

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN TERAPAN**



**STRUKTUR ORGAN REPRODUKSI TIKUS JANTAN SETELAH
TERPAPAR VAPE : MODEL ALTERNATIF UNTUK
PENELITIAN DAN PENGAJARAN**

Tim Pengusul :

Dr. Lisdiana, M.Si	NIDN : 0019115914
Prof. Dr. Retno Sri Iswari, SU	NIDN : 0007025202
Dr.dr. Nugrahaningsih WH, M.Kes	NIDN : 0009076910
Dr.drh. Wulan Christijanti, M.Si	NIDN : 0011096807

Mahasiswa

Nurul Amida	NIM : 4411417024
Dwi Susanto	NIM : 4411417034
Fahmi Zulfikar Farento	NIM : 4401417094

Dibiayai oleh:

Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Universitas Negeri Semarang
Nomor : SP DIPA-023.17.2.677507/2021, tanggal 23 November 2020, sesuai dengan
Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Dana DIPA UNNES Tahun 2021
Nomor 174.26.4/UN37/PPK.3.1/2021, tanggal 26 April 2021

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG

OKTOBER, 2021

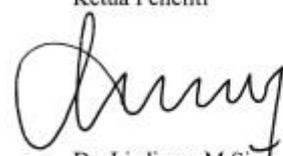
HALAMAN PENGESAHAN PENELITIAN TERAPAN

Judul Penelitian	:	Struktur Organ Reproduksi Tikus Jantan Setelah Terpapar Vape : Model Alternatif untuk Penelitian dan Pengajaran
Ketua Peneliti a. Nama Lengkap b. NIDN c. Jabatan Fungsional d. Pendidikan S2/S3 e. Fakultas/jurusan f. E- mail		Dr. Lisdiana, M.Si 0019115914 Lektor Kepala S3 FMIPA/ Biologi lisdiana@mail.unnes.ac.id
Anggota Peneliti (I) a. Nama Anggota b. NIDN c. Program Studi d. Fakultas		Prof. Dr. Retno Sri Iswari, SU 0007025202 Biologi FMIPA
Anggota Peneliti (II) a. Nama Anggota b. NIDN c. Program Studi d. Fakultas	:	Dr.dr. Nugrahaningsih WH, M.Kes : 0009076910 : Biologi : FMIPA
Anggota Peneliti (III) a. Nama Anggota b. NIP c. Program Studi d. Fakultas	:	Dr. drh. Wulan Christijanti, M.Si : 0011096807 : Biologi : FMIPA
Mahasiswa Terlibat Penelitian a. Nama /NIM b. Nama/NIM c. Nama/NIM		1. Nurul Amida NIM : 4411417024 2. Dwi Susanto NIM : 4411417034 3. Yusuf Bimantoro NIM
Staff Pendukung Penelitian	:	1 Orang, Nama : Sriyadi, S.Pd.
Alumni terlibat Penelitian	:	1 Orang, Nama : Arriza Kurniawan Yusuf, S.Pd
Biaya yang diperlukan		
a. Sumber dana dari LPPM (Universitas Negeri Semarang)	:	Rp 35.000.000,- (Tiga Puluh Lima Juta Rupiah)
b. Sumber Lain, sebutkan	:	Rp 0,00
Jumlah	:	Rp 35.000.000,- (Tiga Puluh Lima Juta Rupiah)

Semarang, 29 Oktober 2021



Mengetahui
Dekan FPMIPA UNNES
UNNES
Dr. Sugianto, M.Si
NIP. 196102191993031001

Ketua Peneliti

Dr. Lisdiana, M.Si
NIP. 195911191986032001

Menyetujui
Ketua LP2M UNNES

Dr. Suwito Eko Pramono, M.Pd
NIP. 195809201985031003

RINGKASAN

Vape atau E-Cigarette adalah modifikasi rokok berupa alat yang berisi cairan dan dioperasikan dengan baterai. Cairan dalam Vape mengandung propelin glikol, gliserol, air suling, perasa dan nikotin pelarut atau *nikotin plus plester*. yang akan berubah menjadi nitronisme bila terkena panas dan bersifat toksik bagi tubuh. Prinsip kerja Vape adalah merubah zat-zat kimia yang terkandung dalam cairan menjadi uap hasil pemanasan baterai dan mengalirkannya ke tubuh perokok. Saat ini banyak perokok beralih menggunakan Vape, dengan harapan mereka tidak terkena dampak dari bahaya merokok, seperti kerusakan struktur organ reproduksi. Dalam jangka panjang penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek buruk penggunaan Vape terhadap berbagai struktur organ di dalam tubuh, sedangkan tujuan pada penelitian ini adaalah untuk menganalisis parameter struktur kerusakan organ reproduksi pada hewan jantan yakni testis. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan hewan coba tikus Wistar jantan yang dipapar asap Vape. Penelitian ini dirancang dengan desain “*the post test only control group design*” dengan sampel tikus jantan galur Wistar sebanyak 30 ekor berumur 2-3 bulan dengan berat 200-300 gram dan kondisi sehat. Sampel dibagi menjadi 5 kelompok, yakni kelompok control negative K(-) dan kelompok control positif K (+), serta tiga kelompok perlakuan yakni KP1. KP2 dan KP3 masing masing dipapar dengan Vape dengan kandungan nikotin 3, 6, 9 mg. Paparan dilakukan selama 30 hari. Pada hari ke-31 dilakukan pengambilan organ testis dilakukan preparasi untuk menganalisis struktur testis, pembuatan preparat mikroanatomi testis dilakukan di laboratorium Balai Besar Veteriner (BBVET) Yogyakarta. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada perubahan struktur mikroanatomi testis setelah dipapar vape. Dengan indicator berkurangnya diameter dan ketebalan epitel tubulus seminiferus.

Kata kunci : Vape, struktur testis, pembelajaran Biologi

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmatNya sehingga kami telah selesai melaksanakan penelitian sehingga dapat menyusun laporan kemajuan penelitian dengan judul : Struktur Organ Reproduksi Tikus Jantan Setelah Terpapar Vape : Model Alternatif untuk Penelitian dan Pengajaran

Penelitian ini terlaksana berkat bantuan yang sangat berharga dari berbagai pihak, oleh karena itu peneliti mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Rektor Universitas Negeri Semarang yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian ini
2. Ketua LP2M Unnes Semarang yang telah memberikan kesempatan dalam penelitian ini
3. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam yang telah memberi kesempatan dan ijin untuk melakukan penelitian ini.
4. Ketua Jurusan Biologi FMIPA UNNES, yang telah mensupport dan mengijinkan kegiatan penelitian ini di Laboratorium Biologi.
5. Kepala Laboratorium Biologi FMIPA Unnes yang telah memberikan ijin dan banyak pengarahan
6. Semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini sampai selesai pembuatan laporan kemajuan ini.

Kami menyadari bahwa pelaksanaan dan laporan kemajuan penelitian ini masih banyak ditemui kelemahan, sehingga saran dan kritik yang membangun demi perbaikan penelitian ini sangat kami harapkan.

Semarang, Oktober 2021

Ketua Peneliti

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN.....	iv
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	8
BAB 4. METODE PENELITIAN	9
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	13
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	18
DAFTAR PUSTAKA.....	19
LAMPIRAN	20

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 2.1 Kandungan Senyawaa Kimia pada Rokok Kretek non Filter, Kretek dan Vape.....	6
Tabel 4.1 Pemberian Perlakuan	9
Tabel 4.2 Alat Alat Penelitian	10
Tabel 4.3 Bahan Penelitian	10
Tabel 5.1 Hasil Analisis Ketebalan Epitel Tubulus Seminiferus	13
Tabel 5.2 Hasil Analisis Diameter Tubulus Seminiferus	15

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 Seperangkat Vape Beserta Liquid	3
Gambar 3.1 Alat Modifikasi Nebulizer (Dokumen Pribadi, 2018)	11
Gambar 4.1 1 Rerata Ketebalan Epitel Tubulus Seminiferus Tikus	14
Gambar 4.2 Rerata Diameter Tubulus Seminiferus Tikus	16

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
LAMPIRAN 1. Instrumen Penelitian	20
LAMPIRAN 2. Personalia Penelitian	27

BAB 1. PENDAHULUAN

Prevalensi merokok di Indonesia sangat tinggi diberbagai lapisan masyarakat, terutama laki-laki mulai dari anak-anak, remaja, dan dewasa, menjadikan Indonesia pada posisi urutan ke tiga terbanyak dalam kasus pengguna rokok setelah China dan India Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013, sebesar 85% rumah tangga di Indonesia terpapar asap rokok. Jumlah perokok pria meningkat 14%, sedangkan perokok wanita meningkat sebanyak 2,8% dari tahun 1995 sampai tahun 2011. Tiap tahunnya jumlah perokok semakin meningkat. Jumlah perokok diseluruh dunia meningkat menjadi hampir 1 miliar orang dan sejumlah negara termasuk Indonesia dan Rusia lebih dari separuh jumlah penduduk laki-laki merokok setiap hari. Peningkatan jumlah perokok terjadi karena adanya peningkatan jumlah penduduk yang meningkat 2 kali lipat selama 50 tahun terakhir. Berdasarkan data terbaru ini, jumlah perokok di seluruh dunia meningkat hampir 250 juta orang (Marie, 2014).

Sebagian besar masyarakat sudah mengetahui tentang bahaya merokok, karena dari berbagai instansi melalui papan iklan rokok pun telah menyampaikan hal tersebut, namun kebiasaan merokok tetap banyak dilakukan oleh masyarakat. Pada era ini telah terjadi kemajuan dengan adanya kemunculan Vape yang dipercaya mampu mengurangi efek bahaya dari rokok tembakau. Vape terlihat lebih aman dan tidak beracun daripada rokok tembakau, namun dalam vape masih mengandung nikotin dan bahan kimia lainnya yang berpotensi membahayakan bagi tubuh.

Pada saat ini, terdapat lebih dari 460 nama dagang produk ENDS dengan lebih dari 7.700 rasa. Produk yang dapat diisi ulang dan dibuang merupakan generasi pertama electronic Vape, sedangkan sistem tangki dan personal vaporizer merupakan generasi kedua dan ketiga electronic Vape (Zhu, 2014). Rokok elektronik juga pernah digunakan sebagai alat bantu program berhenti merokok dengan cara mengurangi kadar nikotin secara bertahap namun praktek tersebut kini sudah tidak dianjurkan oleh ECA (*Electronic Vape Association*) dan FDA (*Food and Drug Association*) (Cobb *et al*, 2010). Meskipun demikian berdasarkan hasil survei di Amerika, mayoritas (65% responden) memilih alasan menggunakan rokok elektronik sebagai alternatif untuk berhenti merokok (Etter, 2010).

Maraknya pengguna Vape oleh masyarakat tanpa tersedianya data obyektif yang cukup membuat FDA di Amerika memprakarsai sebuah penelitian pada tahun 2009 tentang E-Vape. Penelitian tersebut menyatakan bahwa rokok elektronik mengandung Tobacco Spesific Nitrosamin

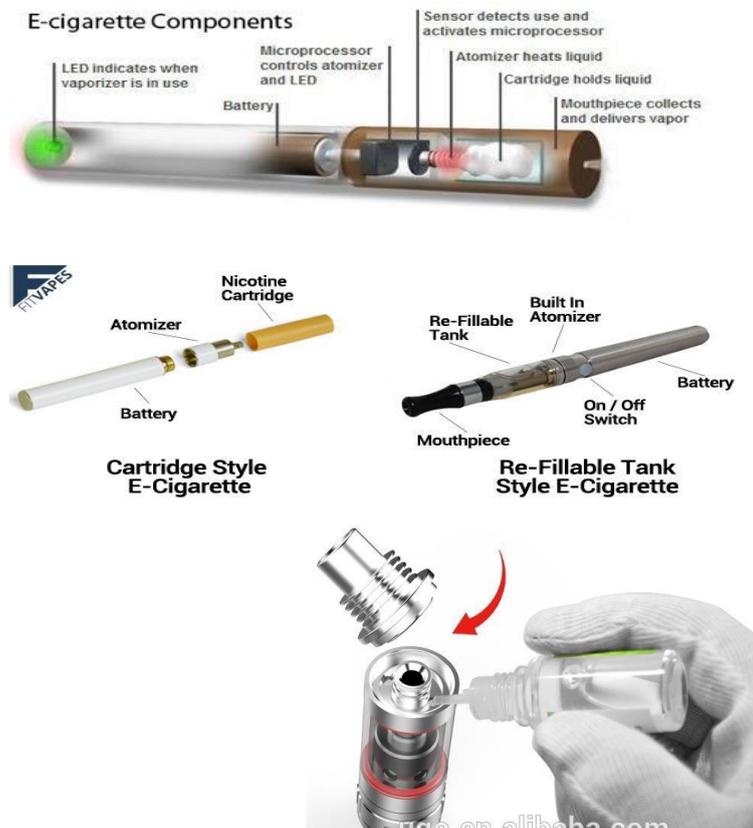
(TSNA) yang bersifat toksik dan Diethylene Glycol (DEG) yang dikenal sebagai karsinogen. Hal tersebut membuat FDA mengeluarkan peringatan kepada masyarakat tentang bahaya zat toksik dan karsinogen yang terkandung dalam Vape sehingga mengakibatkan pembatasan distribusi dan penjualan vape di Amerika dan beberapa negara lain (USFDA, 2009). Di Indonesia, Badan Pengawas Obat dan Makanan memperingatkan masyarakat Indonesia bahwa Vape dapat lebih berbahaya dibandingkan dengan rokok konvensional dan keberadaan rokok elektronik di Indonesia merupakan illegal (Bam dkk., 2014).

Vape mengandung komponen gas dan partikel yang sangat berpotensi menimbulkan radikal bebas. Senyawa radikal bebas dalam tubuh dapat terbentuk dari proses metabolisme normal tubuh seperti dari xantin oksidase, mitokondria, inflamasi dan olahraga atau karena pengaruh dari luar tubuh seperti asap, polusi lingkungan maupun sinar ultraviolet (Langseth, 1995). Pembentukan senyawa radikal bebas yang tidak segera dinetralkan oleh system antioksidan endogen dapat menimbulkan terjadinya stress oksidatif. Stress oksidatif inilah yang akan menimbulkan *reactive oxygen species* (ROS). *Reactive oxygen species* (ROS) dapat menyerang sel-sel dalam tubuh yang pada akhirnya dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan organ yang akhirnya dapat memunculkan berbagai penyakit seperti aterosklerosis, hipertensi, iskemik, alzheimer, parkinson dan peradangan (Behera *et al.*, 2004). *Reactive oxygen species* (ROS) telah diketahui sebagai salah satu penyebab infertilitas. Infertilitas adalah suatu kondisi yang berkaitan dengan struktur testis dan kualitas spermatozoa. Oleh karena itu diperlukan suatu riset terkait dengan pengaruh paparan Vape terhadap struktur testis pada hewan jantan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Vape (Electronic Cigarette)

Vape merupakan salah satu NRT (*Nicotine Replacement Therapy*) yang menggunakan listrik dari tenaga baterai untuk memberikan nikotin dalam bentuk uap dan oleh WHO disebut sebagai *electronic nicotine delivery system* (ENDS) (William *et al*, 2010). NRT adalah metode yang menggunakan suatu media untuk memberikan nikotin yang diperlukan oleh perokok tanpa pembakaran tembakau yang merugikan. (Kosmider *L et al*, 2014).



Gambar 2.1 Seperangkat Vape Beserta Liquid (Orellana-Barrios *et al*, 2015)

Pada saat ini, terdapat lebih dari 460 nama dagang produk ENDS dengan lebih dari 7.700 rasa. Produk yang dapat diisi ulang dan dibuang merupakan generasi pertama electronic Vape, sedangkan sistem tangki dan personal vaporizer merupakan generasi kedua dan ketiga electronic Vape (Zhu, 2014). Rokok elektronik juga pernah digunakan sebagai alat bantu program berhenti merokok dengan cara mengurangi kadar nikotin secara bertahap namun praktek tersebut kini sudah tidak dianjurkan oleh ECA (Electronic Vape Association) dan FDA (Food and Drug Association) (Cobb *et al*, 2010). Meskipun demikian berdasarkan hasil survei di Amerika, mayoritas (65% responden) memilih alasan menggunakan rokok elektronik sebagai alternatif untuk berhenti merokok (Etter, 2010).

Komponen-Komponen Vape

Secara umum Vape terdiri dari 3 bagian yaitu atomizer (bagian yang memanaskan dan menguapkan larutan nikotin) dan cartridge (berisi larutan nikotin) dan battery (bagian yang berisi baterai), (Cobb *et al*, 2010).

Atomizer adalah tempat yang disediakan untuk koil yang telah dililit untuk memanaskan *liquid* atau cairan perasa Vape agar menjadi uap yang bisa dihisap (Hakim, 2018).

Cartridge dapat selalu diisi ulang dan isi ulang tersebut merupakan bagian dari perangkat E-Vape (Erbach G, 2013). Cartridge pada E-Vape berisi sintesis nikotin yang terlarut di dalam propilen glikol, air dan zat pemberi rasa, selain itu terdeteksi pula bahan tambahan berupa diethilen glikol (komponen anti pembekuan dan bersifat toksis pada manusia) dan nitrosamin (zat bersifat karsinogen) (Westenberger B.J, 2009).

Baterai, baterai pada vape dapat diisi ulang kembali . Ketika Vape dioperasikan, akan timbul panas yang dihasilkan oleh tenaga baterai yang selanjutnya akan memanaskan sejumlah cairan yang tersimpan di dalam *cartridge* untuk memproduksi asap yang akan dihisap oleh pengguna (Wollscheid K. A *et al*, 2009).

Asap. Asap yang dihasilkan Vape dihirup sebagaimana layaknya merokok konvensional dan sejumlah asap dilepaskan tetapi berupa asap rokok. Beberapa jenis Vape juga mempunyai sejenis lampu kecil yang akan menyala pada saat Vape dihisap, menyerupai pembakaran yang terjadi pada rokok konvensional. Uap yang dihasilkan dari Vape, didapat dari cairan yang dipanaskan. Cairan tersebut mengandung berbagai komposisi seperti nikotin, air, aditif, perasa. Pelarut yang digunakan yang paling populer adalah gliserin (VG), propilen glikol (PG), atau

kombinasi gliserin dan propilen glikol dengan perbandingan dengan perbandingan tertentu (Kosmider L *et al*, 2014).

Kandungan Senyawa dalam Vape

Di dalam Vape mengandung nikotin, propilen glikol, gliserin, dan flavouring (perasa) apabila dipanaskan akan menghasilkan uap yang terlihat seperti asap. Produk uap tersebut yang akan dihirup oleh pengguna, kemudian akan masuk kedalam aliran darah. Nikotin mempunyai efek ketergantungan bagi penggunanya. Pada Vape terdapat beberapa tingkatan kandungan nikotin yaitu 0 mg, 3 mg, 6 mg, 12 mg, dan 24 mg dalam 1 *refill*. Kandungan nikotin berwujud cair pada Vape dapat di isi ulang. *Refill* tersebut dimasukkan apabila dalam proses pembakaran uap telah habis. (Kosmider *et all*, 2013 ; Cheng, 2014)

Propilen Glikol merupakan salah satu kandungan Vape berbentuk larutan. Zat ini. Propilen ini biasanya berfungsi sebagai pelarut. Larutan ini memiliki efek iritasi pada saluran pernapasan. Propilen glikol apabila kontak langsung dengan mata dan kulit akan mengakibatkan iritasi. Jika dilakukan konsumsi terus menerus memiliki jangka panjang yang akan mengalami kering mulut dan tenggorokan, bahkan bisa mempengaruhi sistem syaraf pusat. (Cheng, 2014)

Gliserin berbentuk kental dan memiliki rasa manis. Gliserin berbentuk kental dan memiliki rasa manis yang ada dalam Vape. Gliserin digunakan pada Vape memiliki kadar yang rendah. Produk Gliserin yang biasa digunakan pada Vape yaitu gliserin sayur atau gliserol merupakan produk karbohidrat yang berasal dari minyak nabati. Gliserin digunakan untuk campuran pada industri kosmetik dan penambah manis pada makanan. Gliserin jika dipanaskan dan diinhalasi akan menyebabkan iritasi pernapasan dan secara kronis dapat menyebabkan inflamasi saluran nafas atau obstruksi saluran nafas. (Cheng, 2014)

Flavouring (perasa) ada terdapat dalam larutan Vape berfungsi sebagai perasa bagi pengguna. Zat ini dapat mengeluarkan aroma, bau, dan cita rasa yang menarik bagi penggunanya. Menghirup diasetil kerap dikaitkan dengan penyakit paru obstruktif kronis (PPOK) (Lindsay, 2009) Beberapa senyawa kimia yang terkandung dalam vape, juga terdapat pada rokok kretek, baik rokok kretek dengan filter maupun tanpa filter. Kandungan senyawa tersebut dapat dilihat pada Table 2.1

Tabel 2.1. Kandungan senyawa kimia pada rokok kretek non filter, kretek filter dan Vape

Jenis Rokok		
Rokok Kretek non Filter	Rokok Kretek Filter	E-Vape
Tar	Tar	Asetaldehid
Nikotin	Nikotin	Aseton
Hidrokarbon aromatik polinuklear	Hidrokarbon aromatik polinuklear	Akrolein
F fenol	F fenol	Kadmium
B Benzo(α)piren	B benzo(α)piren	Kromium
B β -Nafitalmin	B β -Nafitalmin	Formaldehid
N Nitrosominikotin	N Nitrosominikotin	Nikotin
L Logam berat	L Logam berat	N-nitrosamines
Indol	Indol	Toulene
K Karbazol	K Karbazol	Lead
K Katekol	Selulosa asetat	Nikotin pelarut
K Karbon monoksida	K Karbon monoksida	Propilen glikol
A Asam hidrosianat	A asam hidrosianat	Dietelen glikol
A Asetaldehid	A Asetaldehid	Gliserin
A Akrolein	A akrolein	Nikotin plus plefer
A amonia	A amonia	
F Formaldehid	F Formaldehid	
O Oksida dan nitrogen	O oksida dan nitrogen	
N Nitrosamin	N Nitrosamin	

(Palanisamy, 2009; Gagandeep, 2017)

Nikotin

Nikotin ($C_{10}H_{14}N_2$) merupakan senyawa organik alkaloid, yang umumnya terdiri dari karbon, hidrogen, nitrogen dan terkadang juga oksigen. Nikotin adalah senyawa alkaloid yang terdapat pada daun tembakau disamping anabasin dan senyawa-senyawa alkaloid lainnya. Rumus kimia Nikotin adalah $C_{10}H_{14}N_2$ dan mempunyai berat molekul 162,23 gr/mol. Konsentrasi Nikotin biasanya sekitar 5% dari berat tembakau. Setiap satu batang rokok biasanya mengandung 10 mg nikotin. Nikotin inilah yang membuat seseorang kecanduan merokok. Meskipun yang terkandung dalam satu batang rokok sekitar 10 mg, namun yang benar terserap ke dalam tubuh sebanyak 1–2 mg saja, sisanya terbang ke udara. (Aji *et al*, 2017)

Nikotin merupakan alkaloid utama dalam daun tembakau yang aktif sebagai insektisida dan kadar nikotin 2–8 % tergantung pada spesies tembakau. Nikotin merupakan salah satu obat-obatan yang sangat beracun bagi manusia. Dosis 60 mg akan menyebabkan kematian dalam beberapa menit, diperkirakan hanya 10% dari jumlah tersebut yang terhisap oleh perokok, dan dosis ini terserap ke dalam tubuh dalam waktu yang sangat lama. Bahwa merokok tidak membahayakan secara langsung, disebabkan adanya kemampuan tubuh untuk mendegradasi atau metabolisme nikotin dengan cepat dan mengeluarkannya, sehingga mencegah penumpukan zat tersebut dalam tubuh. (Aji *et al*, 2017)

Efek nikotin dapat menimbulkan kecanduan dikarenakan adanya interaksi antara nikotin dengan reseptor kolinergik nikotin di otak yaitu *Nicotinic Acetylcholine Receptors* (nAChRs) di daerah mesolimbik dopamin system di *Ventral Tegmental Area* (VTA) neuron yang mengawali aktivasi *Central Nervus System* (CNS) termasuk *system Mesoaccumbens Dopamin*. Reseptor nikotinin mengatur pelepasan dopamin. Nikotin mengubah aktivitas VTA untuk meningkatkan sekresi dopamine. Dopamin yang dilepaskan berperan dalam pengontrolan fungsi aktivitas lokomotorik kognisi, emosi, rensformenpositif, serta regulasi endokrin. Akibat dari pelepasan dopamine, maka akan timbul perasaan nyaman bagi perokok. (D'Souza *et al*, 2011 ; Gotti C *et al*, 2010)

Pengaruh Asap Vape terhadap Kerusakan Struktur Spermatozoa.

Asap Vape mengandung komponen gas dan partikel yang sangat berpotensi menimbulkan radikal bebas seperti nikotin. Radikal bebas yang berlebih dan tidak segera dinetralkan akan menimbulkan terjadinya stress oksidatif. Stres oksidatif berpotensi toksik. Pada sel, stres oksidatif berperan sebagai mediator kerusakan membrane plasma, termasuk membrane plasma sel-sel penyusun testis dan juga mengakibatkan kerusakan kualitas spermatozoa. Spermatozoa diproduksi di dalam testis, tepatnya di suatu struktur yang dinamakan tubulus seminiferus. Spermatozoa yang dihasilkan melalui proses spermatogenesis di dalam tubulus seminiferus akan dimatangkan dalam epididymis. Selama proses pembentukan dan pematangan inilah spermatozoa rentan terhadap senyawa toksik dan juga radikal bebas yang berlebih. *Reagen oksigen Species* (ROS) yang dihasilkan karena adanya stress oksidatif yang berlebih dapat menyerang sel-sel dalam tubuh yang pada akhirnya dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan organ, termasuk organ reproduksi dan juga organ organ lain yang akhirnya dapat memunculkan berbagai penyakit seperti aterosklerosis, hipertensi, iskemik, alzheimer, parkinson dan peradangan (Behera *et al.*, 2004).

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

1.1 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis kerusakan sstruktur testis akibat paparan asap Vape. Indikator kerusakan struktur adalah ketebalan epitel dan diameter tubulus seminiferus.

3.2 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah mendapatkan data tentang kerusakan struktur testis setelah terpapar asap Vape dan juga memberikan informasi tentang pengaruh paparan vape terhadap kualitas sperma dan struktur mikroanatomi testis tikus dan menjadi pertimbangan untuk pengguna vape terhadap efek yang diberikan oleh paparan vape

BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di dua tempat. Treatment (pengasapan hewan coba) dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang dan pembuatan preparat Histologi dan pembacaan preparat dilakukan di Laboratorium Balai Besar Veteriner (BBVET) Wates Yogyakarta.

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diperoleh dari Laboratorium Biologi FMIPA UNNES.. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 30 ekor tikus jantan galur Wistar. Tikus yang digunakan dengan kriteria *inclusi* meliputi tikus wistar jantan usia 2-3 bulan, dengan berat badan 200-300 gram, dalam kondisi sehat dan tidak cacat. Pada penelitian tikus dibagi menjadi 5 kelompok secara random, dengan tiap kelompok berisi 6 ekor tikus.

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan penelitian “*the post test only control group design*” yang menggunakan hewan coba (*Rattus norvegicus*) sebagai obyek percobaan. Pada penelitian tikus dibagi 5 kelompok secara random yang terdiri atas kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), perlakuan nikotin 1 K(P1) dengan kadar nikotin 3 mg, perlakuan nikotin 2 (KP2) dengan kadar 6 mg dan perlakuan nikotin 3 (KP3) dengan kadar nikotin 9 mg.

Tabel 4.1 Pemberian perlakuan penelitian

Kelompok/Jumlah Tikus	Treatment	Keterangan
K-/(6)	-	Analisis kerusakan struktur testis
K+/(6)	3 batang rokok kretek (merk Dji Sam Soe)	Analisis kerusakan struktur testis
P1/(6)	0,25 ml nikotin dalam E-Vape dengan kadar nikotin 3 mg/hari	Analisis kerusakan struktur testis
P2/(6)	0,50 ml nikotin dalam E-Vape dengan kadar nikotin 6 mg/hari	Analisis kerusakan struktur testis
P3/(6)	0,75 ml nikotin dalam E-Vape dengan kadar nikotin 9 mg/hari	Analisis kerusakan struktur testis

4.2 Alat dan Bahan

4.2.1 Alat Penelitian

Tabel 4.2 Alat-alat Penelitian

No	Nama Alat	Fungsi
1.	Gelas ukur	Tempat untuk mengukur aquades dan larutan ekstrak kulit buah rambutan
2.	Neraca digital	Untuk menimbang berat tikus
3.	Wadah minum	Tempat minum tikus
4.	Kandang tikus	Tempat pemeliharaan tikus dengan ukuran 36 cm x 28 cm x 12 cm
5.	<i>Smoking Chamber</i>	Tempat untuk pengasapan vape pada tikus dengan ukuran 42 cm x 29 cm x 33 cm
6	Kamera	Sebagai alat dokumentasi
7	Nebulizer	Alat Penguap liquid Vape (spesifikasi lampiran)

4.2.2 Bahan Penelitian

Tabel 4.3 Bahan-bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Fungsi
1.	Vape	Perlakuan penelitian
2.	Tikus putih jantan	Hewan uji coba
3.	Asam pikrat	Untuk menandai tikus
4.	Kapas/tissue	Untuk membersihkan alat
5.	Refil rasa <i>pisang</i> bermerk <i>Banana Liquid</i> 60 ml 3 mg , 6 mg, dan 9 mg nikotin,	Cairan yang mengandung nikotin pelarut, propilen glikol, dietilen glikol, dan gliseren

4.3 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini diawali dengan mempersiapkan 30 ekor tikus putih galur wistar yang diaklimatisasi selama 7 hari. Tikus dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok 6 ekor. Tikus ditempatkan pada kandang yang beralaskan sekam dan dibersihkan setiap hari dan ditutup menggunakan kawat penutup. Tikus diberi pakan standar dan air minum secara *ad libitum* selama penelitian. Kandang diletakkan di Rumah Tikus Laboratorium Biologi FMIPA UNNES.

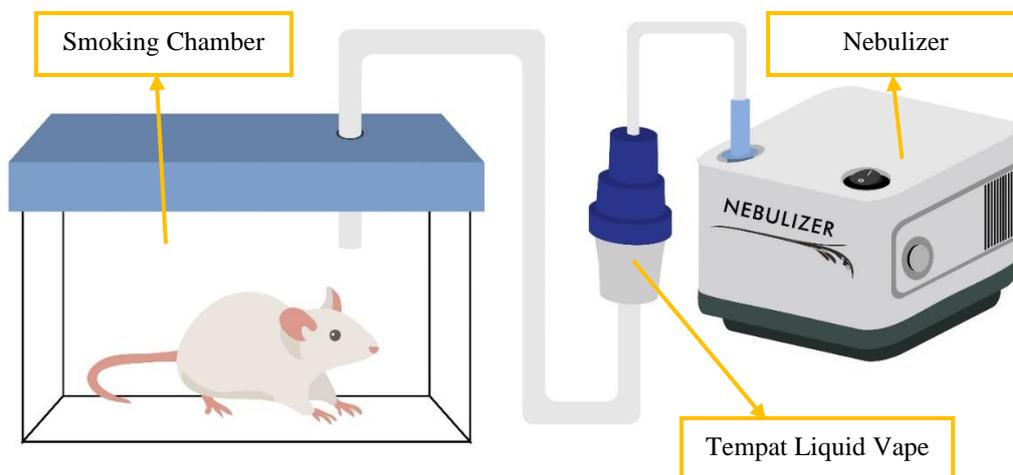
4.4 Persiapan Alat & Bahan

Peralatan yang digunakan berupa satu set modifikasi alat nebulizer yang digunakan untuk pengasapan. Nebulizer disambungkan dengan *smoking chamber* menggunakan selang. Liquid vape yang digunakan adalah merk Banana Hanna berukuran 60 ml dengan kadar nikotin 3, 6 dan 9 mg untuk masing-masing perlakuan.

4.5 Proses Perlakuan

Tikus dipindahkan ke dalam *smoking chamber* sesuai kelompoknya lalu ditutup menggunakan papan penutup. Kemudian liquid dituang sebanyak 5 ml pada wadah penampung. Selanjutnya menyalakan alat modifikasi nebulizer untuk pengasapan maka secara langsung tikus akan terkena paparan vape.

Berikut gambar model perlakuan penelitian :



Gambar 3.1. Alat modifikasi nebulizer (Dokumen Pribadi, 2018)

4.6 Terminasi

Setelah 30 hari perlakuan, masing-masing tikus dianestesi dalam *killing bottle*. Kemudian tikus dibedah untuk diambil vas deferens dan organ testisnya. Selanjutnya vas deferens diletakkan pada cawan petri berisi NaCl fisiologis untuk menjaga spermatozoa masih dalam keadaan hidup. Organ testis dimasukkan ke dalam wadah berisikan buffer formalin 10% untuk mencegah kerusakan organ.

4.7 Pembuatan & Pembacaan Preparat

Pembuatan Preparat mikroskopis dilakukan di Laboratorium Balai Besar Veteriner (BBVET) Wates Yogyakarta dengan pewarnaan Hematoxilin-Eosin. Pemeriksaan struktur mikroskopis testis tikus dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA UNNES menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 100 kali (10x10) dan 400

kali (10x40). Pengukuran diameter dan ketebalan epitel tubulus seminiferus dilakukan pada 5-10 tubulus seminiferus yang utuh dan bundar secara acak menggunakan mikrometer.

4.8 Analisis Data

Data struktur mikroanatomi testis terdiri dari ketebalan epitel tubulus seminiferus dan diameter tubulus seminiferus dianalisis menggunakan uji statistic Anova one-way pada taraf uji 95% dan dilanjutkan dengan uji *Least Significant Differences* (LSD).

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

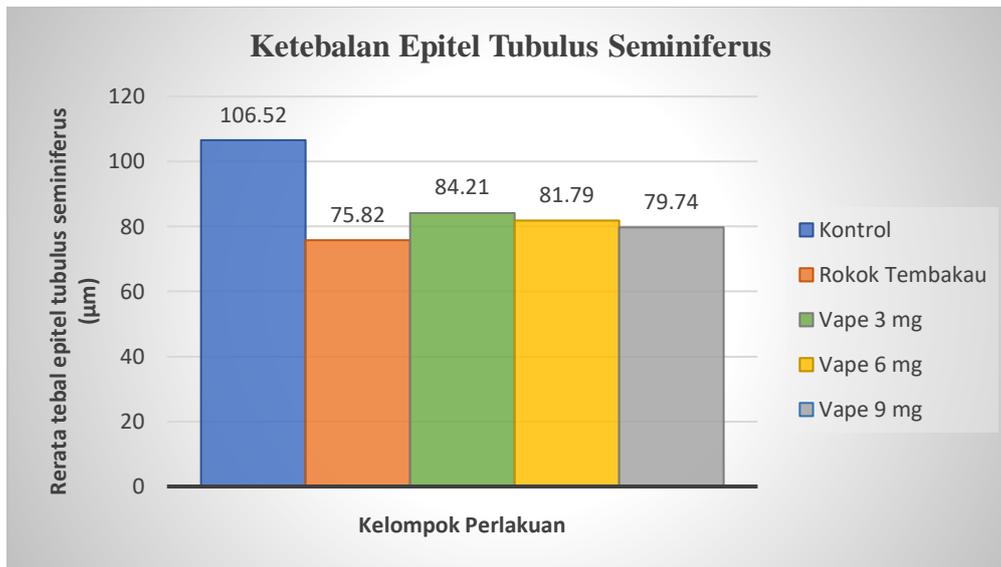
Kerusakan struktur testis dapat diamati dari perubahan yang terjadi pada struktur yang terdapat di dalam testis, yakni tubulus seminiferus. Tubulus seminiferus adalah suatu saluran panjang yang terdapat di dalam testis, pada tubulus seminiferus inilah spermatozoa dibentuk melalui proses spermatogenesis. Parameter kerusakan testis adalah parameter kerusakan tubulus seminiferus yang dapat diidentifikasi dari ketebalan epitel dan diameter tubulus seminiferus.

5.1 Ketebalan Epitel Tubulus Seminiferus

Testis sebagai organ utama pada reproduksi jantan tersusun atas saluran Panjang yang dinamakan tubulus seminiferus. Ketebalan epitel pada tubulus seminiferus merupakan salah satu parameter yang digunakan dalam menentukan kerusakan struktur testis. Ketebalan epitel tubulus seminiferus diukur menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x. Pengukuran ketebalan epitel tubulus seminiferus dilakukan pada 5-10 tubulus seminiferus yang utuh dan bundar secara acak menggunakan mikrometer lalu dirata-ratakan. Hasil analisis ketebalan epitel tubulus seminiferus adalah sebagai berikut:

Tabel 5.1 Hasil Analisis Ketebalan Epitel Tubulus Seminiferus

Kelompok	Jumlah spermatozoa pada ulangan ke-						Rerata \pm Std.Deviasi
	1	2	3	4	5	6	
K-	103,22	101,97	104,62	110,58	106,26	112,47	106,52 \pm 4,175 ^a
K+	54,33	71,35	74,86	87,39	88,07	78,93	75,82 \pm 12,46 ^b
KP1	90,87	82,2	81,85	79,11	74,71	96,52	84,21 \pm 8,02 ^c
KP2	72,9	75,33	85,38	77,94	82,56	96,66	81,79 \pm 8,60 ^d
KP3	94,59	87,65	76,43	77,625	72,64	69,54	79,74 \pm 9,51 ^e



Gambar 4.1 Rerata Ketebalan Epitel Tubulus Seminiferus Tikus

Hasil analisis dengan One Way Anova. mendapatkan hasil $p=0,000$ ($p<0,05$), yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dan juga antar kelompok pada kelompok perlakuan. Analisis data dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* LSD. Hasil uji LSD didapatkan ketebalan epitel tubulus seminiferus tertinggi pada kelompok kontrol dan terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok vape 3 mg, vape 6 mg dan vape 9 mg.

Data ketebalan epitel tubulus seminiferus menunjukkan kelompok tikus yang tanpa paparan vape memberikan hasil epitel tubulus seminiferus yang paling tebal dibandingkan dengan kelompok tikus yang diberikan paparan vape. Hal ini menunjukkan paparan vape yang diberikan mempengaruhi ketebalan epitel tubulus seminiferus. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh terganggunya sekresi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) pada kelompok perlakuan sehingga tidak dapat memperbaiki dan meningkatkan ukuran epitel germinal tubulus seminiferus. Peningkatan kadar hormon testosteron dan gen androgen pada epididimis berperan dalam mengaktifkan ekspresi gen perkembangan sel germinal sehingga dapat mendukung peningkatan hormon testikular dan poliferasi serta diferensiasi sel germinal di dalam tubulus seminiferus (Sadate-Ngatchou *et al.*, 2003). Struktur mikroanatomi tubulus seminiferus yang normal akan menunjukkan asosiasi sel spermatogenik tersusun sesuai dengan tingkat perkembangannya dari membran basalis menuju ke arah lumen tubulus, yakni spermatogonia, spermatosit, dan spermatid (Waty *et. al*, 2017).

Asap rokok menjadi sumber radikal bebas yang dapat menyebabkan stress oksidatif meningkat di dalam tubuh sehingga menyebabkan atrofi testis, merusak

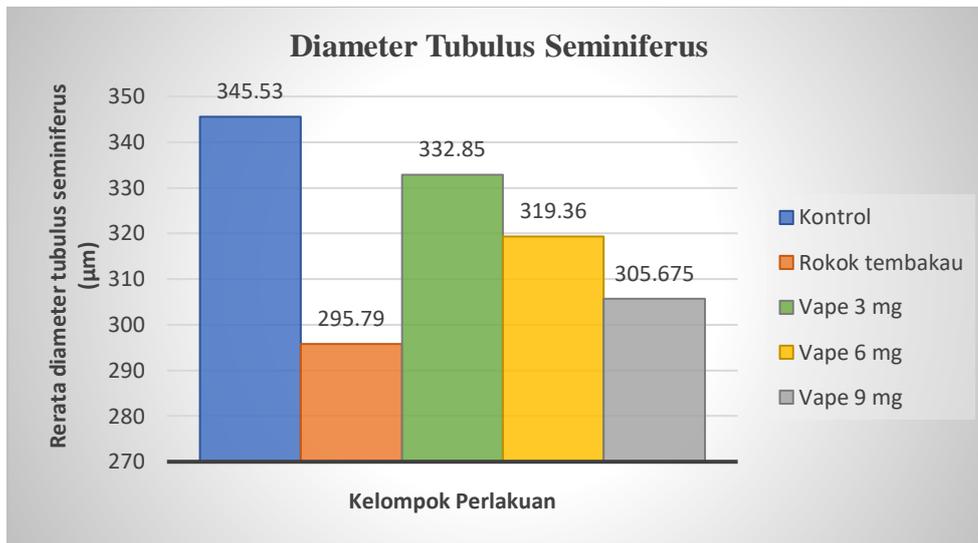
tubulus seminiferus, dan mengganggu aktivitas organ reproduksi dalam memproduksi sperma (Ozan, 2014). Kandungan nikotin dan PAH dalam asap rokok mempengaruhi kerja system saraf pusat dengan cara menghambat kerja *Gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) sehingga rangsangan terhadap testis berkurang dan menyebabkan testis atrofi serta pembentukan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) terhambat. Pembentukan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) yang terhambat ini menyebabkan proses spermatogenesis berlangsung tidak normal. (Kauripan *et al.*, 2014). Pada penelitian yang dilakukan Vivarelli *et al.* (2017) menunjukkan struktur testis dan epitel seminiferus mengalami perubahan dikarenakan paparan dari liquid rokok elektrik meningkatkan radikal bebas dan menginduksi gangguan enzim yang terlibat dalam steroidogenesis, serta yang terkait dengan aktivitas epitel seminiferus, yang menunjukkan kerusakan sistem reproduksi.

5.2 Diameter Tubulus Seminiferus

Diameter tubulus seminiferus merupakan parameter kedua yang berkaitan dengan kerusakan struktur testis. Diameter tubulus seminiferus diukur menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x. Pengukuran diameter epitel tubulus seminiferus dilakukan pada 5-10 tubulus seminiferus yang utuh dan bundar secara acak menggunakan mikrometer lalu dirata-ratakan. Hasil analisis diameter epitel tubulus seminiferus adalah sebagai berikut:

Tabel 5.2 Hasil analisis diameter tubulus seminiferus

Kelompok	Jumlah spermatozoa pada ulangan ke-						Rerata±Std.Deviasi
	1	2	3	4	5	6	
K-	373,2 5	340,3 6	356,9 2	328,7	331,7 7	342,2 1	345,53±16,78 ^a
K+	306,0 7	286,4 2	297,5 1	288,3 6	291,6 8	304,7 4	295,7967±8,35024 ^b
KP1	333,1 7	329,9 4	326,6 1	322,3 7	331,6 5	353,3 6	332,8500±10,76512 ^c
KP2	328,3 6	315,3 1	304,9 4	329,3 1	316,7 4	321,5	319,3617±9,12123 ^d
KP3	308,6 9	308,1 6	305,4 1	306,1 8	303,4 6	302,1 5	305,6750±2,56603 ^e



Gambar 4.2 Rerata diameter tubulus seminiferus tikus

Hasil analisis dengan Uji One Way Anova mendapatkan hasil $p=0,000$ ($p<0,05$), yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok perlakuan. Analisis data dilanjutkan untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok dengan dengan uji *Post Hoc* LSD. Hasil uji LSD didapatkan diameter tubulus seminiferus tertinggi pada kelompok kontrol dan terdapat perbedaan bermakna diameter tubulus seminiferus terhadap kelompok kontrol dengan kelompok vape 3 mg, vape 6 mg dan vape 9 mg.

Hasil penelitian menunjukkan paparan asap rokok dan vape selama 30 hari dapat menurunkan diameter tubulus seminiferus. Hal ini karena efek paparan asap vape menghasilkan perubahan morfologis dan fungsional pada epitel seminiferus, seperti vakuolisasi, reduksi spermatogenesis, dan peningkatan apoptosis spermatogonia dan spermatisit., sehingga diameter menjadi berkurang.

Menurut Wawryk-Gawda *et al.* (2019) bahwa ukuran diameter tubulus seminiferus ditentukan oleh interaksi antara *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). Interaksi ini ditentukan dengan kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH), dimana jika kadar *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) rendah bahkan tidak dihasilkan maka *Luteinizing Hormone* (LH) tidak dapat mempertahankan keadaan normal ukuran diameter tubulus seminiferus, sehingga tubulus seminiferus akan mengecil (Yurnadi, 2001).

Penelitian yang dilakukan Rajpurkar *et al.* (2000) pada hewan percobaan, didapatkan bahwa pemaparan asap rokok dapat menyebabkan penurunan diameter tubulus seminiferus sehingga jumlah spermatozoa yang dihasilkan akan lebih sedikit. Spermatogenesis di tubulus seminiferus yang terganggu mengakibatkan penurunan kualitas spermatozoa sehingga

menyebabkan infertil. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh ukuran tubulus seminiferus yang berbeda. Pada penelitian ini perubahan pada organ reproduksi jantan hanya sedikit terlihat pada tikus yang terpapar vape, namun lebih terlihat jelas pada tikus yang terpapar asap rokok konvensional. Hal ini karena rokok konvensional lebih banyak mengandung senyawa toksik dibanding vape.

Penelitian yang dilakukan El-Golli (2016) menunjukkan bahwa cairan isi ulang (*liquid*) rokok elektrik, terlepas dari apakah mengandung nikotin atau tidak, dapat menyebabkan stres oksidatif, yang menyebabkan peningkatan yang signifikan dalam aktivitas enzim antioksidan seperti superoksida dismutase, katalase, dan glutathione S-transferase pada testis tikus. Perubahan histopatologi testis yang diamati adalah peluruhan dini sel germinal dari epitel seminiferus dan disorganisasi isi tubular testis. Morfologi dan fungsi testis berada di bawah kendali hormon, terutama androgen. Paparan *liquid*, dengan atau tanpa nikotin, mengakibatkan penurunan yang nyata pada kadar testosteron yang bersirkulasi karena penurunan ekspresi messenger RNA (mRNA) dari dua enzim steroidogenesis, sitokrom P450_{scc} dan 17-Hidroksisteroid dehidrogenase (17-HSD). Hasilnya sperma yang dikumpulkan dari epididimis cauda menunjukkan penurunan yang signifikan dalam jumlah dan viabilitas sperma (Szumilas *et al.*, 2020).

Stres oksidatif merupakan kondisi dimana terjadi peningkatan ROS. Pada kondisi stres oksidatif, radikal bebas dapat mengakibatkan kerusakan sel melalui tiga cara, yaitu: peroksidasi lipid membran sel yang menyebabkan kerusakan membran sel, kerusakan DNA yang mengakibatkan mutasi DNA bahkan kematian sel, dan modifikasi protein teroksidasi (Mandasari *et al.*, 2019). Radikal bebas dapat menyerang senyawa lipid, protein, asam lemak tak jenuh, lipoprotein, karbohidrat, serta DNA dan RNA. Molekul yang paling rentan terhadap radikal bebas yaitu asam lemak tak jenuh yang terdapat di dalam sel (Fauzi, 2008). Kerusakan sel akibat serangan radikal bebas yang paling awal diketahui adalah peroksidasi lipid. Hal ini akan memicu terjadinya *Reactive Oxygen Species (ROS)*. Aktivitas ROS yang berlebih dapat meningkatkan stress oksidatif yaitu suatu keadaan dimana tidak terjadi keseimbangan antara prooksidan dan antioksidan akibat adanya radikal bebas didalam tubuh maka akan terjadi gangguan penyakit dalam, salah satunya yaitu gangguan pada organ reproduksi (Siregar, 2009). Pada keadaan normal terdapat keseimbangan antara ROS dan aktivitas antioksidan dalam reproduksi jantan namun pada kondisi patologis misalnya paparan dari asap rokok atau vape menyebabkan produksi ROS akan meningkat sehingga mengganggu keseimbangan sistem prooksidan. Sehingga mengakibatkan kerusakan struktur sel sel penusun testis yang akhirnya berimplikasi pada penurunan diameter dan ketebalan epitel pada dinding tubulus seminiferus.

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Simpulan

Hasil penelitian ini adalah paparan vape selama 30 hari dapat berpengaruh terhadap ketebalan epitel dan diameter tubulus seminiferus. Hal ini dapat disimpulkan bahwa paparan asap Vape dapat berpengaruh terhadap struktur mikroanatomi testis tikus.

6.2 Saran

Saran dari penelitian ini yaitu perlu dibuat modifikasi nebulizer sehingga paparan asap vape lebih optimal masuk kedalam tubuh hewan coba. Selain itu juga perlu ditambah indikator indikator lain yang dapat menguatkan untuk mengambil kesimpulan terjadinya kerusakan struktur pada testis

DAFTAR PUSTAKA

- Behera, S; Patel, GN; Rath, RK; Dey, RK & Chand, BK. 2004. Use of neem leaf extract in controlling bacterial shell disease in *Macrobrachium malcolmsonii*. *Indian Journal Animal Health*. 43(1): 61-66
- Cobb, NK; Byron, MJ; Abrams, DB & Shields, PG. 2010. Novel Nicotin Delivery System and Public Health: The Rise of “E-Cigarette”. *Am J Public Health*, 100(12), 2340-2342.
- El-Golli, N; Rahali, D; Jrad-Lamine, A; Dallagi, Y; Jallouli, M; Bdiri, Y; Ba, N; Lebret, M; Rosa, JP & El May, M. 2016. Impact of electronic-cigarette refill liquid on rat testis. *Toxicology and Mechanisms Methods*. 26: 427–434.
- Fauzi, TM. 2008. Aktivitas Radikal Bebas Pada Hepar Tikus. Malang: Universitas Brawijaya
- Ghareeb, DA & Sarhan, EME. 2014. Role of oxidative stress in male fertility and idiopathic infertility: causes and treatment. *Journal of diagnostic technique & biomedical analysis*. 3(1): 1-12.
- Krinke, GJ. 2000. The Laboratory Rat. San Diego, CA: Academic Press.
- Langseth, L. 1995. Oxidant, Antioxidant, and Disease Prevention. Belgium: International Life Science Institute press.
- Rupinder, K. 2014. Environmental Tobacco Smoke (ETS) – A silent killer. *Int. J. of Life Sciences*, 2(2), 179–184.
- Szumilas, K; Szumilas, P; Grzywacz, A & Wilk, A. 2020. The effect of e-cigarette vapor components on the morphology and function of the male and female reproductive systems: a systematic review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 17 (17): 1-11
- Wawryk-Gawda, E; Zarobkiewicz, MK; Chłapek, K; Chylinska-Wrzos, P & Jodłowska-Jedrych, B. 2019. Histological changes in the reproductive system of male rats exposed to cigarette smoke or electronic cigarette vapor. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 101: 404–419.
- World Health Organization. 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Edisi ke-5. Switzerland: World Health Organization.
- William, OR. 2005. Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals Third Edition. USA: Baltimore, Maryland.
- Yurnadi; Puji, S; Pujiyanto, DA & Soeradi, O. 2001. Pengaruh Penyuntikan Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Konsentrasi Spermatozoa dan Keadaan Sel Spermatogenik Tikus Jantan (*Rattus norvegicus* L.) Strain LMR. *Makara Kesehatan*. 5(1)

Lampiran 1.

INSTRUMEN PENELITIAN

Judul : Struktur Organ Reproduksi Tikus Jantan Setelah Terpapar Vape : Model Alternatif untuk Penelitian dan Pengajaran

Tujuan Penelitian:

Tujuan dari penelitian ini untuk

1. Menganalisis kerusakan struktur mikroanatomi testis tikus setelah terpapar Vape.
2. Menghasilkan produk berupa ‘ Atlas organ Reproduksi Laki Laki’
3. Menghasilkan video pembelajaran terkait pengaruh paparan vape pada struktur organ reproduksi

Design Penelitian

1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Mei sampai Agustus 2021. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan hewan coba serta pembacaan sampel spermatozoa tikus dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Pembuatan preparat testis tikus dilakukan di Balai Besar Veteriner (BBVET) Wates Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel yang digunakan sebanyak 30 ekor tikus Wistar jantan, berumur 2-3 bulan dengan berat 150-200 gram. Tikus yang digunakan dalam kondisi sehat, bergerak aktif dan rambut berwarna putih. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor.

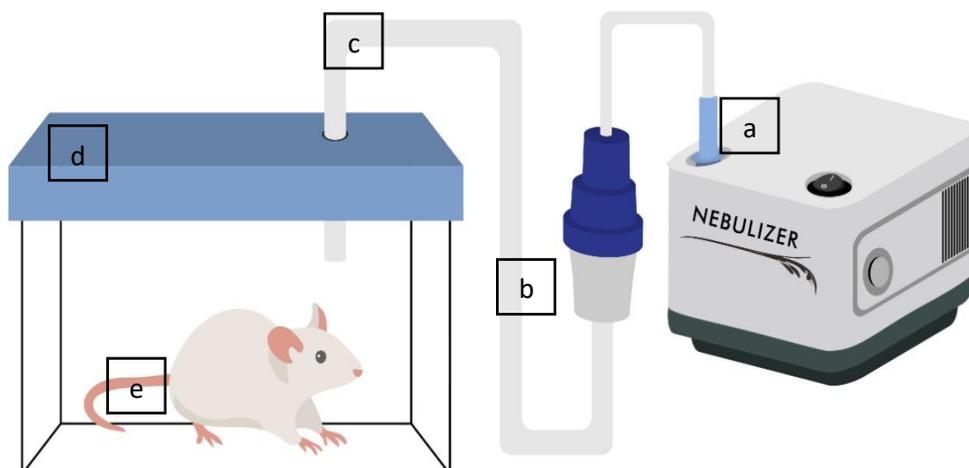
3. Alat dan Bahan Penelitian

3.1 Alat Penelitian

No	Nama Alat	Fungsi
1.	Nebulizer	Alat yang digunakan untuk pengasapan
2.	Wadah minum	Tempat minum tikus
3.	Set alat bedah	Untuk membedah tikus
4.	Kandang tikus	Tempat pemeliharaan tikus dengan ukuran
5.	<i>Smoking chamber</i>	Tempat untuk pengasapan pada tikus
6.	<i>Container box</i>	Untuk penyimpanan sementara sampel spermatozoa saat dibawa ke laboratorium
7.	Kamera	Untuk mengambil dokumentasi
8.	Mikroskop binokuler	Untuk mengamati preparat testis
9.	Komputer	Untuk melihat hasil pengamatan dari mikroskop

3.2 Bahan Penelitian

No	Nama Bahan	Fungsi
1.	Rokok Elektrik	Bahan uji coba
2.	Rokok kretek	Bahan uji coba
3.	Pakan tikus CP 594	Untuk makanan tikus
4.	NaCl 0,9%	Untuk suspensi spermatozoa
5.	Tikus Wistar jantan	Hewan uji coba
6.	Asam pikrat	Untuk menandai tikus
7.	Refil rasa pisang bermerk Banana Liquid dengan satu botol berisi nikotin 3mg/60ml, 6mg/60ml, dan 9mg/60ml.	Cairan yang mengandung nikotin pelarut, propilen glikol, dietilen glikol, dan gliserin



Gambar Rangkaian alat pengasapan rokok elektrik pada tikus
Keterangan:

- a. Alat Nebulizer
- b. Tempat cairan/liquid rokok elektrik
- c. Selang
- d. Kandang yang tertutup
- e. Hewan uji coba (Tikus Wistar Jantan)

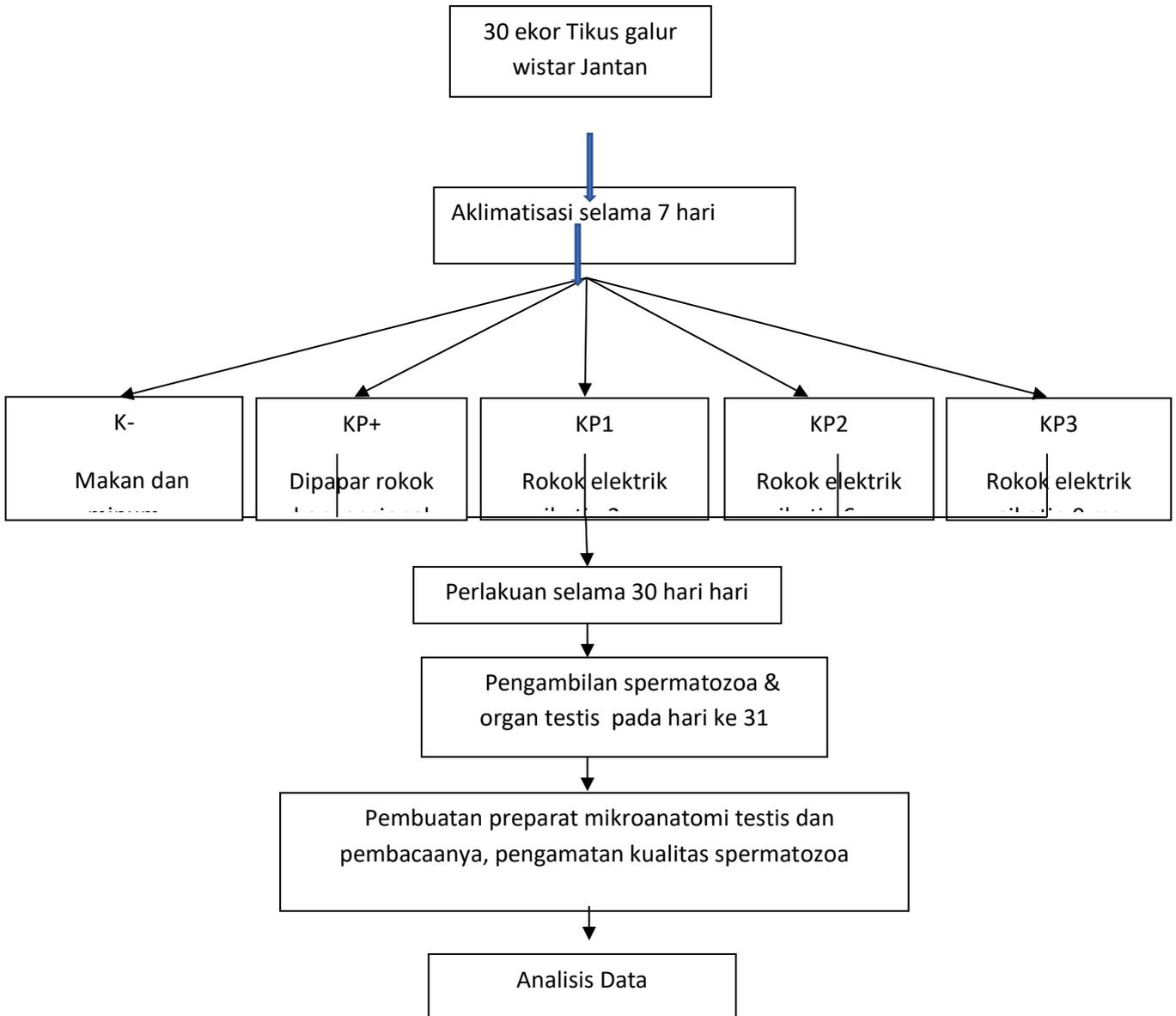
4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan “*the post test only control group design*” Pada penelitian tikus dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 6 ekor yang diberikan perlakuan secara acak yang terdiri atas kelompok kontrol negatif (K-), kelompok kontrol positif (K+), kelompok perlakuan 1 (KP1), kelompok perlakuan 2 (KP2) dan kelompok perlakuan 3 (KP3), dengan dosis nikotin pada rokok elektrik untuk kelompok perlakuan yaitu 3, 6 dan 9 mg.

Pemberian perlakuan penelitian

Kelompok/Jumlah Tikus	Treatment	Keterangan
K- / 6	-	-
K+ / 6	Rokok Kretek	-
KP1 / 6	5 ml Vape dengan kadar nikotin 3 mg/hari	-
KP2 / 6	5 ml Vape dengan kadar nikotin 6 mg/hari	-
KP3 / 6	5 ml Vape dengan kadar nikotin 9 mg/hari	-

5. Alur Penelitian



6. Pelaksanaan Treatment

6.1 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini akan diawali dengan mempersiapkan 30 ekor tikus putih galur wistar yang diaklimatisasi selama 7 hari. Tikus dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok 6 ekor. Tikus ditempatkan pada kandang yang beralaskan sekam dan dibersihkan setiap hari dan ditutup menggunakan kawat penutup. Tikus diberi pakan standar dan air minum secara *ad libitum* selama penelitian. Kandang diletakkan di Rumah Tikus Laboratorium Biologi FMIPA UNNES.

6.2 Persiapan Alat & Bahan

Peralatan yang digunakan berupa satu set modifikasi alat nebulizer yang digunakan untuk pengasapan. Nebulizer disambungkan dengan *smoking chamber* menggunakan selang. Liquid vape yang digunakan adalah merk Banana Hanna berukuran 60 ml dengan kadar nikotin 3, 6 dan 9 mg untuk masing-masing perlakuan.

6.3 Proses Perlakuan

Tikus dipindahkan ke dalam *smoking chamber* sesuai kelompoknya lalu ditutup menggunakan papan penutup. Kemudian liquid dituang sebanyak 5 ml pada wadah penampung. Selanjutnya menyalakan alat modifikasi nebulizer untuk pengasapan maka secara langsung tikus akan terkena paparan vape.

6.4 Terminasi

Data kualitas spermatozoa diambil dari pengamatan jumlah, motilitas, viabilitas serta morfologi spermatozoa dan untuk data struktur testis diambil dari pengamatan ketebalan tubulus seminiferus pada preparat testis tikus.

Setelah 30 hari perlakuan, masing-masing tikus dianestesi dalam *killing bottle*. Kemudian tikus dibedah untuk diambil vas deferens dan organ testisnya. Selanjutnya vas deferens diletakkan pada cawan petri berisi NaCl fisiologis untuk menjaga spermatozoa masih dalam keadaan hidup. Organ testis dimasukkan ke dalam wadah berisikan buffer formalin 10% untuk mencegah kerusakan organ.

6.5 Pengambilan Data Kualitas Spermatozoa

Vas deferens diambil dan diletakkan kedalam cawan petri yang berisi NaCl fisiologis. Vas deferens diplurut sehingga spermatozoa keluar dan tersuspensi dengan NaCl fisiologis. Suspensi spermatozoa dapat digunakan untuk pengamatan yang meliputi motilitas, viabilitas dan morfologi spermatozoa.

1. Jumlah Spermatozoa

Suspensi spermatozoa dihomogenkan dengan NaCl fisiologis, selanjutnya diambil 10 µl sampel dan dimasukkan ke dalam kotak *hemositometer improved neubauer* dan ditutup dengan *deckglass*. Amati dengan mikroskop cahaya perbesaran 40x, *hemositometer* diletakkan dan dihitung jumlah spermatozoa pada kotak bilik hitung. (Gandasoebrata, 1984). Jumlah spermatozoa dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Terhitung (s) x Pengenceran x 1 ml NaCl} = s \times 20.000 = \text{juta/mm}$$

2. Motilitas Spermatozoa

Untuk menentukan motilitas spermatozoa diambil suspensi spermatozoa kurang lebih 10-15 µl ke atas gelas objek lalu ditutup dengan *deckglass*. Kategori perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung persentase spermatozoa dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10x. Sebanyak 5-10 lapangan pandang yang diperiksa untuk memperoleh seratus spermatozoa secara berurutan yang kemudian diklasifikasi sehingga menghasilkan persentase setiap kategori motilitas (Rahmanisa, 2013).

Pengamatan dilakukan 5-10 lapang pandang dengan kriteria motilitas *progress*, *non-progress* dan *immotile*.

3. Viabilitas dan Morfologi Spermatozoa

Perhitungan daya tahan hidup (viabilitas) dan morfologi sperma dilakukan dengan meneteskan satu tetes suspensi spermatozoa pada gelas objek dan ditambahkan satu tetes larutan eosin dengan konsentrasi 10%. Dilakukan smear dan ditutup dengan kaca penutup untuk kemudian diamati dengan

menggunakan mikroskop perbesaran 40x. Diamati kurang lebih 100 spermatozoa dan dihitung spermatozoa yang hidup (tidak menyerap warna) dan spermatozoa yang mati (menyerap warna) kemudian dihitung persentasenya.

Persentase viabilitas spermatozoa dapat dilihat dari jumlah spermatozoa hidup dibandingkan dengan spermatozoa yang mati dari 100 spermatozoa. Spermatozoa hidup memiliki kepala spermatozoa yang berwarna putih sedangkan spermatozoa mati diketahui dengan melihat kepala spermatozoa berwarna ungu setelah diwarnai dengan giemsa. Morfologi spermatozoa dapat diamati di bawah mikroskop cahaya dan dihitung dalam satu lapang pandang dengan pembesaran 100x (Rahmanisa, 2013). Interpretasi normal morfologi spermatozoa didapatkan apabila >30% (WHO, 2010).

6.6 Pembuatan & Pembacaan Preparat

Pembuatan Preparat mikroanatomi akan dilakukan di BBVET Wates Jogyakarta dengan pewarnaan Hematoxilin-Eosin. Pemeriksaan struktur mikroanatomi testis tikus dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA UNNES menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 100 kali (10x10) dan 400 kali (10x40). Pengukuran diameter dan ketebalan epitel tubulus seminiferus dilakukan pada 5-10 tubulus seminiferus yang utuh dan bundar secara acak menggunakan mikrometer.

7. Analisis Data

Analisis data jumlah, motilitas, viabilitas dan morfologi spermatozoa tikus dilakukan dengan uji statistic Anova One-Way pada taraf uji 95%. Apabila hasil uji Anova berpengaruh signifikan, dilanjutkan dengan uji *Least Significant Differences* (LSD). Data kualitatif morfologi spermatozoa dianalisis dengan menggunakan analisis deskriptif. Data struktur mikroanatomi testis terdiri dari ketebalan epitel tubulus seminiferus dan diameter tubulus seminiferus dianalisis menggunakan uji statistic Anova one-way pada taraf uji 95% dan apabila hasil uji Anova berpengaruh signifikan, dilanjutkan dengan uji *Least Significant Differences* (LSD).

LAMPIRAN 2**PERSONALIA PENELITIAN**

No	Nama/NIDN	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi waktu Jam/Minggu	Uraian Tugas
1.	Dr. Lisdiana, M.Si /0019115914	Biologi FMIPA UNNES	Struktur Jaringan Hewan	15	Bertanggung jawab atas semua kegiatan penelitian
2.	Prof. Dr. Retno Sri Iswari,SU /0007025202	Biologi FMIPA UNNES	Biokimia	10	Bertanggung jawab terhadap kelangsungan hidup hewan coba
3	Dr. dr. Nugrahaningsih WH, M. Kes/0009076910	Biologi FMIPA UNNES	Anatomi & fisiologi Manusia	10	Bertanggung jawab terhadap kelangsungan hidup hewan coba

4	Dr. drh. Wulan Christijanti, M.Si/ 0011096807	Biologi FMIPA UNNES	Fisiologi Hewan	10	Bertanggung jawab terhadap kelangsungan hidup hewan coba
5	Sriyadi S. Pd/ 19850903200912 1004	Teknisi Laboratorium		10	Pemeliharaan hewan coba dan terminasi hewan coba
6	Nurul Amida /4411417024	Mahasiswa Biologi UNNES smt 8	Biologi konsentrasi Zoologi	15	Pelaksanaan treatment (paparan vape pada hewan coba)
7	Dwi Susanto /4411417034	Mahasiswa Biologi UNNES smt 8	Biologi konsentrasi Zoologi	15	Pelaksanaan treatment (paparan vape pada hewan coba)
8	Fahmi Zulfikar Farento/ 4401417094	Mahasiswa Biologi UNNES smt 8	Pendidikan Biologi	15	Pj Pembuatan Atlas
9	Arriza Kurniawan Yusuf	Alumni mahasiswa	Pendidikan Biologi	15	PJ pembuatan video Pembelajaran

