

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Merokok menjadi salah satu trend dunia yang diperkirakan akan menjadi epidemi dimasa yang akan datang (Kundu et al., 2023). Secara global, menurut WHO (*World Health Organization*) dalam laporan global WHO tentang tren prevalensi penggunaan tembakau 2000-2025 menyatakan bahwa dalam bentuk apapun tembakau yang digunakan dapat membunuh dan mengakibatkan jutaan orang sakit setiap tahun. Pada tahun 2019, lebih dari 8 juta orang meninggal akibat dari penyakit yang terkait tembakau (Commar et al., 2021). Hasil data GATS (*The Global Adult Tobacco Survey*) di Indonesia pada tahun 2021, didapatkan hasil yaitu 70,2 juta orang dewasa yang merokok (GATS, 2021). Cara paling populer untuk mengonsumsi tembakau di dunia adalah melalui rokok, tetapi produk tembakau lainnya juga dapat menyebabkan bahaya. Produk-produk tersebut meliputi rokok elektrik, cerutu, rokok liting, pipa, dan berbagai produk tembakau tanpa asap (Prijić & Igić, 2021).

Terdapat 4000 senyawa berbahaya dalam setiap batang rokok yang berbahaya bagi kesehatan tubuh, seperti arsenik, karbon monoksida, amonia, kadmium, aseton, urea, dan lain-lain (Setiawan et al., 2023). Nikotin adalah salah satu zat yang beracun. Kandungan nikotin berisi 10-12 mg dalam rokok. Seorang perokok dapat menghisap 1,1 hingga 1,8 mg nikotin dalam satu batang rokok sampai habis (Prijić & Igić, 2021). Pada tahun 1963, rokok elektrik pertama kali di buat oleh Herbert A. Gilbert, kemudian di design ulang oleh Hon Lik dari Tiongkok. Pada tahun 2007, rokok elektrik masuk di pasaran Amerika Serikat, dan menjadi trend di kalangan anak muda. Rokok elektrik dipromosikan pada dunia pasar sebagai yang memiliki dampak kesehatan yang lebih aman dari rokok konvensional dan mengurangi bahaya bagi perokok saat ini (Bhalerao et al., 2019).

Rokok elektrik adalah suatu perangkat elektronik yang menghantarkan asap rokok ke sistem pernapasan dalam bentuk asap yang berupa aerosol dengan kandungannya yaitu nikotin, gliserin, propilen glikol dan zat adiktif lainnya (Song et al., 2023). Pada rokok elektrik terdapat zat logam berat seperti Arsenic (As), Cadmium (Cd), Chromium (Cr), Nikel (Ni), *Copper* (Cu), dan timbal (Pb) (Granata et al., 2024). Nikotin terdapat pada rokok konvensional maupun rokok elektrik, nikotin sebagai zat aditif dari produk tembakau. Produsen rokok elektrik



...va kandungan nikotin dalam satu rokok elektrik setara dengan
...kok konvensional yang berisi 20 batang rokok (Almeida-da-Silva
...rokok dapat menyebabkan berbagai penyakit (Balatif, 2020).
...it seperti penyakit kardiovaskular, penyakit pernapasan kronis,
...al., 2023), dan gangguan neurologis (Kotewar et al., 2023).
...erikan dampak negatif pada fungsi ginjal dan menjadi faktor

risiko utama terjadinya kanker ginjal dan penyakit ginjal kronis (Bandiera et al., 2021).

Senyawa beracun seperti tar, nikotin, dan karbon monoksida dapat menyebabkan stres oksidatif, meningkatkan pembentukan radikal bebas, dan menyebabkan reaksi peradangan pada sel manusia (Setiawan et al., 2023). Nikotin dapat membuat perubahan pada pembuluh darah ginjal, karena ginjal memiliki tingkat vaskularisasi yang tinggi (Moraes et al., 2022). Nikotin juga dapat menjadi stimulus yang kuat agar terjadi proliferasi sel mesangial dan menghasilkan fibronektin yang dapat memperparah kerusakan pada glomerulus (Moraes et al., 2021). Baik nikotin maupun kadmium dikenal sebagai nefrotoksin. Merokok dan terpapar kadmium dalam kadar rendah di lingkungan dikaitkan dengan disfungsi glomerulus dan tubulus (Lang & Schiffli, 2024).

Obesitas dan merokok mungkin berkontribusi pada kerusakan ginjal, tetapi bukti yang mendukung hubungan tersebut masih lemah dan tidak konsisten dibandingkan dengan faktor risiko seperti diabetes, tekanan darah tinggi, dan penggunaan obat penghilang nyeri jangka panjang (Vupputuri & Sandler, 2003). Pada penelitian Münzel et al., 2020, rokok menyebabkan banyak penyakit. Rokok elektrik dianggap sebagai pengganti rokok karena mengandung 9 hingga 450 kali lebih sedikit bahan kimia beracun daripada asap rokok konvensional. Namun, itu tidak berarti bahwa rokok elektrik tidak memiliki efek negatif (Xu et al., 2023). Paparan asap rokok dapat mengubah struktur dan morfologi ginjal beserta perubahan biomarker serum kreatinin (Moraes et al., 2021) dan urea (Bandiera et al., 2021). Belum dipahami dengan jelas efek paparan asap rokok pada ginjal dan hasil toksisitas dari rokok elektrik dibandingkan dengan rokok konvensional (Xu et al., 2023). Oleh karena itu, penelitian ini dimaksudkan untuk membandingkan efek paparan asap rokok elektrik dan konvensional pada fungsi dan struktur jaringan ginjal serta mengevaluasi kontribusi peningkatan berat badan pada kerusakan ginjal menggunakan hewan model tikus.

1.2 Rumusan Masalah

Dari penjelasan latar belakang masalah, maka rumusan masalah dalam penelitian ini, adalah:

- a. Bagaimana dampak paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap fungsi ginjal tikus wistar berdasarkan parameter serum ureum, kreatinin dan *Glomerular Filtration Rate* (GFR)?
- b. Bagaimana dampak paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap perubahan berat ginjal dan struktur mikroskopik ginjal dengan an perubahan berat badan pada tikus wistar?



1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efek paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap kerusakan ginjal hewan percobaan tikus wistar.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui efek paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap kadar ureum tikus wistar.
- b. Untuk mengetahui efek paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap kadar kreatinin tikus wistar.
- c. Untuk mengetahui efek paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap laju filtrasi glomerulus tikus wistar.
- d. Untuk mengetahui efek paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap berat ginjal tikus wistar.
- e. Untuk mengetahui efek paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap struktur mikroskopik ginjal dengan memperhatikan perubahan berat badan tikus wistar.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat pengembangan ilmu

Manfaat yang diharapkan untuk pengembangan ilmu yaitu memberikan tambahan penelitian baru untuk bidang ilmu toksikologi dan urogenital, terkhusus pada efek yang dihasilkan dari paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional terhadap kerusakan ginjal. Manfaat lain dari penelitian ini diharapkan bisa menjadi edukasi kepada Masyarakat, terkait efek dari asap rokok elektrik dan rokok konvensional serta risiko kesehatan terhadap ginjal.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat memberikan manfaat praktis untuk pengembangan ilmu dan menjadi penunjang regulasi baru untuk kebijakan terkait penggunaan rokok elektrik dan rokok konvensional, terkhusus pada dampak kesehatan ginjal. Selain itu, hasil penelitian ini dapat digunakan oleh Lembaga Kesehatan dalam membuat program edukasi publik pada bahaya penggunaan rokok elektrik dan rokok konvensional terkhusus pada kesehatan ginjal.



Penelitian Pendukung

penelitian pendukung dalam penelitian ini yang telah dilakukan oleh orang-orangnya, yaitu:

Soesna et al., 2021 yang berjudul "*Morphofunctional Study on the Passive Smoking in Kidney of Rats*", melaporkan bahwa pengaruh paparan asap rokok dapat mengubah morfologi dan struktur dari ginjal. Penelitian ini melakukan pemeriksaan berupa glukosa, kreatinin urin,

serum kreatinin, *creatinine clearance* dan menilai volume urin. Tikus dengan paparan asap rokok secara bertahap dipaparkan asap rokok, mulai dari dua hingga 40 batang per hari selama 7–28 hari untuk beradaptasi dengan kandungan tar 10 mg, nikotin 0,8 mg, dan carbonmonoksida 10 mg. Pembakaran dilakukan setiap enam jam dengan mesin perokok otomatis yang membakar 10 batang per siklus. Hasilnya adalah laju filtrasi glomerulus yang lebih rendah, yang menunjukkan fungsi ginjal terganggu oleh paparan asap rokok. **Persamaan**, penelitian ini melakukan pemeriksaan pada morfologi dan struktur jaringan berdasarkan histologi ginjal, dan menilai biomarker serum kreatinin. Dengan menggunakan rokok konvensional pada penelitian tersebut. **Nilai Kebaharuan**, penelitian selanjutnya yang dilakukan yaitu dengan tambahan pada paparan asap rokok elektrik yang dibandingkan dengan paparan asap rokok konvensional terhadap kerusakan ginjal, dengan tambahan biomarker pemeriksaan serum ureum.

- b. Penelitian Bandiera et al., 2021 yang berjudul “*Hepatic and Renal Damage by Alcohol and Cigarette Smoking in Rats*”, melaporkan bahwa nekrosis hati dan ginjal dipicu oleh konsumsi alkohol, paparan asap rokok, atau terutama kombinasi keduanya, dan kerusakan ini terkait dengan perubahan biokimia pada tikus. Pemberian dosis nikotin pada rokok yaitu 0,8 mg nikotin/batang rokok. Serum kreatinin mengalami peningkatan yang signifikan setelah paparan asap rokok. Disisi lain, kadar urea serum mengalami penurunan pada tikus yang terpapar asap rokok atau diberikan alkohol. Asap rokok yang digunakan dari rokok konvensional. **Persamaan**, pada biomarker yang akan diperiksa. **Nilai Kebaharuan**, penelitian selanjutnya yang akan dilakukan yaitu dengan rokok elektrik yang memberikan efek pada kerusakan ginjal, sehingga dapat dilakukan perbandingan dengan rokok konvensional.
- c. Penelitian Xu et al., 2023 yang berjudul “*The Toxic Effects of Electronic Cigarette Aerosol and Cigarette Smoke on Cardiovascular, Gastrointestinal and Renal System in Mice*”, melaporkan bahwa pada penelitian ini dilakukan perbandingan asap rokok elektrik dan rokok konvensional pada bagian Jantung, Gastrointestinal dan Ginjal. Dosis nikotin untuk rokok elektrik bervariasi antara 6 mg/kg dan 12 mg/kg, sedangkan dosis nikotin untuk rokok konvensional adalah 6 mg/kg. Baik asap rokok konvensional maupun rokok elektrik ditemukan dapat menurunkan saturasi oksigen darah, meskipun efek asap rokok konvensional tampak lebih berbahaya. Lebih lanjut, aliran gastrointestinal tikus terpapar asap rokok konvensional elektrik, dengan asap rokok konvensional menyebabkan lebih banyak kerusakan pada rongga mulut daripada rokok elektrik. Duodenum hanya mengalami kerusakan kecil pada semua kelompok, hati dan ginjal kiri tidak menunjukkan tanda-tanda penyakit ginjal yang signifikan. **Perbedaan**, pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan histopatologi untuk memeriksa kerusakan jaringan pada organ

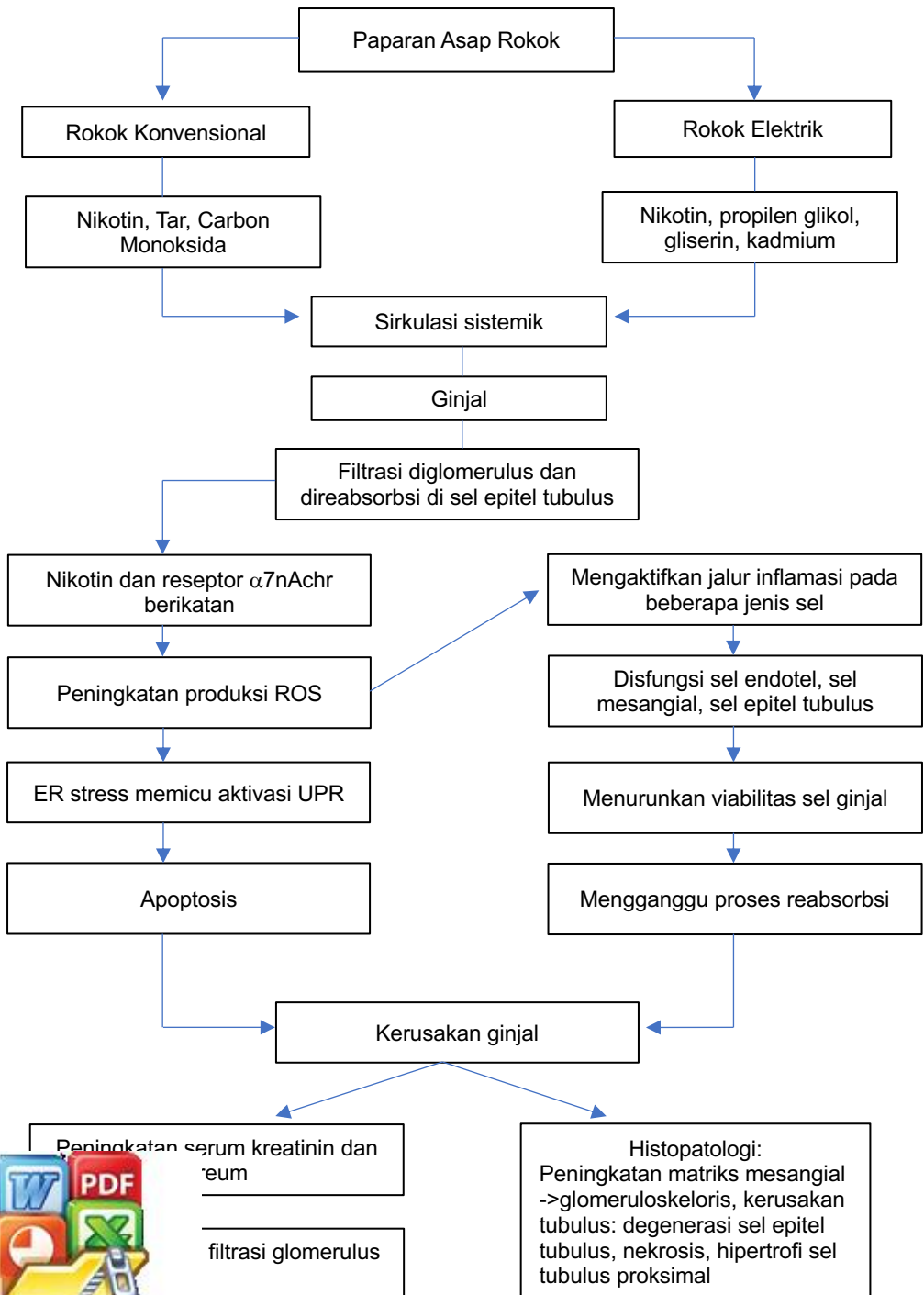


ginjal kiri. **Nilai Kebaharuan**, penelitian akan dilakukan perbandingan asap rokok elektrik dan rokok konvensional dengan menambahkan biomarker kreatinin dan ureum untuk fungsi ginjal, dan histopatologi ginjal kanan.

- d. Penelitian Alizadeh et al., 2021 yang berjudul "*Exposure of Cigarette Smooke Aggravates Noise Induced Kidney Damage*", melaporkan bahwa paparan asap rokok dan/atau kebisingan merusak fungsi ginjal. Dosis paparan rokok konvensional adalah 10 batang rokok per hari selama 4 jam, dengan durasi 2 minggu (5 hari per minggu). Tampaknya proses yang menyebabkan nefrotoksisitas zat ini disebabkan sebagian, oleh produksi stres oksidatif. Meskipun demikian, gangguan fungsi ginjal yang disebabkan oleh kebisingan diperburuk oleh asap rokok. Fungsi ginjal dinilai dengan *Blood Urea Nitrogen* (BUN) dan kadar serum kreatinin dengan metode pikrat Jaffe Alkali. Terjadi peningkatan yang signifikan pada BUN dan serum kreatinin pada tikus yang terpapar kebisingan, asap rokok, maupun keduanya. **Perbedaan**, pada penelitian ini perlakuan tambahan berupa paparan kebisingan. **Nilai Kebaharuan**, penelitian selanjutnya melakukan perbandingan dengan efek dari paparan asap rokok elektrik terhadap kerusakan ginjal dengan melihat histopatologi ginjal dan pemeriksaan serum ureum kreatinin.
- e. Penelitian Jannat et al., 2024 yang berjudul "*Exposure to Tobacco (Nicotiana tabacum) Extract and Cigarette Smoke Induces Hematological and Histopathological Alterations in Swiss Albino Mice*", melaporkan bahwa pemberian ekstrak tembakau (*Nicotiana tabacum*) dan paparan asap rokok pada parameter perilaku, hematologi, dan histopatologi organ paru, hati dan ginjal terjadi perubahan signifikan pada parameter tersebut. Dosis nikotin 1 batang rokok yaitu 1 mg/nikotin. Seperti pada organ ginjal, terjadi kerusakan di tubulus ginjal, edema dan degenerasi glomerulus. **Persamaan**, pemeriksaan histopatologi dilakukan. **Nilai Kebaharuan**, dilakukan perbandingan pada paparan asap rokok untuk menilai tingkat kerusakan pada ginjal, serta menilai fungsi ginjal dengan parameter serum kreatinin dan ureum.
- f. Penelitian Feng et al., 2023 yang berjudul "*Effect of E-Vaping on Kidney Health in Mice Consuming a High-Fat-Diet*", melaporkan bahwa tikus yang diberikan diet tinggi lemak dan paparan asap rokok elektrik dapat menyebabkan kerusakan ginjal. Paparan dilakukan selama 5 minggu dengan dosis nikotin pada rokok elektrik yaitu 18 mg/mL. **Nilai Kebaharuan**, dilakukan perbandingan dengan paparan asap rokok konvensional dan mengukur biomarker fungsi ginjal yaitu kreatinin dan ureum.



1.6 Kerangka Teori

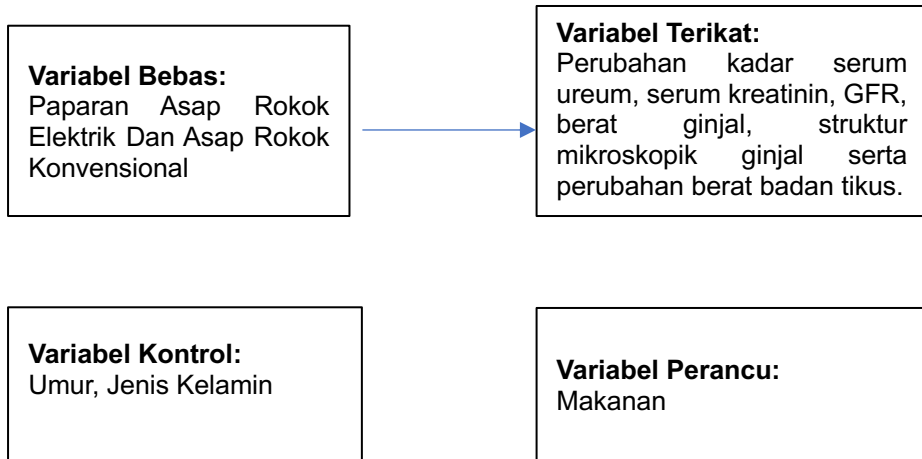


Kerangka Teori. Keterangan: $\alpha 7nAchr$ = reseptor $\alpha 7$ asetilkolin, ROS = Reactive Oxygen Species, ER = Endoplasmic Reticulum, UPR = Unfolded Protein Response



(Hall & Hall, 2020; Andrews et al., 2019; Lang & Schiff, 2024; Yan & Allen, 2021; Zheng et al., 2020; Wang & Su, 2024; Kumar et al., 2022).

1.7 Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka Konsep Penelitian

1.8 Hipotesis

1.8.1 Hipotesis Nol (H_0)

- Paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional tidak memiliki efek signifikan terhadap kadar kreatinin tikus wistar.
- Paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional tidak memiliki efek signifikan terhadap kadar ureum tikus wistar.
- Paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional tidak memiliki efek signifikan terhadap laju filtrasi glomerulus tikus wistar.
- Paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional tidak memiliki efek signifikan terhadap berat ginjal tikus wistar.
- Paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional tidak memiliki efek signifikan terhadap struktur mikroskopik ginjal serta pengaruh perubahan berat badan tikus wistar.

1.8.2 Hipotesis Alternatif (H_1)

- Paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional memiliki efek signifikan terhadap kadar kreatinin tikus wistar.
- Paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional memiliki efek signifikan terhadap kadar ureum tikus wistar.
- Paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional memiliki efek signifikan terhadap laju filtrasi glomerulus tikus wistar.
- Paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional memiliki efek signifikan terhadap berat ginjal tikus wistar.



- e. Paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional memiliki efek signifikan terhadap struktur mikroskopik ginjal serta pengaruh perubahan berat badan tikus wistar.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan eksperimental laboratorium, dimana subjek penelitian menggunakan hewan percobaan, diberikan perlakuan berupa paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional. Pada penelitian ini design yang digunakan yaitu *post test only control group design*. Pengambilan sampel pada penelitian ini yaitu *random assignment*, dimana subjek dipilih berdasarkan kriteria tertentu yang relevan dengan tujuan penelitian. Sampel yang digunakan adalah tikus wistar jantan dengan berat 90 gram – 150gram, yang dipilih secara sengaja untuk memastikan keseragaman dalam faktor usia, berat badan dan tikus Wistar yang dipilih juga harus sehat.

2.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di beberapa tempat. Pada pemeliharaan tikus dan perlakuan pada tikus dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin. Pemeriksaan kadar Ureum dan Kreatinin dilakukan di Laboratorium Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin. Untuk pemeriksaan dan pembuatan histopatologi ginjal dilaksanakan di Rumah Sakit Hewan, Universitas Hasanuddin. Penelitian akan dilaksanakan pada bulan-bulan November - Desember 2024.

2.3 Subjek Penelitian

2.3.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah tikus *Wistar Jantan (Rattus norvegicus)* strain wistar. Berumur 6-8 minggu dengan berat tikus yaitu 90 gram - 150 gram sesuai dengan sampel kriteria inklusi pada penelitian ini. Tikus yang digunakan didapatkan dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Universitas Hasanuddin. Pada tahap pemeliharaan tikus diaklimatisasi selama 7 hari dan dipelihara di dalam ruangan dengan ventilasi yang baik dan suhu ruangan 18-26⁰ C pada pencahayaan yang baik. Tikus wistar jantan diberikan pakan yang standar dan minum secukupnya.

2.3.2 Sampel



Sampel

Jumlah sampel menggunakan rumus sebagai berikut:

$$n \times t \times Federer = (n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan:

n = besar sampel setiap kelompok

t = jumlah kelompok

Menurut rumus Federer, banyaknya sampel yang diperlukan, yaitu:

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

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

$$n-1 \geq 15/2$$

$$n-1 \geq 7.5$$

$$n \geq 8.5 \text{ menjadi } n \geq 8$$

$$\begin{aligned} \text{Besar sampel} &= t \times n \\ &= 3 \times 8 \\ &= 24 \end{aligned}$$

Jumlah sampel dalam penelitian ini dihitung berdasarkan rumus Federer, yang digunakan untuk menentukan jumlah minimum hewan uji per kelompok dalam penelitian eksperimental. Berdasarkan rumus tersebut, jumlah sampel minimum untuk setiap kelompok adalah 8 ekor. Penelitian ini terdiri atas tiga kelompok perlakuan, sehingga jumlah total sampel yang dibutuhkan adalah 24 ekor tikus Wistar.

b. Kriteria Inklusi

1. Tikus Wistar jantan;
2. Berusia 6-8 minggu;
3. Berat Badan Tikus yaitu 90 sampai 150 gram;
4. Tikus Wistar dalam keadaan sehat.

c. Kriteria *Drop Out*

1. Tikus wistar yang mati saat dilakukan intervensi.

2.4 Variabel Penelitian

2.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini yaitu paparan asap rokok elektrik dan rokok konvensional.

2.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini yaitu kadar serum ureum, serum kreatinin, GFR, berat ginjal, struktur mikroskopik serta perubahan berat badan.



sional

Elektrik

Elektrik adalah hasil penguapan cairan oleh elemen pemanas pemanasan dalam rokok elektrik berupa aerosol yang mengandung aditif lainnya. Jenis rokok elektrik yaitu Pod Joiway dengan foam rasa *coca cola* dengan kandungan nikotin 30mg/30 ml. Paparan pada tikus yaitu 1,8 mg/1,8 ml nikotin per hari selama 30 hari.

2.5.2 Asap Rokok Konvensional

Asap rokok konvensional adalah olahan tembakau dari hasil pembakaran yang menghasilkan asap rokok mengandung nikotin. Merek rokok yang digunakan pada penelitian ini, yaitu Djarum Super 12, dengan kandungan nikotin 1,8 mg. Dosis pemberian pada tikus yaitu 1,8 mg nikotin per hari selama 30 hari.

2.5.3 Kreatinin Serum

Kreatinin adalah katabolisme kreatin dari otot (Andrews et al., 2019). Konsentrasi kadar kreatinin dalam darah yang diukur dengan alat *HumaLyzer 4000 Semi-Automated Photometer* produksi oleh perusahaan *Human Diagnostics Worldwide* yang berada di negara Jerman. Hasil diukur setelah dilakukan paparan asap rokok selama 30 hari terhadap tikus wistar jantan. Kadar dihitung dalam satuan mg/dl.

2.5.4 Ureum Serum

Urea adalah hasil sampingan dari metabolisme protein (Salazar, 2014). Konsentrasi kadar urea dalam darah yang diukur menggunakan alat *HumaLyzer 4000 Semi-Automated Photometer* produksi oleh perusahaan *Human Diagnostics Worldwide* yang berada di negara Jerman. Hasil diukur setelah dilakukan paparan asap rokok selama 30 hari terhadap tikus wistar jantan. Kadar dihitung dalam satuan mg/dl.

2.5.5 Berat Ginjal dan Struktur Mikroskopik Ginjal

Pada penelitian ini organ ginjal kanan dibedah dan ditimbang menggunakan timbangan analitik Ohaus PR Series merek Ohaus yang diproduksi dari Ohaus Corporation perusahaan yang berbasis di Amerika Serikat. Jaringan difiksasi di larutan formalin 10%, kemudian dilakukan teknik parafin. Jaringan yang dipotong setebal 4-5 μm dan diwarnai *Hematoxylin & Eosin* (HE) untuk pemeriksaan histologis. Fotomikrograf representatif didapatkan dengan mikroskop cahaya yang dipasang dengan kamera Olympus CX33 (Olympus, Tokyo, Jepang) menggunakan lensa objektif pembesaran 10x dan 40x. Berat ginjal kanan gram (g). Parameter histologi: Glomerulus dan Tubulus ginjal. Pengamatan dilakukan pada lima lapang pandang untuk setiap sampel ginjal yang diperiksa. Kerusakan pada glomerulus ditandai dengan adanya pembesaran atau penyempitan glomerulus dan ruang kapsuler, serta adanya butir-butir eritrosit. Kerusakan pada tubulus ditandai dengan adanya degenerasi, lumen yang tidak jelas, nekrosis pada sel-sel.



Analisis data gambar dalam penelitian ini dilakukan menggunakan perangkat lunak analisis gambar. Analisis data kuantitatif dengan membandingkan tingkat kerusakan ginjal pada kelompok perlakuan. Kemudian, data yang diperoleh dari preparat histopatologi ginjal tikus dianalisis menggunakan perangkat lunak analisis gambar. Untuk mengevaluasi histopatologi ginjal menggunakan perangkat lunak analisis gambar yang lebih sensitive, penilaian lesi glomerular dan tubulointersisial dilakukan dengan analisis gambar dengan pembesaran 10x dan 40x (Rangan & Tesch, 2007).

Tingkat kerusakan	Interpretasi
(0) Tidak ada	Normal
(1) Tingkat	< 10% parenkim ginjal yang terkena
(2) Ringan	Kerusakan sel sebesar 10-25% pada area parenkim ginjal
(3) Sedang	Kerusakan sel sebesar 25-75% pada area parenkim ginjal
(4) Difus/luas	Kerusakan sel sebesar >75% pada area parenkim ginjal

Interpretasi tingkat kerusakan pada korteks atau medulla ginjal (Arany et al., 2011).

Tingkat kerusakan glomerulus dan tubulointerstitial dihitung sebagai $[A/B] \times 100\%$, di mana (A) merupakan jumlah kerusakan dalam satu *grid*, dan (B) adalah jumlah total *grid*, yaitu 88 bidang pandang. Hasilnya dikalikan dengan 100% untuk mendapatkan persentase.

2.5.6 Berat Badan

Pada penelitian ini berat badan tikus diukur setelah masa adaptasi selama 7 hari dan sesudah paparan asap rokok pada hari ke-31, menggunakan timbangan digital. Untuk mengklasifikasikan obesitas pada tikus, digunakan indeks lee. Berat badan dalam satuan gram (g). Hitung indeks lee yaitu akar pangkat tiga dari berat badan (gram) dibagi dengan panjang naso-anal (cm). Hasil > 300 gram, indikasi obesitas pada tikus (Syarif et al., 2024).

2.5.7 Glomerular Filtration Rate (GFR)

Pada penelitian ini pemantau fungsi ginjal dengan mengukur *Glomerular Filtration Rate* (GFR). Rumus *estimated GFR* (eGFR) pada tikus yaitu:

$$\text{Plasma creatinine} < 52 \mu\text{mol/L: eGFR} = 880 \times W^{0,695} \times C^{-0,660} \times U^{-0,391}$$

$$\text{Plasma creatinine} \geq 52 \mu\text{mol/L: eGFR} = 5862 \times W^{0,695} \times C^{-1,150} \times U^{-0,391}$$

eGFR dengan satuan GFR ($\mu\text{L}/\text{mnt}$), W adalah *weight* yang di ukur yaitu berat badan sesudah paparan asap rokok dan tanpa paparan asap rokok untuk kelompok kontrol gram (g), C adalah *creatinine* yang diukur dengan $\mu\text{mol/L}$, dan U adalah urea yang diukur dengan satuan mmol/L (Besseling et al., 2021).



elitian

g box

standar tikus

anakan dan botol minum tikus

- d. Penutup kawat
- e. Timbangan analitik Ohaus
- f. Spoit 3 cc, 5 cc
- g. Pipet mikroliter
- h. *Disposable glass capillary*
- i. Masker dan sarung tangan steril
- j. Kertas label
- k. Aluminium foil
- l. Serum tube
- m. tabung
- n. centrifuge
- o. Alas bedah tikus (*underpads*)
- p. Peralatan bedah seperti pisau bedah, pinset, gunting, jarum pentul
- q. *HumaLyzer 4000 Semi-automated Photometer*
- r. *Rotary microtome*
- s. Kaca objek
- t. Mikroskop cahaya
- u. Kamera mikroskop digital
- v. Komputer dengan aplikasi imageJ
- w. Timbangan digital

2.6.2 Bahan

- a. Tikus wistar jantan (24 ekor)
- b. Rokok elektrik
- c. Rokok konvensional
- d. Pakan tikus *Wistar*
- e. Air minum tikus *Wistar*
- f. Sekam tikus *Wistar*
- g. Reagen Urea
- h. Reagen Kreatinin
- i. Aquabidest
- j. Paraffin cair
- k. Reagen *Hematoxyllin Eosin* (HE)
- l. Formalin 10%
- m. Sodium Chloride (NaCl 0,9%)
- n. Entelan
- o. Eter



alitian

ersiapan

tikus diadaptasikan dengan lingkungan baru selama 7 hari kandang standar yang steril dengan akses makan dan minum *ad*

- b. Pembagian kelompok akan dibagi 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol (K) yang tidak dilakukan paparan asap rokok. Sedangkan, pada kelompok rokok konvensional (V) dan rokok elektrik (E) diberikan paparan asap rokok.
- c. Pada kelompok K, Kelompok V dan Kelompok E, setiap kandang berisi 8 ekor tikus dengan total yaitu 24 ekor tikus.

2.7.2 Tahap Intervensi

- a. Sebelum memulai pemaparan penuh, dilakukan masa adaptasi selama 3 hari dengan memberikan dosis rokok 1,8 mg nikotin per sesi untuk kelompok rokok elektrik dan kelompok rokok konvensional.
- b. Kelompok kontrol (K): tikus hanya diberikan makan dan minum *ad libitum*.
- c. Kelompok rokok elektrik (E): tikus diberikan minum dan makan *ad libitum* serta diberikan paparan asap rokok elektrik. Tikus diberikan paparan asap rokok di dalam sebuah *smoking box*. Dalam satu *smoking box* berisi 1 tikus yang dipaparkan asap rokok elektrik. Tikus diberikan dosis nikotin 1,8 mg/1,8 ml rokok elektrik untuk tiap *smoking box* dengan durasi paparan selama 15 menit/tikus. Paparan asap rokok 1 kali sehari selama 30 hari.
- d. Kelompok rokok konvensional (V): tikus diberikan minum dan makan *ad libitum* serta diberikan paparan asap rokok konvensional dengan kandungan kadar nikotin 1,8 mg dan tar 32 mg per batang rokok. Tikus diberikan paparan asap rokok didalam *smoking box*. Setiap *smoking box* berisi satu tikus yang diberikan paparan asap rokok sebanyak 1 batang rokok dengan durasi paparan 30 menit/tikus. Paparan 1 kali sehari selama 30 hari.

2.7.3 Tahap Pemeriksaan Darah

- a. Pengambilan darah dilakukan pada hari ke 31
- b. Tikus dilakukan anestesi inhalasi dengan diberikan eter di tuangkan di kapas yang dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup rapat. Tikus dimasukkan ke dalam wadah tersebut kurang lebih 3 menit, hal ini dilakukan untuk mengurangi stress dan rasa sakit selama prosedur.
- c. Kepala tikus ditahan dengan lembut untuk memastikan mata terlihat jelas. Gunakan alat pelindung untuk mencegah tikus bergerak secara tiba-tiba.
- d. Dengan metode pleksus retroorbitalis, masukkan *disposable glass capillary* secara perlahan kesudut medial mata pada pembuluh darah vena, kemudian sebanyak 3 cc darah yang dimasukkan kedalam serum tube



darah yang dikumpulkan kemudian di proses untuk di sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Ambil bagian atas serum yang berwarna kekuningan lalu pindahkan ke tabung yang akan pemeriksaan menggunakan alat *humaLyzer 4000 semi- α photometer*.

- f. Pemeriksaan serum ureum. Sampel serum sebanyak 10 μ l ditambah reagen 1 sebanyak 1000 μ l atau 1 mL kemudian di homogenkan. Setelah homogen, inkubasi yang pertama dilakukan secara eksternal dengan durasi 3 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C. Selanjutnya ditambahkan reagen 2 sebanyak 1000 μ l atau 1 mL, dilakukan inkubasi kedua secara eksternal selama 5 menit pada suhu 37 $^{\circ}$ C. Pengukuran absorbansinya dengan panjang gelombang 578 nm dan hasil akan muncul pada layar *HumaLyzer*. Nilai hasil dinyatakan dalam satuan miligram per desiliter (mg/dL) dan diverifikasi oleh analis.
- g. Pemeriksaan serum kreatinin. Untuk mendapatkan *working reagent* dilakukan dengan cara mencampur Sodium Hydroxide (NaOH) sebagai reagen 1 dengan Picric Acid (PIC) sebagai reagen 2, dengan perbandingan 4:1 lalu dihomogenkan. Selanjutnya, sampel serum diambil sebanyak 100 μ l dan ditambahkan 1 mL *working reagent* dan dihomogenkan. Setelah homogen, dilakukan inkubasi internal dalam *HumaLyzer* dengan durasi 90 detik pada suhu 37 $^{\circ}$ C. Pengukuran absorbansinya dengan panjang gelombang 505 nm dan hasil akan muncul pada layar *HumaLyzer*. Nilai hasil dinyatakan dalam satuan miligram per desiliter (mg/dL) dan diverifikasi oleh analis.
- h. Pemeriksaan kadar ureum dan kreatinin dilakukan di Laboratorium Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

2.7.4 Tahap Pembuatan Preparat Histologi Ginjal Tikus Wistar

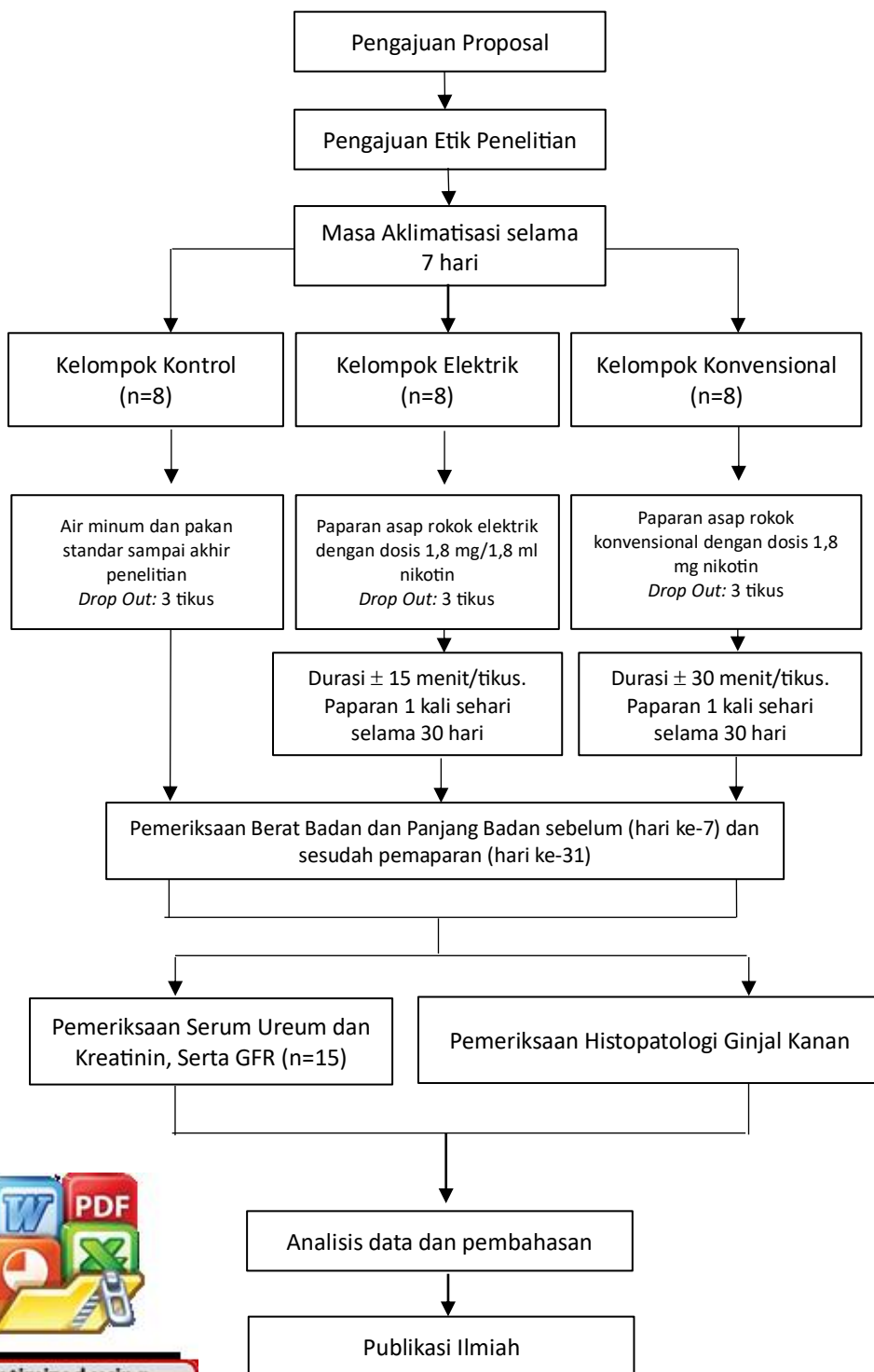
- a. Tikus dianastesi dengan anastesi inhalasi yaitu Eter dengan dosis letal, kurang lebih sebanyak 10 ml di tuangkan di kapas kemudian di letakkan di wadah yang tertutup rapat. Tikus dimasukkan kedalam wadah tersebut dan ditutup rapat. Setelah kehilangan kesadaran, dengan memantau nafas dan denyut jantung dengan meraba dada tikus untuk memastikan tikus telah mati.
- b. Tikus *Wistar* diletakkan diatas papan bedah yang telah di lapiasi *underpads*. Tikus dibedah untuk mengambil kedua ginjal. Setelah pengambilan ginjal, segera dicuci menggunakan larutan fisiologis Sodium Chloride (NaCl 0,9%) agar darah yang menempel hilang, selanjutnya diletakkan diatas alumunium foil dan ditimbang dengan timbangan analitik PR *series* Ohaus. Selanjutnya, difiksasi menggunakan larutan formalin 10% kurang lebih selama 12-24 jam untuk pemeriksaan histologi. Diberikan label untuk ginjal kanan dan ginjal kiri dengan tabung terpisah.
- c. Tahap dehidrasi, rendam jaringan dalam alkohol secara bertahap yaitu 70% selama 1 jam, alkohol 80% selama 1 jam, alkohol 90% selama 1 jam dan terakhir alkohol 100% selama 1 jam. Diverifikasi, masukkan jaringan ke dalam larutan xylol selama 1-2 jam untuk menghilangkan alkohol dan agar jaringan terlihat jelas.



- e. Tahap infiltrasi dan *embedding*, masukkan jaringan ke dalam paraffin pada suhu sekitar 60°C selama 6-8 jam, kemudian pada tahap *embedding*, jaringan ditempatkan dicetakan agar paraffin mulai mengeras.
- f. Tahap pemotongan, menggunakan alat mikrotom dengan memotong jaringan ginjal kanan setebal 4-5 μm .
- g. Pemeriksaan dilanjutkan dengan pewarnaan *Haematoxyllin and Eosin* (HE), bilas dengan air dan dehidrasi dengan alkohol 100%. Tempelkan preparat di slide kaca beri mounting medium dan tutup dengan gelas penutup. Pembuatan sampel histologi dilakukan di Rumah Sakit Hewan, Universitas Hasanuddin.
- h. Selanjutnya, preparat diamati dibawah mikroskop cahaya untuk fotomikrograf representatif didapatkan dengan mikroskop cahaya yang dipasang dengan kamera Olympus CX33 (Olympus, Tokyo, Jepang) menggunakan lensa objektif pembesaran 10x dan 40x.



2.8 Alur Penelitian



Gambar 3. Diagram alur penelitian

2.9 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan menggunakan *International Business Machines Statistical Product and Social Solutions (IBM SPSS) 29.0* dengan pendekatan univariat dan bivariat. Analisis univariat digunakan untuk mendeskripsikan distribusi dan karakteristik seluruh variabel penelitian, baik sebelum maupun sesudah penelitian. Distribusi data diuji menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk*. Jika nilai signifikansi $\geq 0,05$, data dianggap terdistribusi normal dan dianalisis menggunakan *uji One-Way Anova* untuk membandingkan kelompok kontrol, kelompok rokok elektrik, dan kelompok rokok konvensional. Jika data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$), maka digunakan *uji Kruskal-Wallis* sebagai alternatif non-parametrik. Analisis bivariat dilakukan untuk mengevaluasi hubungan antar variabel dalam kelompok yang sama maupun antar kelompok yang berbeda. Untuk melihat perbedaan berat badan sebelum dan sesudah perlakuan dalam masing-masing kelompok, digunakan *Paired Sample T-Test*, guna menentukan apakah terdapat perbedaan signifikan dalam berat badan. Perbandingan ureum, GFR, berat ginjal, histopatologi ginjal antar kelompok beserta obesitas dianalisis menggunakan *One-Way Anova*, dengan nilai $p < 0,05$ sebagai batas signifikansi. Selain itu, *uji Tukey* juga dilakukan untuk analisis histopatologi guna mengevaluasi perbedaan spesifik antar kelompok. Seluruh analisis statistik dilakukan dengan tingkat kepercayaan 95% ($p < 0,05$) untuk menentukan signifikansi perbedaan antar kelompok.

2.10 Etik Dalam Penelitian

Penelitian ini dilakukan setelah mendapat persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Rumah Sakit Perguruan Tinggi Universitas Hasanuddin (RSPTN UH) nomor etik 1034/UN4.6.4.5.31/PP36/2024 dengan nomor protokol UH24110929.

