Indonesia Medicus Veterinus, p 1(4): 483 – 491, ISSN: 2301-784.

Riansyah, Y., Mulqie, L., dan Choesrina, R. 2015 *Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu (Ipomoea batatas (L.) Lamk) Terhadap Tikus Wistar Jantan.* Prosiding Penelitian SPeSIA. Unisba, Bandung. 630-636.

Rosita. 2013. Studi Histopatologi Organ Otak dan Paru-Paru Hamster dan Mencit yang Diinfeksi *Coxiella burnetii* [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Smith, J. B., dan Soesanto, M. 1987. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Australia: International Development Program of Australia Universities and Colleges.

Stedman, R.L. 1968. *The Chemical Composition of Tobacco and Tobacco Smoke*. Chemical Reviews, 68(2), 153-207.

Suckow, M. A., H. Steven and Frangklin, C. L. 2016. *The Laboratory Rat Second Edition.* A Volume in American College of Laboratory Animal Medicine. Academia Press.

Sudiana, I. K. 2008. Patobiologi Molekuler Kanker. *Salemba Medika,* halaman: 35-52.

Sunarjo, Ineke. 2012. Pemberian Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Menurunkan Kadar MDA Tikus Putih (Wistar)yang Dipapar Asap Rokok [Tesis]. Universitas Udayana Denpasar.

Supit, I. A., Pangemanan, D. H. C., dan Marunduh, S. R. 2015 *Profil Tumor Necrosis Factor (Tnf-α) Berdasarkan Indeks Massa Tubuh (Imt) Pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran Unsrat Angkatan 2014.* Jurnal e-Biomedik (eBm), Volume 3, Nomor 2.

Suryadinata, R. V. 2018. *Pengaruh Radikal Bebas Terhadap Proses Inflamasi pada Penyakit Paru Obstruktif Kronis (PPOK).* Fakultas Kedokteran: Universitas Surabaya.

Tanuwihardja, R. K., dan Agus D. D. 2012. *Rokok Elektrik (Electronic Cigarette).* Jurnal Respirasi Indonesia. Jakarta: Vol. 32 No. 1.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Triantara, A. Y. 2016. *Perbandingan Pengaruh Asap Rokok Elektrik dan Asap Rokok Konvensional terhadap Histopatologi Pulmo Tikus Putih (Rattus norvegicus).* Departemen Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

Utami, D. F. R. 2010. *Peroksidasi Lipid pada Tikus Hiperkolesterolemia selama Pemberian Ekstrak Kulit Batang Mahoni (Swietenia macrophylla)* [Tesis]. Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

Vegad, J. I. 2007. *A Textbook of Veterinary General Pathology.* India: international Book Distributing Co.

Wati, I. P., Aulanni'am, dan Mahdi, C. 2013. *Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (Rattus norvegicus) Pasca Induksi Cyclosporine* A. Kimia Student Journal. 1(2): 258.

Westernberger, B. J. 2009. *Evaluation of E-Cigarette*. US: FDA Center For Drug Evaluation and Research.

WHO (World Health Organization). 2009. *Report on The Global Tobacco Epidemic.*

Wicaksono, S. 2002. Efek *Toksik dan Cara Menentukan Toksisitas Bahan Kimia*. Cermin Dunia Kedokteran; 135: 32-4.

Winarsi, Hery. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi.* Yogyakarta: Kanisius.

Wira A., Winaya I. B. O., dan Adi A. A. A. 2018. Perubahan Histopatologi Trakea Mencit Jantan Pascapaparan Asap Rokok Elektrik. *Indonesia Medicus Veterinus.*

Yanbaeva, D. G., Dentener, M. A., Creutzberg, E. C., Wesseling, G., and Wouters, E. F. 2007. *Systemic Effect of Smoking Chest*. 131 (5), 1557-1566.

Yasa, Gede Parwata. 2013. *Peranan Peroksidasi Lipid Pada Patogenesis Preeklamsia*. Denpasar: Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik Penelitian

KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"

No: 1050-KEP-UB

KOMISI ETIK PENELITIAN (*ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE*)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

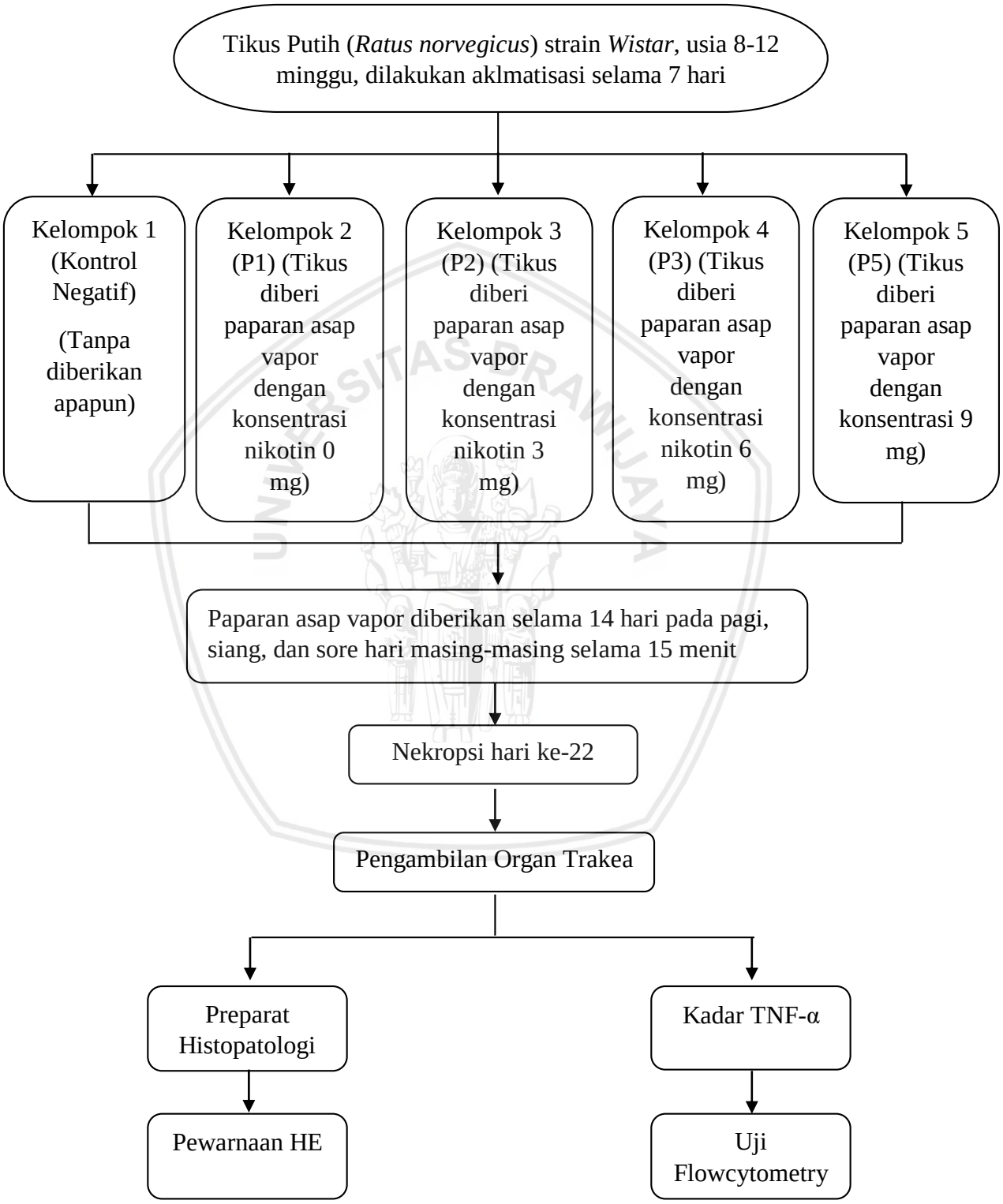
PENELITIAN BERJUDUL	:	PENGARUH PEMBERIAN ASAP VAPOR TERHADAP KADAR MALONDIALDEHYDE (MDA) DAN HISTOPATOLOGI PULMO TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus)*
PENELITI	:	ATIQOH ROZANA AMALIA
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	:	UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	:	LAIK ETIK

Malang, 8 Januari 2019
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 2. Skema Kerja Penelitian



repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 3. Diagram Kerja Penelitian

Lampiran 3.1 Pembedahan Hewan Coba

Tikus (*Rattus norvegicus*) jantan usia 8-12 minggu

- Dislokasi cervical
- Diletakkan diatas papan bedah, rebah dorsal
- Dilakukan pembedahan dari abdomen menuju thorax membentuk huruf Y
- Diambil organ trakea
- Dicuci dengan NaCl-fisiologis 0,9 %
- ½ bagian dimasukkan kedalam larutan PFA 4 %
- ½ bagian dimasukkan kedalam PBS-azida pH 7,4

Organ Trakea

Lampiran 3.2 Pembuatan Preparat Histopatologi Trakea dengan Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Organ Trakea

- Difiksasi mengguakan PFA 4 %
- Diambil dan direndam dalam etanol 70 % selama 24 jam
- Dimasukkan kedalam etanol 80 % selama 2 jam
- Dimasukkan kedalam etanol 90 % selama 20 menit
- Dimasukkan kedalam etanol 95 % selama 20 menit
- Dipidahkan kedalam etanol absolut selama 90 menit pada suhu

Trakea hasil dehidrasi dengan etanol

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Trakea hasil dehidrasi dengan etanol

→ Dimasukkan kedalam larutan xylol I selama 60 menit pada suhu ruang

→ Dimasukkan kedalam laruan xylol II selama 60 menit pada suhu 60-63^{0}C

→ Dimasukkan kedalam larutan xylol III selama 30 menit pada suhu ruang dan 30 menit pada suhu inkubator

→ Dicelupkan pada parafin cair selama 3 x 60 menit pada suhu 56-58^{0}C

Trakea didalam blok parafin

Lampiran 3.3 Pembuatan Preparat Organ

Trakea didalam blok parafin

→ Dimasukkan kedalam *microtome* untuk diiris 5µm

→ Didinginkan diatas air dingin

→ Dimasukkan kedalam air hangat pada suhu 56-58^{0}C

→ Diambil dan ditempatkan pada object glass

→ Preparat trakea disimpan didalam inkubasi dengan suhu 37^{0}C selama 15 menit

Preparat siap diwarnai

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 3.4 Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Preparat Trakea

- Diwarnai dengan pewarnaan HE: deparafinisasi, preparat dimasukkan kedalam xylol 1-3, masing-masing selama 5 menit
- Rehidrasi, preparat dimasukkan kedalam alkohol 100%, 95%, 90%, 80%, 70% masing-masing 2 menit
- Preparat dibilas dengan air mengalir selama 3 menit
- Pengecatan inti preparat dimasukkan kedalam *Mayer hematoxylin* selama 7 menit
- Preparat dibilas dengan air mengalir selama 3 menit
- *Counter stain*, preparat dimasukkan kedalam larutan eosin selama 5 menit
- Dehidrasi, preparat dimasukkan kedalam alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, selama beberapa detik
- *Clearing*, preparat dimasukkan ke xylol I, II dan III, masing-masing selama 2 menit
- Preparat diberi 1 tetes entelan dan kemudian ditutup dengan cover glass

Preparat siap digunakan menggunakan mikroskop

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 3.5 Metode *Flowcytometry*

Organ Trakea

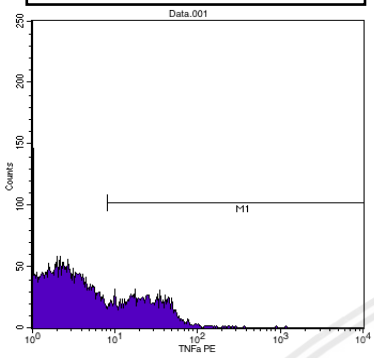
- Dihaluskan dalam cawan petri organ trakea menggunakan ujung spuit, ditambah NaCl 0,9 %
- Dimasukkan tabung eppendorf
- Dilakukan sentrifugasi selama 15 menit
- Dibuang cairan supernatan dan endapannya diambil
- Ditambahkan PBS 1 mL dan diresuspensi
- Diambil larutan 300 mikroliter
- Dipindahkan dalam mikrotube
- Ditambahkan 500 mikroliter PBS
- Disentrifugasi kecepatan 2500 rpm, suhu 10°C selama 5 menit
- Dibuang cairan supernatannya
- Dilakukan staining menggunakan anti-TNF Alpha
- Dilakukan inkubasi dalam ruang gelap 4°C selama 20 menit
- Ditambah 300 mikroliter PBS lalu diresuspensi
- Dipindahkan kedalam kuvet *flowcytometer*
- Dilakukan running dan kemudian dihitung menggunakan alat *flowcytometer*

Hasil

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 4. Hasil Uji Kadar TNF-α

Kontrol (-)



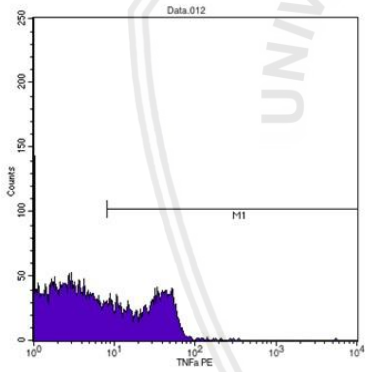
Histogram Statistics

File: Data.001
Acquisition Date: 23-Jan-19
Total Events: 24013

Sample ID: kontrol - trakea
Gated Events: 15102
X Parameter: TNFa PE (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15102	100.00	62.89
M1	8, 9910	3840	25.43	15.99

P1 (Dosis 0 mg/hari)



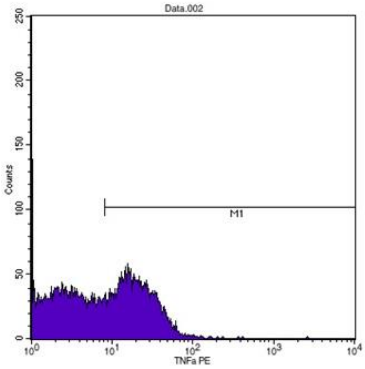
Histogram Statistics

File: Data.012
Acquisition Date: 23-Jan-19
Total Events: 24052

Sample ID: P1.2 - trakea
Gated Events: 15396
X Parameter: TNFa PE (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15396	100.00	64.01
M1	8, 9910	5292	34.37	22.00

P2 (Dosis 3 mg/hari)



Histogram Statistics

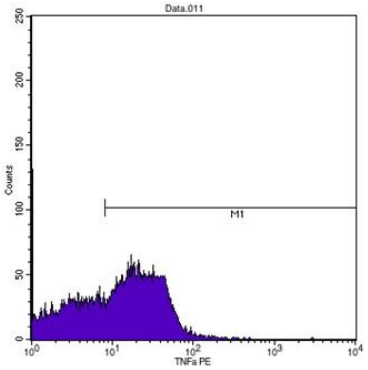
File: Data.002
Acquisition Date: 23-Jan-19
Total Events: 22299

Sample ID: P2.3 - trakea
Gated Events: 15145
X Parameter: TNFa PE (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15145	100.00	67.92
M1	8, 9910	6688	44.16	29.99

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

P3 (Dosis 6 mg/hari)



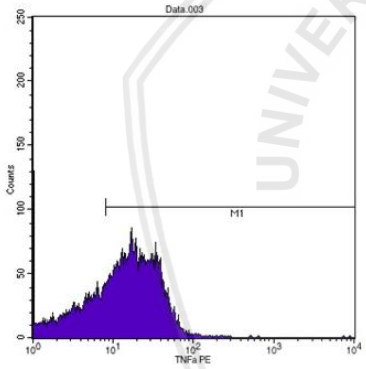
Histogram Statistics

File: Data.011
Acquisition Date: 23-Jan-19
Total Events: 23689

Sample ID: P3.3 - trakea
Gated Events: 15211
X Parameter: TNFa PE (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15211	100.00	64.21
M1	8, 9910	9102	59.84	38.42

P4 (Dosis 9 mg/hari)



Histogram Statistics

File: Data.003
Acquisition Date: 23-Jan-19
Total Events: 22930

Sample ID: P4.3 - trakea
Gated Events: 15672
X Parameter: TNFa PE (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total
All	1, 9910	15672	100.00	68.35
M1	8, 9910	10872	69.37	47.41

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 5. Hasil Uji Statistika Kadar TNF-α

Tests of Normality							
Tikus		Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	Kontrol	.225	4	.	.977	4	.884
	P1	.309	4	.	.834	4	.178
	P2	.204	4	.	.942	4	.668
	P3	.285	4	.	.843	4	.204
	P4	.310	4		.788	4	.083
a. Lilliefors Significance Correction							

Berdasarkan uji normalitas diatas dinyatakan normal (P>0,05). Data tersebut dinyatakan terdistribusi dengan normal.

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
TNF	Based on Mean	3.125	4	15	.047
	Based on Median	2.339	4	15	.102
	Based on Median and with adjusted df	2.339	4	10.283	.124
	Based on trimmed mean	3.060	4	15	.050

Berdasarkan analisa deskriptif dan homogenitas menunjukkan data diatas homogen (P>0,05), dengan nilai signifikansi (P)= 0,50. Pengujian nilai homogenitas dan normalitas telah memenuhi asumsi, dan akan dilanjutkan *Uji One Way ANNOVA.*

ANOVA					
TNF					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4437.994	4	1109.498	45.576	.000
Within Groups	365.157	15	24.344		
Total	4803.150	19			

Hasil *One Way ANNOVA* (α=0,05) menunjukkan nilai signifikansi sebesar p=0.00, dan dinyatakan p<0,05. Disimpulkan bahwa terdapat satu atau lebih kelompok yang mempunyai perbedaan yang signifikan, dan dapat dilanjutkan *post hoc* dengan uji *tukey.*

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

TNF					
Tukey HSD[a]					
Tikus	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol	4	24.8125			
P1	4	34.8975	34.8975		
P2	4		40.7000		
P3	4			54.1950	
P4	4				67.3325
Sig.		.072	.483	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.					

Hasil uji tukey menunjukkan tidak berbeda signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan 1 (P1), namun pada kelompok kontrol (-) dengan kelompok perlakuan 2 (P2), kelompok perlakuan 3 (P3) dan kelompok perlakuan 4 (P4) menunjukkan perbedaan signifikan.

Descriptive

	Tikus			Statistic	Std. Error
TNF	Kontrol	Mean		24.8125	1.30446
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	20.6611	
			Upper Bound	28.9639	
		5% Trimmed Mean		24.8378	
		Median		25.0400	
		Variance		6.806	
		Std. Deviation		2.60891	
		Minimum		21.43	
		Maximum		27.74	
		Range		6.31	
		Interquartile Range		4.93	
		Skewness		-.502	1.014
		Kurtosis		1.214	2.619
	P1	Mean		34.8975	1.78824
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	29.2065	
			Upper Bound	40.5885	
		5% Trimmed Mean		34.7583	
		Median		33.6450	
		Variance		12.791	
		Std. Deviation		3.57647	
		Minimum		32.21	
		Maximum		40.09	
		Range		7.88	
		Interquartile Range		6.27	
		Skewness		1.643	1.014
		Kurtosis		2.686	2.619
	P2	Mean		40.7000	3.22442

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	30.4385	
			Upper Bound	50.9615	
		5% Trimmed Mean		40.8467	
		Median		42.0200	
		Variance		41.588	
		Std. Deviation		6.44884	
		Minimum		32.01	
		Maximum		46.75	
		Range		14.74	
		Interquartile Range		12.13	
		Skewness		-.979	1.014
		Kurtosis		.350	2.619
	P3	Mean		54.1950	3.57186
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	42.8277	
			Upper Bound	65.5623	
		5% Trimmed Mean		54.2439	
		Median		54.6350	
		Variance		51.033	
		Std. Deviation		7.14373	
		Minimum		46.75	
		Maximum		60.76	
		Range		14.01	
		Interquartile Range		13.11	
		Skewness		-.106	1.014
		Kurtosis		-5.231	2.619
	P4	Mean		67.3325	1.54118
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	62.4278	
			Upper Bound	72.2372	
		5% Trimmed Mean		67.4689	
		Median		68.5600	
		Variance		9.501	
		Std. Deviation		3.08235	
		Minimum		62.84	
		Maximum		69.37	
		Range		6.53	
		Interquartile Range		5.28	
		Skewness		-1.690	1.014
		Kurtosis		2.756	2.619

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 6. Perhitungan Dosis Nikotin dalam *E-Liquid Vapor*

- **Konversi dari mg ke mL**

1 g = 1 mL
1000 mg = 1 mL
1 mg = 0,001 mL

1. Dosis 3 mg/kg BB/Hari

- Dilakukan pemaparan 3x sehari
- Sekali paparan menghasilkan 5 ml *e-liquid* vapor
- Kandungan nikotin dalam 5 mL *e-liquid* vapor:
  - 3 mg / 3 kali paparan = 1 mg/ paparan
  - 1 mg = 0,001 mL dalam 5 mL *e-liquid*
- Kandungan total nikotin dalam 14 hari perlakuan:
  - 0,001 mL/paparan x 3 kali paparan / hari x 14 hari = 0,042 mL

2. Dosis 6 mg/kg BB/Hari

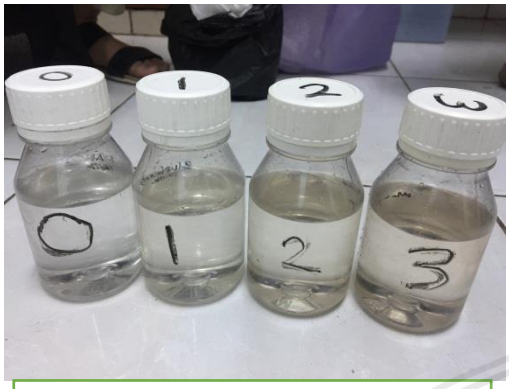
- Dilakukan pemaparan 3x sehari
- Sekali paparan menghasilkan 5 ml *e-liquid* vapor
- Kandungan nikotin dalam 5 mL *e-liquid* vapor:
  - 6 mg / 3 kali paparan = 2 mg/ paparan
  - 2 mg = 0,002 mL dalam 5 mL *e-liquid*
- Kandungan total nikotin dalam 14 hari perlakuan:
  - 0,002 mL/paparan x 3 kali paparan / hari x 14 hari = 0,084 mL

3. Dosis 9 mg/kg BB/Hari

- Dilakukan pemaparan 3x sehari
- Sekali paparan menghasilkan 5 ml *e-liquid* vapor
- Kandungan nikotin dalam 5 mL *e-liquid* vapor:
  - 9 mg / 3 kali paparan = 3 mg/ paparan
  - 1 mg = 0,003 mL dalam 5 mL *e-liquid*
- Kandungan total nikotin dalam 14 hari perlakuan:
  - 0,003 mL/paparan x 3 kali paparan / hari x 14 hari = 0,126 mL

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 7. Dokumentasi Kegiatan



E-Liquid Vapor

Pengambilan *E-Liquid* Vapor sesuai dengan dosis yang ditentukan

Memasukkan *E-Liquid* Vapor kedalam *atomizer*

Pemberian paparan asap vapor

Bulu Tikus Nampak Berubah Warna Menjadi Kuning

Nekropsi Hari Ke-22

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA