

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Menurut *World Health Organization* jumlah orang merokok secara global sekitar 1 miliar dan sekitar 8 juta orang per tahun meninggal dunia akibat rokok (termasuk 1 juta dari perokok pasif). Data angka perokok di Indonesia menurut hasil survei global penggunaan tembakau pada usia dewasa pada tahun 2021 (GATS 2021) menyatakan bahwa dalam 10 tahun terakhir ada penurunan prevalensi konsumsi tembakau, di tahun 2011 terdapat 34,5% atau sekitar 70,2 juta orang dewasa menggunakan tembakau yang didominasi laki-laki. Yaitu sebanyak 68,9 juta menghisap tembakau dan 6,2 juta menggunakan rokok elektrik.¹ Pada hasil survey juga menunjukkan prevalensi perokok elektrik naik dari 0,3% di tahun 2011 menjadi 3% pada tahun 2021.² Rokok elektrik, salah satu jenis rokok yang diminati saat ini, menggunakan taktik dari industri tembakau untuk membuat kalangan muda kecanduan nikotin sehingga membuat ketagihan menghisap rokok elektrik.³ Rokok elektrik diistilahkan WHO sebagai *Electronic Nicotine Delivery System (ENDS)* yang menjadi *trend* terutama di kalangan usia muda.⁴

Munculnya suatu *trend* pada kalangan muda, rokok elektrik telah menjadi pilihan pengganti rokok tembakau terutama di kalangan perokok usia muda.⁵ Rokok elektrik dirancang untuk mengurangi pemakaian tembakau yang digantikan dengan penggunaan nikotin dan dianggap lebih sehat daripada rokok biasa yang menggunakan tembakau dan juga banyak digunakan para perokok aktif untuk membantu berhenti merokok secara sedikit demi sedikit.⁶ Jenis-jenis rokok elektrik terbagi atas 3 generasi, namun pada saat ini hanya digunakan 2 generasi, yaitu: generasi ke 2 dan generasi ke 3. Perbedaan antara generasi kedua dan ketiga yaitu: pada generasi ke 2 lebih disarankan bagi pemula yang ingin mencoba rokok elektrik dikarenakan lebih praktis dan mudah dibawa karena bentuknya kecil seperti obeng dan penampungan cairan lebih sedikit, sedangkan pada generasi ke

3 merupakan jenis rokok elektrik yang lebih *modern* serta memiliki tangki yang cukup besar untuk menampung cairan atau *liquid* yang dapat diisi ulang dan banyak disukai oleh kalangan muda.^{5,7} Pada umumnya rokok elektrik dikenal sebagai *vape* atau *vaping*. Rokok elektrik merupakan benda yang digenggam yang menggunakan perangkat dan teknologi baru dengan model lebih *modern* serta memiliki berbagai rasa, seperti rasa buah-buahan, kandungan nikotin pada rokok elektrik juga berbeda-beda yang membuat masyarakat khususnya pada kalangan muda tertarik untuk mencobanya serta bila dihisap dapat mengeluarkan uap yang memiliki tingkat kandungan yang tidak sama dari rokok konvensional.³

Rokok elektrik memiliki 3 bagian, yaitu: bagian pertama: *battery* atau baterai, bagian kedua: *atomizer* yang merupakan bagian yang memanaskan dan menguapkan larutan nikotin dan bagian yang terakhir adalah *cartridge* yang berisi larutan nikotin. Struktur atau bagian ini terdapat pada generasi ke 3. Rokok elektrik mempunyai 466 lebih nama dagang produk ENDS dengan lebih dari 8.000 jenis zat perasa.^{8,9} Perbedaan antara rokok biasa (konvensional) dengan rokok elektrik ialah rokok elektrik mengeluarkan asap lebih tebal dibandingkan rokok biasa (konvensional), rokok biasa mengeluarkan asap rokok dengan membakar sumbunya dengan api, sementara pada rokok elektrik menggunakan cairan dan dipanaskan menggunakan mesin pemanas, rokok biasa mempunyai kandungan tembakau lebih banyak dan nikotin yang sedikit sementara pada rokok elektrik lebih banyak kandungan nikotin.¹⁰

Meskipun rokok elektrik dipercaya sebagai rokok yang lebih aman bagi kesehatan dibandingkan dengan rokok konvensional. Akan tetapi, pada kenyataannya ternyata rokok elektrik masih memiliki dampak berbahaya bagi perokok aktif maupun pasif. Rokok elektrik masih memiliki zat kandungan berbahaya seperti nikotin, zat bersifat racun dan karsinogen, sehingga dapat menyebabkan terjadi gangguan pernafasan dan gangguan paru-paru. Sementara pada perokok pasif, menghirup asap rokok atau aerosol rokok elektrik yang memiliki kandungan nikotin, karbon monoksida (CO), *propylene glycol*, *glycerin*

dan zat perasa yang bersifat racun bagi tubuh, juga dapat menyebabkan iritasi saluran pernafasan dan keluhan batuk.¹¹⁻¹³

Pengaruh asap rokok berdampak buruk pada kesehatan perokok itu sendiri terutama pada bagian sistem pernafasan yang mengakibatkan terjadinya penurunan fungsi paru-paru, serta dapat terjadinya perubahan struktur dan jaringan paru-paru.¹⁴ Beberapa penelitian menunjukkan gambaran kerusakan paru – paru akibat paparan asap rokok elektrik. Berdasarkan penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Wylie dkk, dengan lama paparan 2 minggu menggunakan cairan yang mengandung *propylene glycol*, ternyata memberikan efek kerusakan yang sedikit pada membran alveolus, lumen alveolus dan hubungan antar alveolus, sehingga Wylie dkk menyarankan dilakukan penelitian lanjutan dengan paparan asap rokok lebih lama.¹⁵ Dan juga ada penelitian oleh Bella dkk, yang melakukan paparan asap rokok elektrik pada mencit (*Mus Musculus Balb'C*) jantan dengan cairan perasa *strawberry* mengandung nikotin 6 mg/ml (dosis ini banyak digunakan para peneliti sebelumnya) dengan memberi paparan 6 kali pengulangan setiap kelompok perlakuan dan diberi istirahat 15 menit yang menggunakan volume cairan 1 ml, 2 ml dan 4 ml. Hasilnya terdapat sedikit kerusakan jaringan paru menggunakan cairan pada 1 ml dan 2 ml, serta pada 4 ml terdapat hasil kerusakan yang signifikan.¹⁶ Suatu penelitian di luar negeri telah meneliti efek dari uap rokok elektrik terhadap fungsi paru-paru pada tikus dengan menggunakan cairan rokok elektronik kandungan *propylene glycol* yang mengandung nikotin dan mengandung rasa yang dilakukan selama 4 minggu dengan cara 4 hari sekali, sehingga didapatkan adanya hasil kerusakan pada sistem pernafasan.¹⁷

Berdasarkan penjelasan di atas, peneliti tertarik untuk meneliti tentang pengaruh paparan asap rokok elektrik dengan rasa *strawberry* (menggunakan dosis nikotin 0 mg/ml, nikotin 3 mg/ml dan nikotin 6 mg/ml dengan *propylene glycol: vegetable glyserin (70%:30%)*), terhadap histologi paru pada mencit (*Mus musculus* L) Strain Balb'C jantan.

1.2. Rumusan masalah

Apakah pemberian paparan asap rokok elektrik dapat menimbulkan perubahan gambaran histologi paru mencit (*Mus musculus L*) Strain Balb'C jantan?

1.3. Hipotesis Penelitian

Ada pengaruh pemberian paparan asap rokok elektrik terhadap gambaran histologi paru mencit yang diberi paparan asap rokok.

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui apakah terdapat perubahan gambaran histologi paru mencit (*Mus musculus L*) Strain Balb'C jantan yang dipapar dengan asap rokok elektrik.

1.4.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan perubahan histologi paru mencit yang tidak dipapar asap rokok elektrik (kelompok kontrol) dengan kelompok perlakuan dosis nikotin 0 mg/ml *strawberry nougats*, 3 mg/ml *strawberry oats* dan 6 mg/ml dengan *propylene glycol* (70%) : *glycerol* (30%) rasa *strawberry oats* dengan cairan 4 ml.
2. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan perubahan histologi paru mencit kelompok perlakuan dosis nikotin 0 mg/ml atau tanpa nikotin dengan *propylene glycol* (70%) : *glycerol* (30%) rasa *strawberry nougats* dengan cairan 4 ml dengan kelompok perlakuan dosis nikotin 3 mg/ml dan 6 mg/ml dengan *propylene glycol* (70%) : *glycerol* (30%) rasa *strawberry oats* dengan cairan 4 ml.

3. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan perubahan histologi paru mencit kelompok perlakuan dosis nikotin 3 mg/ml dengan *propylene glycol* (70%) : *glycerol* (30%) rasa *strawberry oats* dengan cairan 4 ml dengan kelompok perlakuan yang kelompok perlakuan dosis nikotin 6 mg/ml atau tanpa nikotin dengan *propylene glycol* (70%) : *glycerol* (30%) rasa *strawberry oats* dengan cairan 4 ml.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Bagi Peneliti

Dapat menambah pengetahuan dan pengalaman dalam melakukan penelitian dan penulisan karya ilmiah khususnya mengenai penelitian eksperimental pra – klinik yang dilakukan pada hewan uji coba mencit jantan.

1.5.2. Bagi Institusi

Dapat menambah referensi di Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan, sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk melakukan penelitian yang lebih dalam bagi peneliti selanjutnya.

1.5.3. Bagi Masyarakat

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan bagi masyarakat mengenai pengaruh paparan asap rokok elektrik terhadap paru-paru.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Paru-Paru

2.1.1 Histologi Paru

Percabangan paru-paru dan bronkus terdiri dari bronkus, bronkiolus, bronkiolus respiratorius, duktus alveolaris, alveolus dan regenerasi di lapisan alveolus.¹⁸ Bronkus merupakan cabang dari trakea dan memiliki karakteristik yang hampir sama. Bronkus berukuran diameter sekitar 5 cm dan memiliki kartilago hialin berbentuk lempeng yang mengelilingi lumen bronkus, serta mempunyai otot polos berbentuk seperti lingkaran. Epitel bronkus sama dengan epitel trakea, yaitu epitel respiratorik. Bronkus bercabang menjadi 3 bagian, yaitu: bronkus primer atau bronkus ekstrapulmonal, bronkus sekunder atau bronkus intrapulmonal (lobaris), tersier (segmental, segmen bronkopulmonal).¹⁸

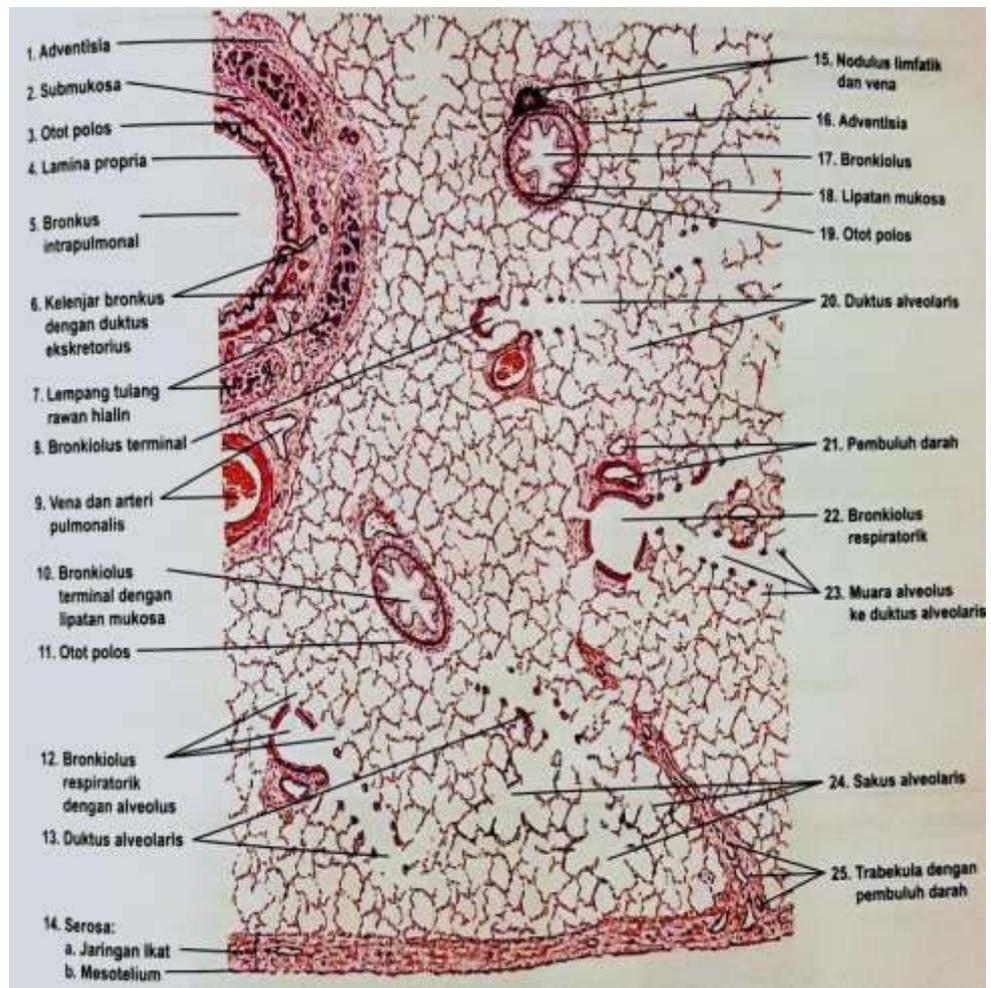
Bronkiolus merupakan cabang kecil yang membawa udara dari bronkus ke alveoli paru-paru. Bronkiolus juga merupakan jalan nafas intralobular yang memiliki diameter \pm 5 mm, tidak memiliki kartilago dan kelenjar dan yang melapisi dinding hanya epitel bertingkat silindris bersilia atau selapis silindris bersilia atau selapis kuboid dan memiliki otot polos. Bronkiolus akan bercabang menjadi bronkiolus terminalis yang lebih kecil. Bronkiolus terminalis dilapisi dengan epitel kolumnar selapis.^{18,19}

Bronkiolus respiratorius berasal dari bronkiolus terminal. Dinding bronkiolus respiratorik dilapisi oleh epitel kuboid bersilia di proksimal dan sel clara (mempermudahkan paru untuk berkembang) yang setiap dinding ditemui satu duktus alveolus, berupa kantung-kantung kecil. Duktus alveolaris merupakan muara alveolus sehingga seluruh dindingnya dipenuhi dengan alveolus dan pada lamina propria akan mengelilingi tepi alveoli yang terdapat sel otot polos, sehingga berlanjut menjadi sakus alveolaris. Epitel dari duktus alveolaris ialah selapis sel epitel gepeng, serta memiliki serat elastin dan serat retikular. Serat retikular berfungsi untuk mencegah pengembangan paru yang berlebihan.^{18,19}

Alveolus adalah evaginasi (benjolan) dari bronkiolus respiratorius, duktus alveolaris dan sakus alveolar, serta ujung akhir duktus alveolaris. Alveolus memiliki jumlah alveolus 300 juta, serta diameter sekitar 200 μ m dan juga alveolus memiliki septum atau dinding interalveolaris memiliki serat elastin dan kolagen, membran respiratorik mempunyai tebal 0,1-0,15 μ m, pori interalveolaris yang memiliki diameter 10-15 μ m, sel endotel kapiler, sel alveolus tipe I (pneumosit tipe I), sel alveolar skuamosa, sel alveolus tipe II (pneumosit tipe II), surfaktan paru, makrofag alveolus (sel debu) dan cairan bronkoalveolar.¹⁸

Sel alveolus tipe I juga disebut sel pneumosit tipe I yang merupakan sel yang melapisi 97% dari sel alveolus. Organel yang terdapat pada sel alveolus tipe I yaitu retikulum endoplasma, apparatus golgi, mitokondria dan vesikel pinosititik. Sel alveolus tipe I ini memiliki taut kedap dan desmosom untuk mencegah adanya perembesan cairan ke ruang udara alveolus. Sel alveolus tipe I juga membentuk sawar darah-udara yang sangat tipis untuk menjadi tempat pertukaran gas.¹⁸

Sel alveolus tipe II dinamai juga pneumosit tipe II atau sel septum yang berbentuk bundar dan merupakan sel sekretorik yang terdapat vesikel atau badan lamella penghasil dari surfaktan paru. Surfaktan paru terdapat *fosfatidilkolin dipalmitol* dan *fosfatidilgliserol*. Makrofag alveolus (sel debu) berada di dalam alveolus dan septum monosit yang bermigrasi ke bronkus. Fungsi utama makrofag alveolus ialah membersihkan alveolus dari mikroorganisme yang masuk dan partikel yang terhirup melalui proses fagositosis. Makrofag alveolus dapat dikenali di alveolus atau di sekat jaringan ikat dengan kandungan sitoplasmanya, yang normalnya mengandung banyak partikel karbon.¹⁸



Gambar 2.1. Histologi paru. Pembesaran 100x.

Pewarnaan *Haematoxylin-Eosin*¹⁸

2.1.2 Metode Perhitungan Kepadatan Sel Radang Paru

Hal yang dinilai berupa kepadatan sel rang paru dengan penilaian skor 0 (tidak ada kepadatan sel radang), skor 1 (kepadatan sel radang ringan), skor 2 (kepadatan sel radang sedang <25%), skor 3 (kepadatan sel radang berat 25-50%) dan skor 4 (difusi >50% kepadatan sel radang). Metode pengukuran penilaian yang digunakan adalah metode Bayes dkk yang dilihat pada seluruh lapang pandang menggunakan perbesaran 100x.²⁰

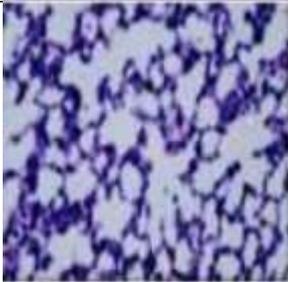
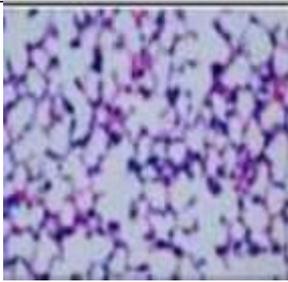
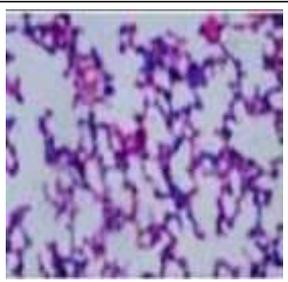
Skor	Skor Kepadatan Sel Radang Paru
0	Tidak ada kepadatan sel radang
1	Kepadatan sel radang ringan (selularitas sel radang yang dilihat dari patchy/bercak menyebar tidak merata)
2	Kepadatan sel radang sedang (terjadi peningkatan selularitas sel radang / <25%)
3	Kepadatan sel radang berat (25-50% paru dengan peningkatan selularitas sel radang)
4	Difusi (>50% paru dengan peningkatan selularitas sel radang)

Tabel 2.1. Skor Secara Histopatologi Kepadatan Sel Radang Paru Menurut Metode Bayes dkk²⁰

2.1.3 Metode Perhitungan Kerusakan Jaringan Histologi Paru-Paru

Gambaran kerusakan jaringan paru yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x pada seluruh lapangan pandang. Hal-hal yang dinilai berupa membran alveolus, bentuk lumen dan hubungan antar alveolus. Skor dari masing-masing dinilai, diratakan dan dijumlahkan, maka terdapat skor terendah yaitu skor 1-3 (kerusakan ringan), skor 4-8 (kerusakan sedang) dan skor tertinggi yaitu skor 9 (kerusakan berat). Semakin tinggi skor yang didapat, maka semakin besar kerusakan yang terjadi. Kerusakan struktur histologi paru menurut kriteria penilaian derajat kerusakan jaringan paru menurut kriteria Marianti dkk.¹⁵

Gambaran histologi	Skor		
	1	2	3
Membran alveolus	Membran alveolus utuh, berinti dan lengkap dengan sel-sel endothelium >75%	Membran alveolus utuh, berinti dan lengkap dengan sel-sel endothelium 25-75%	Membran alveolus utuh, berinti dan lengkap dengan sel-sel endothelium <25%
Lumen alveolus	Membulat ukuran proporsional >75%	Membulat ukuran proporsional 25-75%	Membulat ukuran proporsional <25%
Hubungan antar alveolus	Rapat >75%	Rapat 25%-75%	Rapat <25%

Tabel 2.2. Kriteria Penilaian Derajat Kerusakan Jaringan Histologi Paru Menurut Marianti dkk¹⁵

2.2. Rokok Elektrik (Vape)

2.2.1 Definisi Rokok Elektrik (Vape)

WHO mengistilahkannya sebagai Electronic Nicotine Delivery System (ENDS) karena menghasilkan nikotin dalam bentuk uap yang kemudian dihirup oleh pengguna.³ Rokok elektronik juga memiliki berbagai nama lain, diantaranya: *Electronic cigarette (E-cigarette)*, *E-cig*, *Elektro smoke*, *Smart smoker* dan *Personal vaporizer (PV) / Vape / Vapor*. Rokok elektrik merupakan benda yang

digenggam yang memiliki perangkat dan teknologi baru dengan model yang lebih *modern*. Rokok elektrik memiliki tabung atau tangki sebagai penampungan cairan (*e-liquid*) yang dapat diisi ulang.^{4,21}

2.2.2 Kandungan Rokok Elektrik (Vape)

Kandungan rokok elektrik (*vape*) terdiri dari aerosol (uap) dan cairan (*e-liquid*). Aerosol (uap) merupakan uap yang dikeluarkan dari *vapor* sangat banyak dan menimbulkan aroma sesuai dengan perasa cairan (*e-liquid*). Aerosol (uap) juga terdapat kandungan berbahaya seperti *formaldehida*, *asetaldehida*, *akrolein* dan karbon monoksida (CO). Cairan (*e-liquid*) berisi larutan terdiri dari *propylene glycol (PG)*, *glyserin (vegetable glyserin / VG)*, nikotin, air, serta perisa. Kadar *propylene glycol* dan *glycerol* pada rokok elektrik berbeda-beda persennannya, ada yang 60%:40%, ada yang 50%:50%, serta ada yang 70%:30%.^{19,21}

Adapun kandungan rokok elektrik yang berbahaya, yaitu:²¹

a. Nikotin

Nikotin merupakan salah satu zat adiktif yang bila dikonsumsi terus menerus dalam jangka waktu yang lama sehingga mengakibatkan gangguan pembuluh darah, seperti peningkatan tekanan darah dan juga dapat terjadi kerusakan pada struktur, sel dan jaringan saluran nafas, seperti pada organ paru.^{21,22}

b. Bahan karsinogen

Bahan karsinogen merupakan bahan yang terdapat pada aerosol (uap) yang dapat menimbulkan sel kanker, seperti *formaldehida*, *aldehida*, *akrolein*, *Nitrosamin (TSNa)* dan logam. Kandungan karsinogen *formaldehida* dalam kandungan rokok elektronik pada aerosol (uap) berpotensi menyebabkan gangguan karsinogen dan kerusakan DNA. *Formaldehida*, *aldehida*, *akrolein* dan logam dapat menyebabkan inflamasi atau peradangan pada paru dan kerusakan jaringan paru. Sementara pada *Nitrosamin (TSNa)* merupakan bahan karsinogen pada

aerosol (asap) hasil dari cairan tembakau yang dipanaskan. Logam pada kandungan karsinogen mempunyai kadar timbal dan kromium dalam aerosol (uap) rokok elektronik yang sama dengan kadar pada rokok konvensional.²¹

c. Bahan toksik lain

Bahan toksik dapat menyebabkan iritatif dan induksi inflamasi, antara lain seperti pada karbon monoksida (CO), *propylene glycol* dan *glycerin*. *Propylene glycol* dan *glycerin* juga terdapat pada aerosol (uap) dapat menyebabkan iritasi saluran nafas atas dan paru sehingga menimbulkan penyakit seperti asma.²¹

Rokok elektrik memiliki 8.000 jenis zat perasa seperti rasa buah-buahan (mangga, *strawberry*), biji-bijian (kopi), rasa mint, rasa tembakau yang dapat membuat pengguna rokok elektrik semakin ketagihan.²¹

2.3 Dampak Rokok Elektrik Terhadap Paru

Kandungan *e-liquid* dan aerosol (uap) dalam rokok elektronik yang dikeluarkan dapat berakibat buruk pada kesehatan, bila digunakan dalam jangka waktu yang lama. Adapun dampak yang ditimbulkan akibat asap (aerosol) rokok elektrik dapat menyebabkan perubahan struktur dan fungsi saluran nafas serta jaringan paru-paru sehingga menimbulkan gejala distress pernafasan atau sulit bernafas dan dapat menimbulkan penyakit pernafasan. Kandungan dalam cairan rokok elektrik juga dapat meningkatkan peradangan dan peningkatan infeksi pada sel epitel saluran pernafasan.^{16,21}

2.4 Tinjauan Hewan Percobaan (Mus Musculus Balb'C)

Mencit (*Mus Musculus Balb'C*) merupakan hewan mamalia pengerat yang menjadi hewan coba dan banyak digunakan dalam penelitian biomedis. Mencit

merupakan hasil perkawinan dari tikus putih salah satunya *strain Balb'C*, hewan yang cepat berkembang biak, serta mudah dipelihara. Mencit (*Mus Musculus Balb'C*) memiliki ciri - ciri berupa bentuk tubuh kecil, berwarna putih, albino, mata berwarna coklat kemerahan dan 99% gennya mirip dengan manusia.²³ Klasifikasinya:^{23,24}

Phylum : Chordata

Sub phylum : Vertebrata

Class : Mammalia

Ordo : Rodentia

Family : Muridae

Genus : Mus

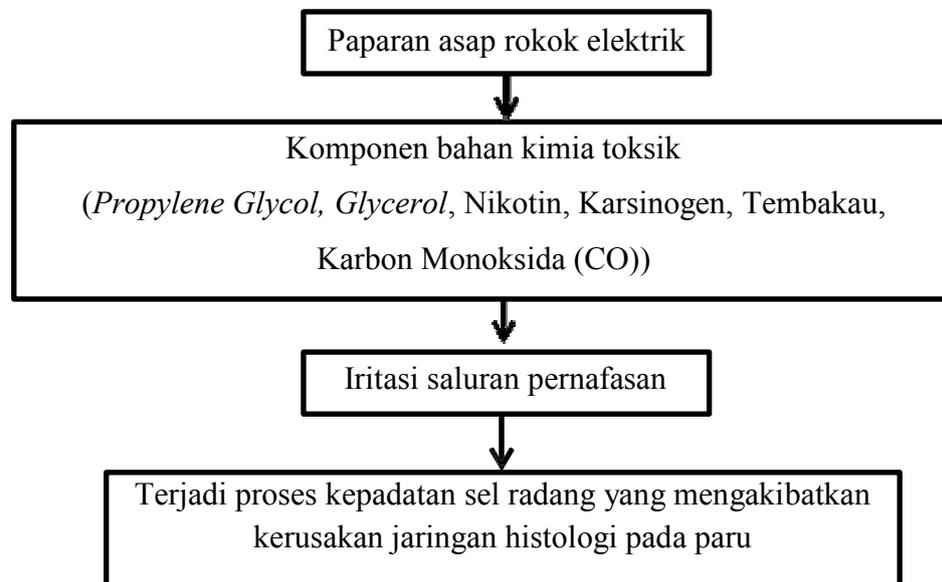
Species : Mus musculus



Gambar 2.2. Mencit (*Mus Musculus Balb'C*)²⁴

Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* jantan yang paling sering digunakan sebagai hewan penelitian biomedis. Mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* memiliki mata merah dan warna kulit albino dengan rambut kulit putih. Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* jantan dikarenakan lebih stabil daripada betina. Mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* mudah dipelihara dalam jumlah banyak.^{25,26}

2.5. Kerangka Teori



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental *posttest only with control group design*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Farmasi Universitas Sumatera Utara, di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara dan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Granmed. Di Laboratorium Farmakologi Farmasi Universitas Sumatera Utara dilakukan pemeliharaan dan pemberian perlakuan kepada hewan coba, di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara dilakukan pembuatan dan pewarnaan histologi paru pada mencit, serta di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Granmed Lubuk Pakam dilakukan pengamatan dan penilaian slide histologi paru mencit.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus sampai Desember 2022.

3.3 Populasi Penelitian

3.3.1 Populasi Target

Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* jantan.

3.4 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

3.4.1 Sampel

Mencit (*Mus musculus L*) Strain Balb'C jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan *drop out*.

3.4.2 Cara Pemilihan Sampel

Yang menjadi subjek penelitian adalah seluruh anggota populasi target yang memenuhi kriteria inklusi dan *drop out* dengan menggunakan teknik *purposive sampling*, yaitu jumlah sampel yang dibagi dalam jumlah yang sama.

3.4.3 Besar Sampel

Untuk menentukan banyaknya sampel yang digunakan dalam penelitian ini, maka digunakan besaran sampel dengan rumus Federer:

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

Keterangan:

t = Kelompok perlakuan

n = jumlah sampel untuk 1 kelompok perlakuan

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

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

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

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

$$\text{Besar sampel} = t \times n$$

$$= 4 \times 6$$

$$= 24$$

Selanjutnya menentukan koreksi sampel untuk mengantisipasi sampel yang terpilih mengalami mati atau dropout 10%.

$$n' = n/(1-f)$$

Keterangan:

n' = jumlah sampel koreksi

n = jumlah sampel minimal

f = perkiraan proporsi *drop out* 10% (0,1)

$$\begin{aligned} n' &= n/(1-f) \\ &= 24/(1-0,1) \\ &= 6,67 \\ &= 7 \end{aligned}$$

Maka jumlah tikus cadangan = jumlah kelompok perlakuan x ($n' - n$)

$$\begin{aligned} &= 4 \times (7-6) \\ &= 4 \times 1 \\ &= 4 \end{aligned}$$

Besar sampel yang dipakai menurut Federer sebanyak 24 ekor mencit. Kemudian ditambah dengan jumlah sampel cadangan sebanyak 10% dari total sampel. Sehingga diperoleh sampel 28 mencit yang dimana didalam masing-masing kelompok terdapat penambahan 1 mencit cadangan.

3.4.4 Penentuan Jumlah Sampel

Penelitian ini menggunakan teknik *purposive sampling* dengan rancangan *posttest only with control grup design* dan subjek yang digunakan adalah Mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* jantan sebanyak 28 mencit yang dibagi menjadi 4 kelompok dengan jumlah mencit pada masing-masing kelompok adalah 7 ekor. Kelompok perlakuan pada tikus sebagai berikut:

- a. Kelompok 1 : kelompok kontrol tanpa paparan asap rokok elektrik yang hanya diberi makan dan minum.
- b. Kelompok 2 (kelompok perlakuan) : paparan asap rokok elektrik dengan volume cairan 4 ml dengan kadar nikotin 0 mg/ml dengan *propylene glycol* (70%) : *glycerol* (30%) rasa *strawberry nougats*.

- c. Kelompok 3 (kelompok perlakuan) : paparan asap rokok elektrik dengan volume cairan 4 ml dengan kadar nikotin 3 mg/ml dengan *propylene glycol* (70%) : *glycerol* (30%) rasa *strawberry oats*.
- d. Kelompok 4 (kelompok perlakuan) : paparan asap rokok elektrik dengan volume cairan 4 ml dengan kadar nikotin 6 mg/ml dengan *propylene glycol* (70%) : *glycerol* (30%) rasa *strawberry oats*.

3.5 Kriteria Inklusi dan Drop Out

3.5.1 Kriteria Inklusi

1. Mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* jantan.
2. Mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* dengan berat badan 25-35 gram.
3. Usia mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* 6-8 minggu.
4. Mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* dalam keadaan sehat dan tidak cacat.

3.5.2 Kriteria Drop Out

1. Mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* jantan tampak sakit selama perlakuan.
2. Pergerakan Mencit (*Mus musculus L*) *Strain Balb'C* jantan tidak aktif dari biasanya.
3. Mencit mati saat penelitian dijalankan.

3.6 Prosedur Kerja

Penelitian ini dilakukan sesuai dengan prinsip 3R dan 5F.

Prinsip 3R, yaitu:

1. Replacement, menggunakan hewan dengan mengambil jaringan organ paru bagian lobus kiri yang dibagi menjadi 3 bagian, kemudian diambil 1/3 bagian tengah dan dimatikan secara manusiawi dengan cara dibius dengan kloroform sebanyak 0,5 ml.
2. Reduction, menggunakan hewan sebanyak 28 ekor mencit dengan cadangan sampel yang digunakan 4 ekor mencit sesuai dengan rumus *drop out* 10% yang digunakan dan sampel dibagi menjadi 4 kelompok.
3. Refinement, bebas dari rasa sakit dengan cara menggunakan kloroform sebanyak 0,5 ml sebelum dilakukan pengambilan jaringan organ pada mencit.

Prinsip 5F:

1. Bebas dari rasa haus dan lapar, dengan cara memberikan minum dan pakan sesuai dengan kebutuhan mencit.
2. Bebas dari rasa tidak nyaman, dengan cara menggunakan ukuran kandang sesuai dari *guide for the care and use of laboratory animals* dan menyediakan tempat yang bersih.
3. Bebas dari rasa sakit, luka dan penyakit: sebelum dilakukan pengambilan jaringan organ mencit, akan dilakukan pembiusan pada tikus dengan menggunakan kloroform sebanyak 0,5 ml.
4. Bebas dari rasa takut dan stress, dengan cara memberikan masa adaptasi selama 7 hari.
5. Bebas untuk mengekspresikan tingkah laku alamiah, dengan cara memberikan ruang dan fasilitas yang sesuai, serta juga membuat dalam 1 kandang / kelompok ada 7 ekor mencit.

Untuk mendapat gambaran secara jelas bagaimana jalannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Peneliti meminta izin dengan mengurus *ethical clearance* yang diajukan ke institusi pendidikan Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan.
2. Penelitian juga meminta izin permohonan pelaksanaan penelitian pada laboratorium tempat penelitian.
3. Penyiapan hewan uji.

Hewan uji diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari di *animal house*, dimana hewan yang digunakan sebanyak 28 ekor mencit kemudian dikelompokkan menjadi 4 kelompok, yang masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor mencit dalam satu kandang.

4. Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian.

Alat :

- *Smoking box*
- *Aerator air pump vaccum and blow* (penghisap asap rokok masuk ke *smoking box*)
- *Vapor*
- *Tube organ*
- Kandang mencit
- Botol minuman mencit
- Tempat pakan mencit
- Mikroskop digital Olympus BX 53
- Kaca objek

Bahan:

- Mencit jantan dengan berat 25-35 gram dan umur 6-8 minggu
- Rokok elektrik
- Pakan mencit
- Air untuk minum mencit
- Sekam mencit
- Parafin

- Pewarna *Haematoxylin Eosin* (HE)
- Aquades
- Alkohol bertingkat
- Formalin 10%

5. Penyiapan paparan asap rokok.

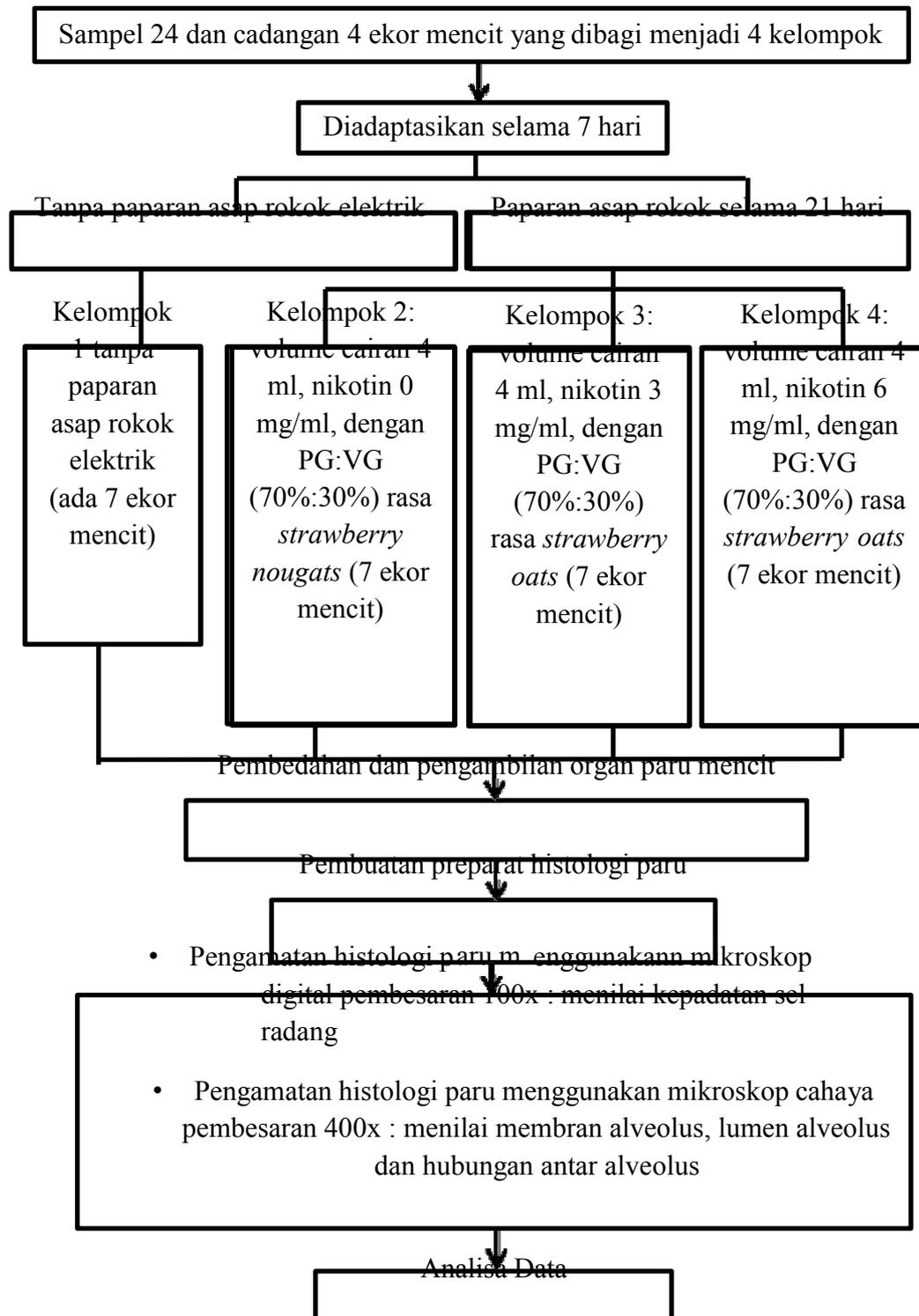
Sebelumnya, kandang mencit di desain hingga hanya lubang ventilasi udara dengan lubang selang. Sehingga sebagian besar dari asap rokok tersebut dihirup oleh mencit. Sampel mencit yang digunakan berjumlah 28 ekor mencit yang dikelompokkan menjadi 4 kelompok yang diamati selama 21 hari dan pada hari ke 22 dilakukan pengambilan organ paru mencit. Perlakuan yang diberikan kepada setiap kelompok penelitian adalah sebagai berikut:

1. Kelompok 1 : kelompok kontrol tanpa paparan asap rokok elektrik, hanya diberi makan dan minum.
2. Kelompok 2 (kelompok perlakuan) : paparan asap rokok elektrik dengan volume cairan 4 ml dengan kadar nikotin 0 mg/ml dengan *propylene glycol* (70%) : *glycerol* (30%) rasa *strawberry nougats*.
3. Kelompok 3 (kelompok perlakuan) : paparan asap rokok elektrik dengan volume cairan 4 ml dengan kadar nikotin 3 mg/ml dengan *propylene glycol* (70%) : *glycerol* (30%) rasa *strawberry oats*.
4. Kelompok 4 (kelompok perlakuan) : paparan asap rokok elektrik dengan volume cairan 4 ml dengan kadar nikotin 6 mg/ml dengan *propylene glycol* (70%) : *glycerol* (30%) rasa *strawberry oats*.

Rokok yang digunakan adalah rokok elektrik (*vape*). Paparan asap rokok yang diberikan per perlakuan sebanyak 6 kali sehari kemudian diistirahatkan 15 menit sampai asap rokok menghilang yang dilakukan pada pukul 10.00 - 11.30 WIB siang selama 21 hari. Alat yang digunakan untuk pemaparan asap rokok adalah *aerator air pump vaccum and blow*. Rokok elektrik diisi dengan cairan sesuai perlakuan dan dilakukan pemanasan dan akan mengeluarkan uap yang disalurkan melalui selang sambil dipompa kedalam *smoking chamber*.

6. Pengambilan organ paru mencit dan Cara pembuatan preparat histologi paru.

Mencit dikorbankan dengan cara dibius dengan kloroform sebanyak 0,5 ml, kemudian diletakkan di atas papan bedah dengan posisi terlentang. Bagian abdomen dan thorax mencit dibedah, kemudian diambil organ paru bagian kiri dan dicuci dengan menggunakan alkohol bertingkat. Pengambilan preparat histologi paru yang diambil bagian Organ paru lobus kiri dibagi menjadi tiga bagian, kemudian diambil 1/3 bagian tengah. Organ paru yang diambil dimasukkan ke dalam *tube* yang berisi formalin 10%. Kemudian dilanjutkan dengan proses pembuatan preparat histologi menggunakan metode paraffin dan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE) yang dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Dan untuk pembacaan slide organ dilakukan di Rumah Sakit Grandmed – Lubuk Pakam oleh spesialis Patologi Anatomi. Jumlah kepadatan sel radang paru dikuantitatifkan berdasarkan metode Bayes dkk.²⁰ Jumlah kerusakan jaringan paru dikuantitatifkan berdasarkan metode Marianti dkk.¹⁵



Tabel 3.1. Alur Penelitian

3.7. Identifikasi Variabel

3.7.1. Variabel Independen

Pemberian paparan asap rokok elektrik terhadap mencit (*Mus musculus L.*) *Strain Balb'C Jantan*.

3.7.2. Variabel Dependen

Perubahan gambaran histologi paru mencit (*Mus musculus L.*) *Strain Balb'C Jantan*.

3.8. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Perubahan histologi paru mencit menurut kriteria Bayes dan Marianti dkk	Perubahan histologi paru mencit berupa kepadatan sel radang pada paru mencit dan kerusakan jaringan pada paru mencit yang mengakibatkan kerusakan sistem pernafasan, fungsi paru, serta dapat terjadi perubahan struktur dan jaringan paru yang dinilai dengan metode Bayes dkk dengan penilaian skor 0, 1, 2, 3 dan 4 dan juga menggunakan kriteria	Mikroskop digital Olympus BX 53	Metode Bayes dkk (menilai kepadatan sel radang): Skor 0 (tidak ada kepadatan sel radang), Skor 1 (kepadatan sel radang ringan), Skor 2 (kepadatan sel radang sedang <25%), Skor 3 (kepadatan sel radang berat	Kategorik

		Marianti dengan penilaian skor 1-9, skor 3 kerusakan rendah dan skor 9 kerusakan berat.			25-50%) dan Skor 4 (difuse >50% kepadatan sel radang). Metode Marianti dkk (menilai kerusakan jaringan histologi paru): Skor 1-3 (kerusakan ringan) Skor 4-8 (kerusakan sedang) Skor 9 (kerusakan berat)
2.	Paparan asap rokok elektrik	Asap atau aerosol rokok elektrik merupakan asap yang dihasilkan dari cairan yang dipanaskan sehingga menjadi asap	-	-	Kategorik

atau aerosol
atau uap dalam
jumlah banyak

Tabel 3.2. Definisi Operasional

3.9. Analisis Data

Data yang diperoleh berupa perubahan pada membran alveolus, lumen alveolus dan hubungan antar alveolus. Setelah data terkumpul, data diuji menggunakan perangkat lunak komputer dengan menggunakan uji non parametric *chi square* dan dikatakan bermakna bila data expected <5 sebanyak 22.5%. Bila data tidak terdistribusi normal, maka diperlukan uji alternatif *Kruskal-Wallis* bila $p < 0.05$ berarti dianggap bermakna. Selanjutnya dianalisis dengan uji *Post Hoc* yaitu uji *Mann-Whitney*.²⁷