

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Lembar Pengesahan	ii
Identitas Penelitian	iii
DAFTAR ISI.....	1
DAFTAR TABEL.....	2
DAFTAR GAMBAR.....	3
RINGKASAN PENELITIAN.....	4
BAB 1. PENDAHULUAN	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	8
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	2
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	6
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	15
DAFTAR PUSTAKA.....	16
LAMPIRAN 1. ROAD MAP PENELITIAN	19
LAMPIRAN 2. LUARAN PENELITIAN.....	20

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kadar nikotin pada rokok kretek.....

Tabel 2. Hasil ekspresi gen p53 dari sampel otak Sprague Dawley

...

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Otak tikus <i>Sprague Dawley</i> (tampak dorsal).	
Gambar 2. Photomicrographs dari korteks cerebri lobus frontalis dengan pengecatan eosin dan hematoxylin....	
Gambar 3. Struktur histologi cerebellum tikus.....	
Gambar 4. Kerangka konsep pengaruh asap rokok terhadap abnormalitas histologi cerebellum dan cerebrum dan pada paru tikus <i>Sprague-Dawley</i> .	
<i>Gambar 5. Kromatogram 3-D diperoleh dengan menggunakan winCATS Planar chromatography Manager.</i>	
<i>Gambar 6. Kurva standar kadar nikotin.....</i>	
Gambar 7. Kromatogram GC-MS untuk mengukur zat yang terkandung pada tembakau.....	
Gambar 8. Struktur anatomi otak <i>Sprague Dawley</i>	
Gambar 9. Histologi cerebellum <i>Sprague Dawley</i>	
Gambar 10. Tampilan sel Purkinje pada cerebellum <i>Sprague Dawley</i>	
Gambar 11. Perbandingan penampakan sel Purkinje tikus <i>Sprague Dawley</i>	
Gambar 12. Perbandingan area, dan perimeter sel Purkinje tikus <i>Sprague Dawley</i>	
Gambar 13. Perbandingan panjang (length) dan lebar (width) sel Purkinje tikus <i>Sprague Dawley</i>	
Gambar 14. Tampilan histologi cerebrum <i>Sprague Dawley</i>	
Gambar 15. Sel pyramidal pada area hippocampus tikus <i>Sprague Dawley</i>	
Gambar 16. SEM cerebrum <i>Sprague Dawley</i>	
Gambar 17. SEM cerebellum <i>Sprague Dawley</i>	

RINGKASAN PENELITIAN

Latar Belakang:

Tembakau (*Nicotiana tabacum* Linn.) merupakan komponen utama rokok. Rokok menjadi masalah kesehatan dunia. Rokok dapat dibuat secara manual di rumah-rumah penduduk, tetapi banyak yang dibuat di pabrik. Di Indonesia, banyak penduduk yang merokok, khususnya remaja. Oleh karena itu tidak merokok atau berhenti merokok lebih baik untuk hidup sehat. Penting untuk diketahui efek asap rokok dosis rendah terhadap abnormalitas sel pada cerebrum maupun cerebellum baik secara histologis maupun secara molekuler.

Tujuan: mengetahui pengaruh asap rokok kretek filter dosis rendah (1 batang, maupun 2 batang) terhadap cerebrum dan cerebellum tikus *Sprague Dawley*.

Metode: Jenis penelitian ini yaitu eksperimental menggunakan hewan coba tikus *Rattus norvegicus* galur *Sprague-Dawley* yang dipapari dengan asap rokok kretek filter, sedangkan kelompok kontrol adalah kelompok tikus yang bernafas dengan udara biasa (experimental and control group design). Pemilihan tikus kedalam kelompok kontrol dan perlakuan dilakukan secara random (randomize control trial).

Hasil sementara: Paparan asap rokok kretek dosis rendah sebanyak 1 batang/hari selama 30 hari pada tikus *Sprague Dawley* tidak mempengaruhi perubahan morfologi pada otak. Perubahan bentuk, dan ukuran sel Purkinje yang terkena asap rokok 1 batang/hari selama 30 hari menunjukkan kelainan. Luas sel Purkinje tikus *Sprague Dawley* pada kelompok 1 lebih tinggi dibandingkan kelompok 2 ($P=0,000$). Perimeter sel Purkinje tikus *Sprague Dawley* pada kelompok 1 lebih tinggi dibandingkan kelompok 2 ($P=0,000$). Panjang sel Purkinje tikus *Sprague Dawley* pada kelompok 1 lebih tinggi dibandingkan kelompok 2 ($P=0,000$). Lebar sel Purkinje tikus *Sprague Dawley* pada kelompok 1 lebih tinggi dibandingkan kelompok 2 ($P=0,000$).

Kesimpulan sementara: Paparan asap rokok kretek dosis rendah sebanyak 1 batang/hari selama 30 hari pada tikus *Sprague Dawley* tidak mempengaruhi perubahan morfologi pada otak. Asap kretek 1 batang/hari selama 30 hari memperkecil ukuran badan sel Purkinje dan mengubah bentuk dari bulat menjadi meruncing sebagai tanda degenerasi sel. Paparan asap rokok 1 batang/hari selama 30 hari meningkatkan ekspresi gen p53 pada otak tikus *Sprague Dawley*.

Kata Kunci :

Asap rokok kretek, cerebrum, cerebellum, sel Purkinje, p53

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tembakau (*Nicotiana tabacum* Linn.) merupakan komponen utama rokok. Rokok menjadi masalah kesehatan dunia. Rokok dapat dibuat secara manual di rumah-rumah penduduk, tetapi banyak yang dibuat di pabrik. Di Indonesia, banyak penduduk yang merokok, khususnya remaja.¹ Perlu diperhatikan pula meskipun tidak merokok, tetapi kita dapat menjadi perokok pasif.² Akibat merokok, banyak individu yang menderita penyakit. Hal ini semakin memperkuat fakta bahwa merokok merupakan factor risiko suatu penyakit.³ Tidak bisa dipungkiri lagi bahwa penduduk Indonesia sebagian besar perokok.⁴ Oleh karena itu tidak merokok atau berhenti merokok lebih baik untuk hidup sehat.

Kandungan zat kimia pada rokok telah diketahui lebih dari 4000 jenis yang teridentifikasi.⁵ Kita mengetahui bahwa kretek yang terbuat dari tembakau, cengkeh dan sauce mengandung nikotin, minyak cengkeh atau eugenol dan zat organik lain sebagai metabolit skunder. Hasil penelitian mendemonstrasikan bahwa asap rokok mengandung partikel padat (8%) dan gas (92%).⁶ Pada perokok aktif, asap rokok yang berupa gas dan partikel terhirup dari mulut sampai ke alveoli. Telah diteliti bahwa ada deposisi partikel dalam asap rokok di sepanjang saluran pernafasan manusia, sehingga menimbulkan penyakit pada system pernafasan.⁷ Lebih dari itu, merokok juga menyebabkan kerusakan motorik pada otak.⁸ Kami memfokuskan efek paparan asap rokok kretek filter dosis rendah terhadap otak tikus. Efek yang akan kami amati yaitu abnormalitas sel pada cerebellum maupun cerebrum baik secara histologis maupun secara molekuler. Aspek molekuler yang kami amati yaitu perubahan ekspresi gen p53 yang mengkode protein p53. Protein p53 yang dikode oleh gen p53 dikenal sebagai penjaga genom dan memainkan berbagai peran dalam kerusakan DNA dan penekanan kanker.⁹ Hal ini penting kami amati untuk membuktikan efek paparan asap rokok kretek filter dosis rendah terhadap ekspresi pada tingkat gen.

Oleh karena itu, berdasarkan uraian di atas, perlu dilakukan penelitian histologi tentang abnormalitas sel otak Sprague-Dawley setelah dipapari asap rokok. Untuk menggali lebih dalam tentang pengaruh asap rokok terhadap otak, kami menggunakan tikus Sprague-Dawley sebagai hewan model. Sebelumnya, perlu diukur kadar zat yaitu nikotin, dan senyawa organik lain sebagai karakteristik kretek yang digunakan sebagai perlakuan. Apakah zat karsinogenik pada asap rokok memicu proliferasi sel otak secara tidak terkendali?. Pertanyaan kami tersebut sesuai dengan pernyataan bahwa hilangnya atau mutasi p53 diketahui menyebabkan ketidakstabilan genetik global dan untuk mempromosikan mutasi pro-tumorigenik tambahan karena peran penting dalam mengatur perbaikan DNA, siklus sel, kematian sel terprogram, dan penuaan seluler.¹⁰

1.2. Perumusan Masalah

Dari uraian di atas muncul masalah yang menarik yaitu:

1.2.1. Masalah Umum

Bagaimana pengaruh asap rokok kretek dosis rendah (1 batang) terhadap cerebellum dan cerebrum tikus *Sprague Dawley* ?

1.2.2. Masalah Khusus

1.2.2.1. Apakah paparan asap rokok kretek 1 batang/hari selama 30 hari mempengaruhi sel

Purkinje pada cerebellum tikus?.

1.2.2.2. Apakah paparan asap rokok kretek 1 batang/hari selama 30 hari mempengaruhi sel

Sel pyramidal pada cerebrum tikus?.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan umum

Mengetahui pengaruh asap rokok kretek dosis rendah 1 batang terhadap cerebellum maupun cerebrum tikus *Sprague Dawley*

Tujuan khusus

1. Mengetahui pengaruh paparan asap rokok kretek 1 batang/hari selama 30 hari terhadap sel Purkinje pada cerebellum tikus.
2. Mengetahui pengaruh paparan asap rokok kretek terhadap sel pyramidal pada cerebrum tikus.

1.4. Batasan Penelitian

1. Asap rokok kretek yaitu asap rokok kretek sebagai hasil pembakaran 1 rokok kretek yang dipaparkan terhadap tikus setiap hari 10 menit selama 30 hari.
2. *Sprague Dawley* adalah hewan coba berupa tikus yang diperlakukan sebagai kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. *Sprague Dawley* yang dipapari asap rokok kretek sebagai kelompok perlakuan, sedangkan yang tidak dipapari asap rokok sebagai kelompok kontrol.

1.5. Kaitan Penelitian dengan Road Map Penelitian Pribadi dan Road Map Penelitian Fakultas

Fokus penelitian ini memperlihatkan efek asap rokok kretek pada tingkat sel yaitu mempengaruhi sel pyramidal pada cerebrum maupun sel Purkinje pada cerebellum tikus *Sprague-Dawley*. Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk menjelaskan tingkat keparahan abnormalitas sel pyramidal pada cerebrum maupun sel Purkinje pada cerebellum tikus baik secara histologis maupun secara molekuler. Hasil tersebut berhubungan dengan *Road Map* Penelitian Fakultas yang menekankan pada *green healthy life*

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Pustaka

Tembakau (*Nicotiana tabacum* Linn.) merupakan komponen utama rokok. Rokok menjadi masalah kesehatan dunia. Rokok dapat dibuat secara manual di rumah-rumah penduduk, tetapi banyak yang dibuat di pabrik. Di Indonesia, banyak penduduk yang merokok, khususnya remaja.¹ Perlu diperhatikan pula meskipun tidak merokok, apabila kita secara tidak sengaja menghirup asap rokok dari perokok aktif, maka kita menjadi perokok pasif.² Akibat merokok, banyak individu yang menderita penyakit. Hal ini semakin memperkuat fakta bahwa merokok merupakan factor risiko suatu penyakit.³ Oleh karena itu tidak merokok atau berhenti merokok lebih baik untuk hidup sehat.

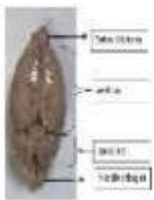
Akibat merokok, lebih dari 7 juta orang diantaranya meninggal, sedangkan 1.2 juta terpapar rokok (perokok pasif).² Oleh karena itu disarankan untuk berhenti merokok di usia sebelum 40 tahun.³ Indonesia merupakan salah satu negara di Asia Tenggara dengan penduduk yang sebagian besar perokok.⁴ Lebih dari itu, bahwa jumlah perokok di Indonesia yang begitu besar senang untuk merokok kretek baik filter maupun non filter.

Kita mengetahui bahwa tembakau sebagai komponen utama rokok mengandung nikotin. Selain itu, rokok kretek mengandung campuran zat kimia. Lebih dari 4000 zat kimia telah berhasil diidentifikasi.⁵ Asap rokok diketahui terdiri atas gas (92%) dan bahan padat atau partikulat, misalnya berbagai jenis logam (8%).¹¹ Gas dan partikulat dari rokok disalurkan ke alveoli.¹³ Selain itu juga dinyatakan bahwa rokok berpengaruh terhadap aktivitas dan fungsi otak serta mengganggu psikologi pecandu rokok.¹⁴

Hasil penelitian mendemonstrasikan bahwa nikotin pada asap rokok berefek menurunkan volume cerebellar gray matter dan fungsi corticocerebellar.¹⁵ Selain itu, merokok meningkatkan risiko kanker secara keseluruhan dalam praktik perawatan primer di Inggris. Selain itu, merokok secara dominan positif berhubungan dengan berbagai jenis kanker tertentu.¹⁶ Sehubungan dengan kanker tertentu yang berhubungan dengan merokok, rupanya ada hubungan antara merokok dengan gene p53 dan ekspresinya. Selain mengaktifkan gen p53, reseptor NMDA (N-methyl-D-aspartate) berpartisipasi dalam apoptosis yang bergantung pada caspase, meningkatkan kadar ion kalsium, meningkatkan aktivitas enzim caspase-3. Pendapat tersebut sesuai dengan pernyataan bahwa hilangnya atau mutasi p53 diketahui menyebabkan ketidakstabilan genetik global, dan untuk mempromosikan mutasi pro-tumorigenik tambahan karena peran penting dalam mengatur perbaikan DNA, siklus sel, kematian sel terprogram, dan penuaan seluler.¹⁰

Gen p53 merupakan gen suppressor tumor yang memiliki peran penting pada regulasi siklus sel dan apoptosis dan sering mengalami mutasi pada kanker. Gen p53 tikus terletak pada kromosom 10 q 24 dengan jumlah exon 12.¹⁷ Hasil penelitian terkini memperlihatkan bahwa riwayat penggunaan tembakau dan alkohol dikaitkan dengan frekuensi mutasi p53 yang tinggi pada pasien dengan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher. Ada bukti awal yang mengaitkan merokok dengan mutasi p53 di situs mutasi nonendogen. Juga dijelaskan bahwa tembakau berperan dalam perkembangan molekuler karsinoma sel skuamosa kepala dan leher, sehingga mendukung bukti epidemiologis bahwa pantang merokok penting untuk mencegah kanker kepala dan leher.¹⁸ Juga telah dibuktikan bahwa ada risiko glioma yang berlebihan pada otak akibat merokok pada laki-laki.¹⁹ Secara umum kita ketahui bahwa mutasi pada gen suppressor tumor p53 akan berakibat meningkatkan perkembangan kanker. Hal tersebut karena gen kehilangan fungsi untuk menekan tumor.²⁰

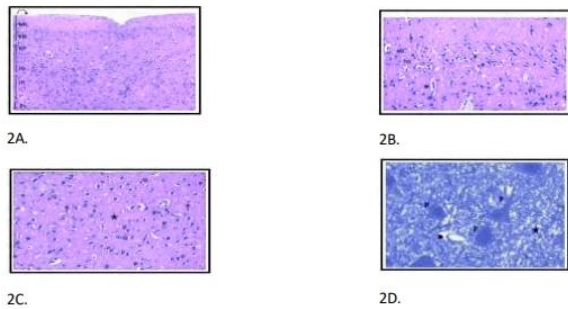
Morfologi otak tikus Sprague Dawley disajikan pada gambar 1.



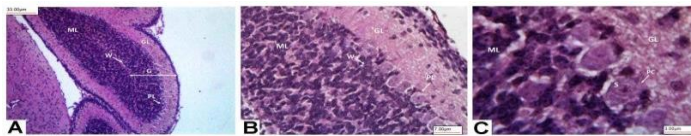
Gambar 1. Otak tikus *Sprague Dawley* (tampak dorsal). Photografer oleh Parwanto, E (2022).

Sel pyramidal pada korteks cerebri terdapat pada lapisan piramida eksternal dan internal (perhatikan tampilan sel pyramidal pada gambar 2). Pada penampang lintang korteks cerebri lobus frontalis dari tikus akan tampak bagian-bagian berikut (dari lapisan luar ke dalam), yaitu piamater, lapisan molekul, granular eksternal, piramida eksternal, granular internal, piramida internal, dan lapisan polimorfik.²¹ Sel Purkinje pada cerebellum tikus tampak pada grey matter pada cerebellum (perhatikan tampilan pada gambar 3).²²

Photomicrographs secara histologi dari korteks cerebri lobus frontalis tikus disajikan pada gambar 2, sedangkan tampilan histologi cerebellum tikus disajikan pada gambar 3.

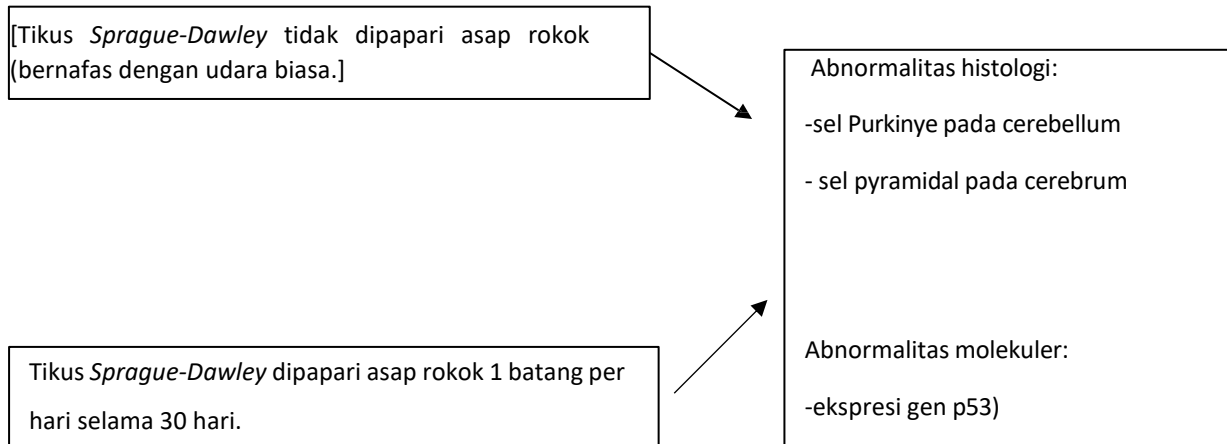


Gambar 2. Photomicrographs dari korteks cerebri lobus frontalis dengan pengecatan eosin dan hematoxylin (pembesaran 100x). 2A. Lapisan korteks serebral lobus frontalis (Lapisan molekul =ML; granular eksternal=EG; piramida eksternal=EP; granular internal=IG; piramida internal=IP; lapisan polimorfik=PL). Piamater menutupi lapisan molekuler (panah melengkung). 2B. Lapisan molekuler dengan sel neuroglial (panah tipis), lapisan granular eksternal dengan sel granular (G) dan lapisan piramidal eksternal dengan sel piramidal kecil (P), dan menengah (P1). Pembuluh darah (panah kepala). 2C. Lapisan granular internal menunjukkan sel granular non piramidal bulat (G) dengan “open face nuclei”. Lapisan piramida internal mengungkapkan sel piramidal berukuran besar (P). Sel glial dapat dilihat (panah tipis), dan neurofil eosinofilik (bintang). 2D. Sel piramida normal (P) dengan dendrit apikal. Pembuluh darah (kepala panah) diamati di neuropil (bintang). (Pewarnaan biru Toluidin; X 1000).²¹



Gambar 3. Struktur histologi cerebellum tikus. A. grey matter (G), dan white matter (W). B. Grey matter yang mengandung lapisan sel Purkinje (PL), granular lapisan (GL), dan lapisan molekuler (ML). C. Sel Purkinje yang memperlihatkan badan sel (S). Pewarnaan dengan hematoxylin dan eosin (H&E), pembesaran A=100X, B=400X dan C=1000X.²²

2.2. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 4. Kerangka konsep pengaruh asap rokok terhadap abnormalitas histologi cerebellum dan cerebrum dan pada paru tikus *Sprague-Dawley*.

KONTRIBUSI HASIL PENELITIAN

Nilai hasil penelitian bagi pengembangan Ilmu Pengetahuan/Teknologi/Seni

- Memberi masukan baru tentang abnormalitas sel Purkinje pada cerebellum, maupun sel pyramidal pada cerebrum setelah tikus dipapari asap rokok.
- Nilai hasil penelitian bagi Pengembangan Lembaga/Institusi
- Mendukung green healthy life yang menjadi salah satu poin pada road map penelitian Universitas Trisakti.

Nilai hasil penelitian bagi Pembangunan Lokal/Regional/Nasional/ Internasional

- Menyumbang aspek dasar tentang dampak negatif asap rokok terhadap sel Purkinje pada cerebellum maupun sel pyramidal pada cerebrum tikus *Sprague Dawley*.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan antara bulan Oktober 2023 sd Juni 2024.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti- Jakarta, Laboratorium Program Studi Farmasi, FMIPA Universitas SamRatulangi, Manado, dan di Laboratorium Patologi Anatomi FKMK UGM, Yogyakarta. Penelitian tersebut meliputi pemberian paparan asap rokok terhadap tikus, pembuatan slide preparate histologi, dan pengukuran ekspresi mRNA gen p53. Pengamatan histologi dari slide preparat otak tikus (cerebellum dan cerebrum) dilakukan di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia.

3.2. Metode Penelitian

Desain Penelitian

Jenis penelitian ini yaitu eksperimental menggunakan hewan coba tikus *Rattus novergicus* galur *Sprague-Dawley* yang dipapari dengan asap rokok kretek, sedangkan kelompok kontrol adalah kelompok tikus yang bernafas dengan udara biasa (*experimental and control group design*). Pemilihan tikus kedalam kelompok kontrol dan perlakuan dilakukan secara random (*randomize controle trial*).

Sampel Penelitian

Jumlah tikus per kelompok dihitung dengan rumus jumlah sample minimal yaitu $10/k+1$, sedangkan jumlah sample maksimal yaitu $20/k+1$. Besar sampel yang digunakan sebanyak minimal 4 ekor tikus untuk masing-masing kelompok, sedangkan jumlah sampel maksimal 7.²³ Dalam penelitian ini digunakan sebanyak 12 ekor tikus jantan *Rattus novergicus* galur *Sprague-dawley* yang dibagi menjadi 2 kelompok, masing-masing 6 ekor.

Kriteria Inklusi Dan Eksklusi

Tikus *Rattus novergicus* galur *Sprague-Dawley* jantan yang berumur sekitar 2-3 bulan dengan berat badan 200 - 250 gram sebagai kriteria inklusi, sedangkan kriteria eksklusinya apabila tikus mati saat perlakuan. Kami menggunakan tikus dengan berat badan tersebut sesuai dengan konversi untuk manusia dengan berat badan 70 kg.²⁴

Ruang perlakuan dilengkapi AC dengan suhu $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, kelembaban $55 \pm 5\%$, dan lampu artificial fluorescent (12:12 jam, siklus terang dan gelap). Penelitian ini diusahakan untuk memperoleh lolos kaji etik. Pada penelitian ini ada 3 kelompok perlakuan, yaitu kelompok 1, 2, dan 3. Semua tikus yang telah dikelompokkan, diperlakukan dalam smoking chamber. Kelompok 1 adalah kelompok kontrol, tikus bernafas dengan udara biasa tanpa dipapari asap rokok. Kelompok 2 adalah kelompok tikus yang dipapari asap rokok dengan dosis 1 batang/ekor/hari selama 1 bulan. Kelompok 3 adalah kelompok tikus yang dipapari asap rokok dengan dosis 2 batang/ekor/hari selama 1 bulan. Paparan asap rokok dilakukan dengan membuka katup oksigen terlebih dahulu, kemudian rokok dipasang pada pipa yang dihubungkan dengan pompa, selanjutnya rokok dibakar dan pompa dinyalakan sehingga asap akan masuk ke dalam smoking chamber dan terhirup tikus. Setelah selesai perlakuan selama 1 bulan, tikus dikorbankan dengan euthanasia. Tikus dibius terlebih dahulu dengan xylain dan ketamin, kemudian dilakukan koleksi organ sesuai prosedur yang telah ditetapkan. Koleksi organ dilakukan dalam larutan neutral buffer formalin (NBF) 10%, selanjutnya sample organ dibuat slide preparat mikroskop untuk menentukan abnormalitas sel epitel, dan makrofag alveoler pada paru tikus. Selain itu, sample organ juga diperiksa kadar mRNA p53.

Karakterisasi kretek

Sebelum digunakan untuk perlakuan, terlebih dahulu dilakukan karakterisasi kandungan zat pada kretek. Karakterisasi tersebut meliputi kandungan nikotin dan kandungan zat pada kretek. Pengukuran kadar nikotin pada kretek dilakukan menggunakan program winCATS Planar chromatography Manager. Selain nikotin, penentuan kadar zat pada kretek dilakukan menggunakan GC-MS.

Visualisasi sel Purkinje pada cerebellum dan sel pyramidal pada cerebrum

Ketebalan jaringan otak (cerebrum maupun cerebellum) yang disiapkan untuk pembuatan slide, adalah 3 mm. Jaringan otak pada blok parafin dipotong dengan ketebalan 5 μm . Selanjutnya, bagian jaringan diwarnai dengan hematoxylin dan eosin (HE), trikrom Masson, dan Giemsa. Pengamatan dilakukan pada sel piramidal di korteks serebral, di daerah hipokampus. Selain itu, sel Purkinje juga diamati pada materi abu-abu korteks serebelar.

Scanning Electron Microscopy

Semua sampel jaringan dilapisi sputter dengan 3 nm platinum dalam resolusi tinggi Turbo-Pumped Sputter Coater Q150T (Quorum Technologies Ltd, Ringmer, UK). Pemeriksaan dengan mikroskop elektron dilakukan pemindaian FEI Nova NanoSEM 450 lapangan (Thermo Fisher Scientific, Brno, Republik Ceko). Opsi Navigasi Montase dari perangkat lunak SEM, v. 6.3.4.3233 (Helios NanoLab, Thermo Fisher Scientific, Brno, Republik Ceko) digunakan untuk memetakan seluruh bagian jaringan pada resolusi

rendah. Selanjutnya, analisis SEM akhir dilakukan pada tegangan percepatan mulai dari 2 kV hingga 5 kV dan ukuran titik 3 menggunakan Everhart–Thornley Detector (ETD), Circular Backscatter Detector (CBS), dan Through the Lens Detector (TLD).

Penentuan kadar mRNA p53

Pengukuran kadar p53 dilakukan menggunakan real time-polychain reaction (q PCR). Bahan yang digunakan adalah sample jaringan paru tikus Sprague Dawley. Sampel jaringan paru diisolasi RNAny, selanjutnya hasilnya berupa larutan dalam tabung 1.5 mL yang disimpan pada suhu – 80 °C. Reagen yang digunakan untuk mengukur kadar RNA yaitu Bioline SensiFast Sybr Lo-ROX One-step kit, Zymo Research Quick-RNATM MiniPrep Plus, dan Geneaid Micropestle. Target gen p53 mouse menggunakan sense primer (5' to 3') AGGCCTTGGAAGCAAGGAT, sedangkan antisense primer (5' to 3') TGAGTCAGGCCCTTCTGTCT, dengan ukuran 140 bp. Analisis QPCR menggunakan SYBR Green Master Mix (Bio-rad) dalam system Bio-rad CFX96 qPCR. Gen glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH) digunakan sebagai control internal.

3.3. Metode Analisis

Uji statistik yang dipilih pada penelitian ini adalah t test untuk menguji kemaknaan cytometric sel Purkinje, kadar p53 antar kelompok perlakuan. Perbedaan antar kelompok dinyatakan bermakna jika hasil analisis memperlihatkan nilai $P < 0.05$.

3.4. Indikator Capaian Penelitian

ASPEK		CHECKLIST
SKALA UNGGULAN	Skala Internasional	
	Skala Nasional	
	Skala Lokal	+
TOPIK/TEMA RISET	Top Down	
	Semi Top Down	+
	Bottom Up	
SKEMA PENDANAAN	Block Grant	+
	Kompetitif	
PELAKSANA RISET	Pusat Penelitian	+
	Individu	
	Riset Group	
	Dana Desentralisasi	
	DP2M (30%)	

SUMBER DANA	Mandiri PT	+
	Kerjasama Luar negeri	
	Sumber Lain-lain	
KEY PERFORMANCE INDICATOR	Jurnal	+
	HKI	+
	Teknologi Tepat Guna	
	S3	
	Seminar	
	Publikasi Internasional	+
	Buku Ajar	
	Lain_lain (BUNGA RAMPAI)	
MANAGEMEN PENGELOLAAN	LEMLIT	
	Fakultas	+
	Pusat Penelitian/Studi/Pengkajian	
BUKU PANDUAN	Buku Panduan Penelitian Usakti	+

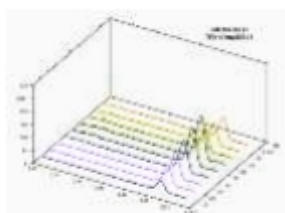
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada tahap ini, kami melaporkan hasil antara kelompok 1 dengan kelompok 2. Tikus kelompok 1 adalah kelompok kontrol, tikus bernafas dengan udara biasa tanpa dipapari asap rokok, sedangkan tikus kelompok 2 adalah kelompok tikus yang dipapari asap rokok kretek dengan dosis 1 batang/ekor/hari selama 1 bulan.

6.1. Karakteristik kretek

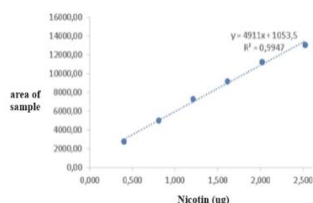
6.1.1. Pengukuran kadar nikotin pada kretek

Kromatogram 3-D diperoleh dengan menggunakan winCATS Planar chromatography Manager, disajikan pada gambar 4.



Gambar 5. Kromatogram 3-D diperoleh dengan menggunakan winCATS Planar chromatography Manager.

Kurva standar yang digunakan untuk mengukur kadar nikotin disajikan pada gambar 6.



Gambar 6. Kurva standar kadar nikotin

Kadar nikotin pada rokok kretek disajikan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Kadar nikotin pada rokok kretek

Nama sampel	Replikan	Berat sample	Volume spotting sampel	Add akhir sampel	Frekuensi	Jumlah spotting dalam	Luas area	Nikotin dalam sampel	Kadar nikotin dalam sampel kering	Rerata
		(g)	(μ L)	mL		(μ g)		(μ g)	(μ g/g)	(μ g/g)
1	1	0.5048	2.5	5	1	252.4	5916.1	0.99	3.92	3.92
	2	0.5048	2.5	5	1	252.4	5916.1	0.99	3.92	
2	1	0.5022	2.5	5	1	251.1	5840.5	0.975	3.88	3.84
	2	0.5022	2.5	5	1	251.1	5724.9	0.951	3.79	

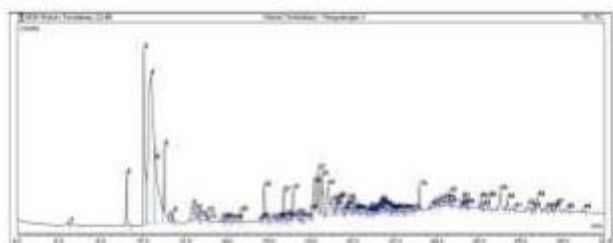
3	1	0.5034	2.5	5	1	251.6	5752.6	0.957	3.80	3.80
	2	0.5034	2.5	5	1	251.8	5759.3	0.958	3.81	
4	1	0.5029	2.5	5	1	251.2	5838.4	0.974	3.88	3.88
	2	0.5029	2.5	5	1	251.2	5852.5	0.977	3.89	
5	1	0.5041	2.5	5	1	251.9	5798.4	0.966	3.84	3.91
	2	0.5041	2.5	5	1	251.9	5976.3	1.002	3.98	
6	1	0.5046	2.5	5	1	252.2	5921.2	0.991	3.93	3.93
	2	0.5046	2.5	5	1	252.2	5928.3	0.993	3.94	
Rerata $\pm$ SD										3.88 $\pm$ 0.05

Keterangan: g = gram, μ L = mikro liter, mL = milli liter, μ g = mikro gram, μ g/g = mikro gram per gram.

Kadar nikotin pada kretek yang digunakan dalam penelitian ini yaitu $3.88 \pm 0.05 \mu\text{g/g}$.

6.1.2. Kandungan zat pada kretek

Kromatogram **GC-MS** untuk mengukur zat yang terkandung pada kretek disajikan pada gambar 7.



Gambar 7. Kromatogram GC-MS untuk mengukur zat yang terkandung pada tembakau

Penentuan kadar nikotin dan zat lain dalam kretek menjadi penting karena merupakan karakteristik zat aktif yang digunakan dalam perlakuan terhadap tikus percobaan. Ada beberapa zat pada kretek yang terkandung dalam jumlah yang tinggi, antara lain ethyl-diisopropylacetamide ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}$), Pyridine, 2-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)- ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$), 3-Allyl-6-methoxyphenol ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$), Caryophyllene ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$), 10-Octadecenoic acid, methyl ester ($\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$), 1-Heptatriacotanol ($\text{C}_{37}\text{H}_{76}\text{O}$).

Kadar nikotin pada kretek yang digunakan dalam penelitian ini yaitu $3.88 \pm 0.05 \mu\text{g/g}$. Sudah dibuktikan bahwa nikotin mengakibatkan ketagihan terhadap penggunaanya. Konsekuensi seorang perokok yaitu semakin meningkat kadar nikotin di dalam tubuhnya. Meskipun ada alternatif lain berupa rokok elektrik yang dimaksudkan untuk mengurangi kadar nikotin [25, 26]. Penurunan kadar nikotin pada kretek perlu dilakukan karena memberi dampak terhadap kesehatan penduduk [27]. Pada penelitian ini, kami tidak mengukur kadar eugenol pada kretek. Hasil penelitian lain mendemonstrasikan bahwa kadar eugenol pada kretek berkisar 2.8-33.8 mg/batang [28].

Ada beberapa zat pada kretek yang terkandung dalam jumlah yang tinggi, antara lain Pyridine, Caryophyllene ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$), methyl ester ($\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$), dan 1-Heptatriacotanol ($\text{C}_{37}\text{H}_{76}\text{O}$). Selain itu juga terdapat molekul ethyl-diisopropylacetamide ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}$), 3-

Allyl-6-methoxyphenol ($C_{10}H_{12}O_2$), 2-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)- ($C_{10}H_{14}N_2$), dan 10-Octadecenoic acid.

Meskipun kami tidak memeriksa kadar eugenol, tetapi pada kretek yang digunakan pada penelitian ini mengandung **caryophyllene**. Kita ketahui bahwa caryophyllene merupakan herbal esensial oil, termasuk minyak cengkeh. Caryophyllene telah dibuktikan sebagai antiinflamasi dengan menghambat mediator inflamasi utama, misalnya inducible nitric oxide synthase (iNOS), dan Interleukin 1 beta ($IL-1\beta$) [29].

Pyridine dan turunannya merupakan senyawa heterosiklik dengan berat molekul rendah. Meskipun terdapat pada kretek, pyridine dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan dan antibakteria. Pyridine juga digunakan dalam pengobatan berbagai penyakit, misalnya penyakit kardiovaskuler, antikanker, dan anticoagulant [30].

Metil ester asam lemak (FAME) terjadi melalui proses transesterifikasi lemak dengan metanol. FAME misalnya terdapat pada biodiesel, biasanya diperoleh dari minyak nabati melalui transesterifikasi. Selain itu FAME juga digunakan untuk memproduksi deterjen dan biodiesel [31]. Meskipun telah dibuktikan bahwa terdapat korelasi antara jalur metabolisme asam lemak dan cedera paru akut [32]. Karena kandungan asam lemak yang tinggi pada rokok kretek merupakan sumber paparan terhadap organ paru, maka penelitian kedepannya perlu difokuskan pada aspek asam lemak pada cedera paru, serta organ lainnya. Molekul heptatriacotanol juga dikandung pada kretek. heptatriacotanol berperan sebagai antioksidan, anti inflamasi, dan antikanker [33].

6.2. Struktur anatomi otak Sprague Dawley

Struktur anatomi otak Sprague Dawley disajikan pada gambar 8.



Gambar 8. Struktur anatomi otak Sprague Dawley. ob = olfactory bulb, lcc = left cerebral cortex, rcc = right cerebral cortex, cb = cerebellum, mobs = medulla oblongata of brain stem.

Morphology otak Sprague Dawley antara kelompok 1 tidak berbeda dengan kelompok 2. Secara morfologi, bagian otak Sprague Dawley antara kelompok 1 tidak berbeda dengan kelompok 2. Semua otak tikus pada penelitian ini memiliki bagian yang sama, meliputi ob, lcc, rcc, cb, dan mobs.

6.2. Visualisasi sel Purkinje pada cerebellum

6.2.1. Histologi cerebellum Sprague Dawley

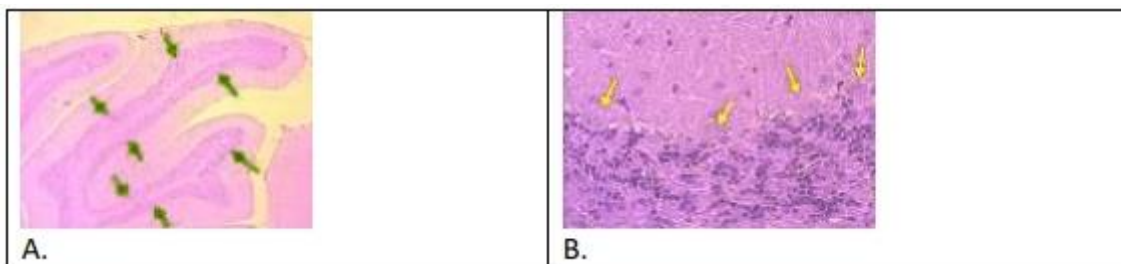
Histologi cerebellum Sprague Dawley disajikan pada gambar 9.



Gambar 9. Histologi cerebellum Sprague Dawley dengan pengecatan hematoxylin and eosin staining, objective 10 x. pm = pia matter, ml = molecular layer, cgm = cortex of grey matter, gl = granular cell layer, mwm = medulla of white matter.

6.2.2. Sel Purkinje pada cerebellum Sprague Dawley

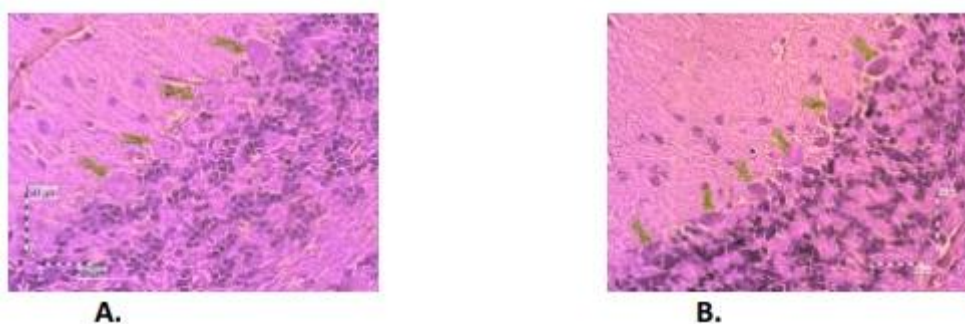
Tampilan sel Purkinje pada cerebellum Sprague Dawley disajikan pada gambar 10.



Gambar 10. Tampilan sel Purkinje pada cerebellum Sprague Dawley. A. Sel Purkinje pada tepi lapisan sel granular (panah kuning hijau), pewarnaan hematoksilin dan eosin, objektif 10 x. B. Sel Purkinje (panah kuning), pewarnaan hematoksilin dan eosin, tujuan 40 x.

6.2.3. Perbandingan secara kualitatif sel Purkinje pada cerebellum Sprague Dawley

Perbandingan penampakan sel Purkinje tikus Sprague Dawley antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 11.



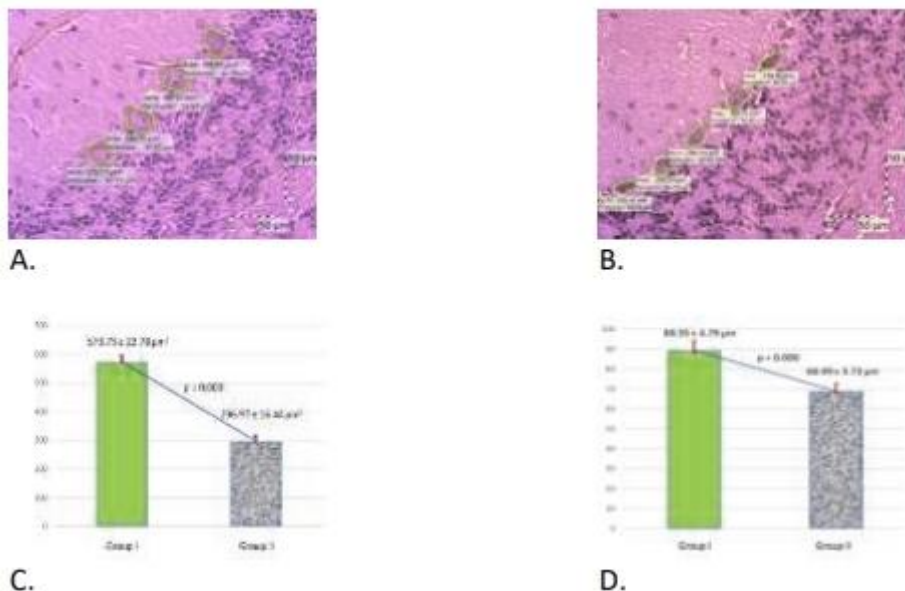
Gambar 11. Perbandingan penampakan sel Purkinje tikus Sprague Dawley antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. A. Sel Purkinje kelompok 1 (kontrol), diwarnai dengan hematoxylin and eosin, objektif 40 x. B. Sel Purkinje kelompok 2, diwarnai dengan hematoksilin dan eosin, tujuan 40 x. Kelompok 1 (kontrol), tikus bernapas menggunakan udara biasa tanpa

terpapar asap rokok kretek. Kelompok 2, kelompok tikus yang dipapar asap rokok kretek 1 batang/hari selama 30 hari perlakuan. Sel Purkinje ditandai dengan panah hijau kuning.

Sel Purkinje terletak di tepi lapisan sel granular otak kecil tikus Sprague Dawley baik pada kelompok 1 maupun kelompok 2. Penampakan sel Purkinje pada kelompok 1 tampak bulat, sedangkan pada kelompok 2 tampak lebih kecil dan meruncing. Berdasarkan penampakan tersebut, sel Purkinje pada kelompok 1 tampak memiliki struktur histologis yang normal, sedangkan pada kelompok 2 memiliki struktur histologis yang tidak normal.

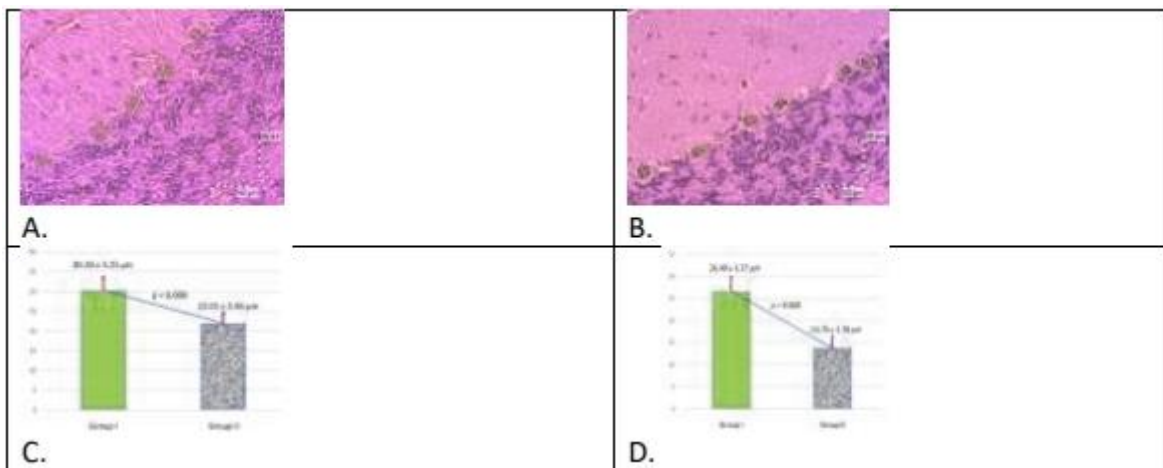
6.2.4. Perbandingan secara kuantitatif sel Purkinje pada cerebellum Sprague Dawley

Pengukuran cytometrik sel Purkinje pada cerebellum Sprague Dawley meliputi area, perimeter, panjang dan lebar. Perbandingan area, dan perimeter sel Purkinje tikus Sprague Dawley antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 12.



Gambar 12. Perbandingan area, dan perimeter sel Purkinje tikus Sprague Dawley antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. A. Sel Purkinje kelompok 1 (kontrol), diwarnai dengan hematoxylin dan eosin, objektif 40 x. B. Sel Purkinje kelompok 2, diwarnai dengan hematoxylin dan eosin, tujuan 40 x. C. Luas sel Purkinje tikus Sprague Dawley antara kelompok 1 dibandingkan kelompok 2. D. Keliling sel Purkinje tikus Sprague Dawley antara kelompok 1 dibandingkan kelompok 2. Kelompok 1 (kontrol), tikus bernapas menggunakan udara biasa tanpa paparan asap kretek. Kelompok 2, kelompok tikus yang dipapar asap rokok kretek 1 batang/hari selama 30 hari perlakuan. Sel Purkinje ditandai dengan panah hijau kuning.

Perbandingan panjang (length) dan lebar (width) sel Purkinje tikus Sprague Dawley antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada Gambar 13.



Gambar 13. Perbandingan panjang (length) dan lebar (width) sel Purkinje tikus Sprague Dawley antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. A. Panjang dan lebar sel Purkinje kelompok 1 (kontrol), diwarnai dengan hematoksin dan eosin, objektif 40 x. B. Panjang dan lebar sel Purkinje kelompok 2, diwarnai dengan hematoksin dan eosin, objektif 40 x. C. Panjang sel Purkinje tikus Sprague Dawley antara kelompok 1 dibandingkan kelompok 2. D. Lebar sel Purkinje tikus Sprague Dawley antara kelompok 1 dibandingkan kelompok 2. Kelompok 1 (kontrol), tikus bernapas menggunakan udara biasa tanpa paparan asap kretek. Kelompok 2, kelompok tikus yang dipapar asap rokok kretek 1 batang/hari selama 30 hari perlakuan.

Nilai rata-rata luas sel Purkinje tikus Sprague Dawley kelompok 1 adalah 573,73 μm^2 , dengan standar deviasi (SD) 22,78 μm^2 , jumlah sampel 48, interval kepercayaan bawah (CI) 95% masing-masing 567,30 dan 579,93 μm^2 . Nilai rerata luas sel Purkinje tikus Sprague Dawley kelompok 2 adalah 296,97 μm^2 ; dengan SD 16,44 μm^2 ; jumlah sampel 48, 95% lebih rendah dan atas CI masing-masing 292,46 dan 301,79 μm^2 . Uji persamaan varians luas sel Purkinje Levene dengan nilai F 4,704; P = 0,033; Nilai P uji t untuk kesetaraan mean 0,000; dengan $t=68,26$; $df = 85,51$. Luas sel Purkinje tikus Sprague Dawley pada kelompok 1 lebih tinggi dibandingkan kelompok 2 (P=0,000).

Nilai rata-rata perimeter sel Purkinje tikus Sprague Dawley pada kelompok 1 adalah 89,35 μm , dengan SD 4,79 μm , jumlah sampel 48, interval kepercayaan bawah (CI) 95% dan atas masing-masing 87,98 dan 90,63 μm . Nilai rerata keliling sel Purkinje tikus Sprague Dawley kelompok 2 adalah 68,99 μm ; dengan SD 3,73 mikron; jumlah sampel 48, 95% lebih rendah dan atas CI masing-masing 67,93 dan 70,02 μm . Uji persamaan varians luas sel Purkinje Levene dengan nilai F 2,70; P = 0,104; Nilai p uji t persamaan mean 0,000, dengan $t = 23,24$; $df = 94$. Keliling sel Purkinje tikus Sprague Dawley pada kelompok 1 lebih tinggi dibandingkan kelompok 2 (P=0,000).

Nilai rata-rata panjang sel Purkinje tikus Sprague Dawley kelompok 1 adalah 30,33 μm , dengan SD 3,25 μm , jumlah sampel 48, 95% lebih rendah dan atas CI masing-masing 29,43 dan 31,23 μm . Nilai rata-rata panjang sel Purkinje tikus Sprague Dawley kelompok 2 adalah 22,01 μm , dengan SD 2,65 μm , jumlah sampel 48, 95% lebih rendah dan atas CI masing-masing 21,27 dan 22,79 μm . Uji persamaan varians luas sel Purkinje Levene dengan nilai F 3,79; P = 0,054, nilai P

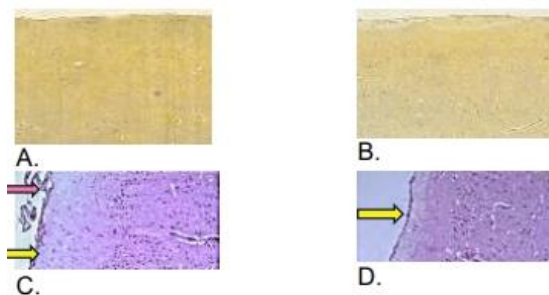
uji t untuk kesetaraan mean 0,000, dengan $t = 13,75$; $df = 94$. Panjang sel Purkinje tikus Sprague Dawley pada kelompok 1 lebih tinggi dibandingkan kelompok 2 ($P=0,000$).

Nilai rata-rata lebar sel Purkinje tikus Sprague Dawley kelompok 1 adalah $26,49 \mu\text{m}$, dengan SD $3,37 \mu\text{m}$, jumlah sampel 48, bawah 95% dan atas CI masing-masing $25,56$ dan $27,38 \mu\text{m}$. Nilai rata-rata lebar sel Purkinje tikus Sprague Dawley kelompok 2 adalah $13,75 \mu\text{m}$, dengan SD $2,78 \mu\text{m}$, jumlah sampel 48, bawah CI 95% dan atas CI masing-masing $12,95$ dan $14,56 \mu\text{m}$. Uji Levene persamaan varians lebar sel Purkinje dengan nilai $F 1,033$, $P = 0,312$, nilai P uji t persamaan mean 0,000, dengan $t = 20,21$, $df = 94$. Lebar sel Purkinje tikus Sprague Dawley kelompok 1 lebih tinggi dari kelompok 2 ($P=0,000$).

6.3. Visualisasi cerebrum

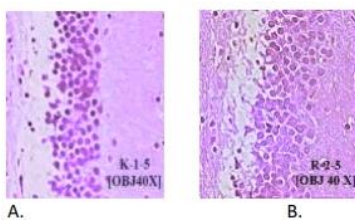
6.3.1. Histologi cerebrum

Tampilan histologi cerebrum Sprague Dawley disajikan pada gambar 14



Gambar 14. Tampilan histologi cerebrum Sprague Dawley. A. Histologi cerebrum kelompok 1 dengan pengecatan trichrome Masson, objektif 10 x. B. Histologi cerebrum kelompok 2 dengan pengecatan trichrome Masson, objektif 10 x. C. Histologi cerebrum pada kelompok 1. D. Histologi cerebrum pada kelompok 2. Vena ditunjukkan oleh anak panah merah, sedangkan piamater ditunjukkan oleh anak panah kuning. Kelompok 1 (kontrol), tikus bernapas menggunakan udara biasa tanpa terpapar asap rokok kretek. Kelompok 2, kelompok tikus yang dipapar asap rokok kretek 1 batang/hari selama 30 hari perlakuan.

Histologi cerebrum pada area hipocampus tikus Sprague Dawley disajikan pada gambar 15.

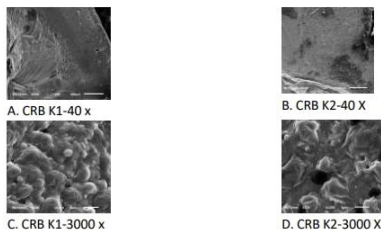


Gambar 15. Histologi cerebrum Sprague Dawley dengan pengecatan hematoxylin and eosin staining, objective 40 x. A. Kelompok 1 (kontrol). B. Kelompok 2. Kelompok 1 (kontrol), tikus bernapas menggunakan udara biasa tanpa terpapar asap rokok kretek. Kelompok 2, kelompok tikus yang dipapar asap rokok kretek 1 batang/hari selama 30 hari perlakuan.

Secara kualitatif diperlihatkan bahwa sel pyramidal pada kelompok 1 terlihat normal, sedangkan pada kelompok 2 terlihat degenerasi. Ciri sel pyramidal yang berdegenerasi yaitu bentuk selnya yang meruncing dan tidak membulat. Secara kualitatif, kerapatan sel pyramidal yang menjadi ciri bagian kortek cerebri memperlihatkan menurunnya kerapatan sel pada kelompok 2 kelompok tikus yang dipapar asap rokok kretek 1 batang/hari selama 30 hari perlakuan. Fakta ini perlu penelitian lebih lanjut apakah menurunnya kerapatan sel tersebut berhubungan dengan fungsi sel pyramidal tersebut.

6.4. Scanning Electron Microscopy

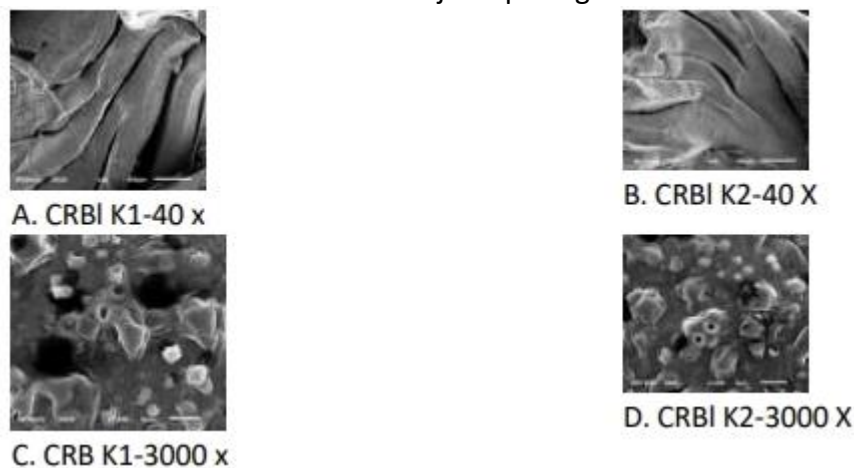
Hasil SEM cerebrum disajikan pada gambar 16



Gambar 16. SEM cerebrum Sprague Dawley. A, C. Kelompok 1 (kontrol). B, D. Kelompok 2. Kelompok 1 (kontrol), tikus bernapas menggunakan udara biasa tanpa terpapar asap rokok kretek. Kelompok 2, kelompok tikus yang dipapar asap rokok kretek 1 batang/hari selama 30 hari perlakuan.

Berdasar foto mikroskop electron pada pembesaran 40 x, karakteristik permukaan cerebrum antara kelompok 1 sulit dibedakan tampilannya dengan kelompok 2. Pada pembesaran 3000 x, permukaan tampilan pada cerebrum kelompok 1 terlihat normal. Jika dibandingkan dengan kelompok 2, terlihat tampilan permukaan cerebrumnya berbeda dengan kelompok 1. Pada permukaan cerebrum kelompok 1 terlihat adanya granula, sedangkan pada kelompok 2 granula seolah-olah terkikis dan melandai.

Hasil SEM cerebellum disajikan pada gambar 17



Gambar 17. SEM cerebellum Sprague Dawley. A, C. Kelompok 1 (kontrol). B, D. Kelompok 2. Kelompok 1 (kontrol), tikus bernapas menggunakan udara biasa tanpa terpapar asap rokok kretek. Kelompok 2, kelompok tikus yang dipapar asap rokok kretek 1 batang/hari selama 30 hari perlakuan.

Berdasar tampilan mikroskop electron dengan pembesaran 40 x, permukaan cerebellum pada kelompok 1 sulit dibedakan dengan kelompok 2. Berdasar tampilan mikroskop electron dengan pembesaran 3000 x, permukaan cerebellum pada kelompok 2 tampak mengkerut, sedangkan kelompok 1 tidak demikian. Hal ini memperlihatkan bahwa tampilan granula permukaan cerebellum kelompok 1 terlihat lebih jarang disbanding kelompok 2. Ada kemungkinan, keadaan ini berhubungan dengan semakin jarang sel Purkinje pada cerebellum.

6.5. Ekspresi gen p 53

Sebelum pengukuran ekspresi gen p53 dilakukan terlebih dahulu dilakukan optimasi terlebih dahulu (hasil optimasi di lampiran). Hasil ekspresi gen p53 dari sampel otak Sprague Dawley disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil ekspresi gen p53 dari sampel otak Sprague Dawley

Target	Sampel	RQ: $2^{-\Delta\Delta CT}$	
		Kelompok 1	Kelompok 3
P53	1	1.00	3.98
P53	2	1.00	2.03
P53	3	1.00	2.89
P53	4	1.00	2.41
P53	5	1.00	3.17
P53	6	1.00	2.79
Rerata		1.00	2.88
SD		0	0.67

Hasil ekspresi gen p53 antara kelompok 1 berbeda dengan kelompok 2 ($p=0.001$), $df = 5$, mean different = -1.87833, CI 95% lower= -2.58164, upper = -1.17503.

Ada peningkatan hasil ekspresi gen p53 di otak tikus Sprague Dawley pada kelompok perlakuan disbanding dengan kontrol.

Hasil penelitian terdahulu memperlihatkan bahwa ekspresi gen p53 pada pru tikus Sprague Dawley 3.02 ± 0.69 [34].

...

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

Mulai isi kesimpulan dan saran di sini ...

Kadar nikotin pada kretek yang digunakan dalam penelitian ini yaitu $3.88 \pm 0.05 \mu\text{g/g}$.

Ada beberapa zat pada kretek yang terkandung dalam jumlah yang tinggi, antara lain **Pyridine**, **Caryophyllene** ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$), **methyl ester** ($\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$), dan 1-Heptatriacotanol ($\text{C}_{37}\text{H}_{76}\text{O}$). Selain itu juga terdapat molekul ethyl-diisopropylacetamide ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{NO}$), 3-Allyl-6-methoxyphenol ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$), 2-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)- ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$), dan 10-Octadecenoic acid.

Paparan asap rokok kretek dosis rendah 1 batang/hari selama 30 hari pada tikus Sprague Dawley tidak mempengaruhi perubahan morfologi pada otak. Asap kretek 1 batang/hari selama 30 hari memperkecil ukuran badan sel Purkinje dan mengubah bentuk dari bulat menjadi meruncing.

Kedepannya perlu diteliti implikasi klinis kelainan sel Purkinje terhadap fungsi motorik akibat paparan asap rokok kretek. Lebih khusus lagi, perlu diteliti kelainan ukuran dan bentuk sel Purkinje yang mengalami degenerasi akibat paparan asap rokok kretek.

Paparan asap rokok 1 batang/hari selama 30 hari meningkatkan ekspresi gen p53 pada otak tikus Sprague Dawley.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kasri RA, Ahsan A, Wiyono NH, et al. (2021). New evidence of illicit cigarette consumption and government revenue loss in Indonesia. *Tobacco Induced Diseases*, 84, 1-8. <https://doi.org/10.18332/tid/142778>
2. WHO (World Health Organization)(May 27th 2020). Tobacco. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>
3. Jha P. (2020). The hazards of smoking and the benefits of cessation: a critical summation of the epidemiological evidence in high-income countries. *eLife*, 9(e49979), 1-46. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.49979>
4. SEATCA (Southeast Asia Tobacco Control Alliance)(4th Ed September 2018). Tobacco Control Atlas ASEAN Region. Available online: <https://seatca.org/dmdocuments/TobaccoControlAtlas ASEANRegion 4thEd Dec2019.pdf>.
5. Lin J, Taggart M, Borthwick L, et al. (2021). Acute cigarette smoke or extract exposure rapidly activates TRPA1-mediated calcium influx in primary human airway smooth muscle cells. *Scientific Reports* 11 (9643), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89051-4>
6. Amorós-Pérez A, Cano-Casanova L, Román-Martínez MC, et al. (2021). Comparison of particulate matter emission and soluble matter collected from combustion cigarettes and heated tobacco products using a setup designed to simulate puffing regimes. *Chemical Engineering Journal Advances*, 8(100144), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.100144>. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666821121000600>
7. Paul AR, Khan F, Jain A, et al. (2021). Deposition of smoke particles in human airways with realistic waveform. *Atmosphere*, 12 (912), 1-22. <https://doi.org/10.3390/atmos12070912>. [file:///C:/Users/User/Downloads/atmosphere-12-00912%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/atmosphere-12-00912%20(1).pdf)
8. Rodgers J, Friede T, Vonberg FW, et al. (2022). The impact of smoking cessation on multiple sclerosis disease progression, *Brain*, 145 (4): 1368-1378. DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/awab385>. Available at <http://academic.oup.com/brain/article/145/4/1368/6384574?login=false>
9. Okazaki R. (2022). Role of p53 in Regulating Radiation Responses. *Life* 12 (1099): 1-19. <https://doi.org/10.3390/life12071099>. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9319710/>
10. Jung BC, Kim SH, Cho Y, et al. Tumor suppressor Parkin induces p53-mediated cell cycle arrest in human lung and colorectal cancer cells. *BMB Rep.* 2023, 56(10):557-562. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2023-0134>
11. Gatzke-Kopp LM, Riis JL, Ahmadi H, et al. Environmental tobacco smoke exposure is associated with increased levels of metals in children's saliva. *J Exp Sci Env Epidemiol* 2023, 33:903 – 910. <https://doi.org/10.1038/s41370-023-00554-w>.
12. Kim SW, Jung SW, Lee JG, et al. The exposure level of environmental harmful substances related to the secondhand smoke in Korean nonsmoker adults: data from the second Korean National Environmental Health Survey (KoNEHS 2012-2014): a cross-sectional study. *Ann Occup Environ Med.* 2019, 31(e30):1-10. doi: 10.35371/aoem.2019.31.e30.
13. Particle size distributions of mainstream and exhaled cigarette smoke and predictive deposition in human respiratory tract. *Aerosol Air Qual Res*, 2024, 13:324-332. <https://doi.org/10.1080/02786826.2024.2321254>
14. Perl O, Shuster A, Heflin M, et al. Nicotine-related beliefs induce dose-dependent responses in the human brain. *Nat Mental Health* 2024, 2: 177–188. <https://doi.org/10.1038/s44220-023-00188-9>
15. Shen Z, Huang P, Wang C, et al. Cerebellar Gray Matter Reductions Associate With Decreased Functional Connectivity in Nicotine-Dependent Individuals. *Nicotine & Tobacco Research*, 2018, 20

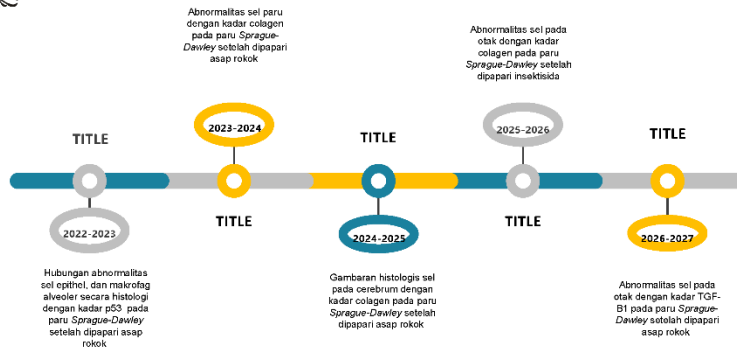
- (4): 440–447. doi:10.1093/ntr/ntx168. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6251678/>
16. Jacob L, Freyn M, Kalder M, et al. Impact of tobacco smoking on the risk of developing 25 different cancers in the UK: a retrospective study of 422,010 patients followed for up to 30 years. *Oncotarget* **2018**, 9 (25): 17420–17429. doi:10.18632/oncotarget.24724.
 17. National Library of Medicine-National Center for Biotechnology Information (NIH-NCBI)(2023). Tp53 tumor protein p53 [*Rattus norvegicus* (Norway rat)]. Accessed on February 24, 2023. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24842>
 18. Hyodo, T., Kuribayashi, N., Fukumoto, C. et al. The mutational spectrum in whole exon of p53 in oral squamous cell carcinoma and its clinical implications. *Sci Rep* **2022**, 12, 21695:1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25744-8>
 19. Darmon S, Park A, Lovejoy LA, et al. Relationship between Cigarette Smoking and Cancer Characteristics and Survival among Breast Cancer Patients. *Int J Environ Res Public Health*. **2022** 19(7-4084):1-10. doi: 10.3390/ijerph19074084.
 20. Nishikawa S, Iwakuma T. (2023). Drugs Targeting p53 Mutations with FDA Approval and in Clinical Trials. *Cancers* 15(429): 1-21. https://doi.org/10.3390/cancers_15020429. Available at <http://www.mdpi.com/2072-6694/15/2/429>
 21. Motawea SM, Amer RM, Haibaa DA, et al. Cerebral Cortical Changes in Adult Albino Rats Under the Effect of Tramadol and its Withdrawal: Histological and Morphometric Study. *EJH* **2019**, 43 (2): 412-426. DOI:10.21608/ejh.2019.14072.1136.
 22. Al-Amri IS, Kadim IT, Alkindi A, et al. Effects of Prenatal Tobacco Smoke on Cerebellum Histomorphological Changes at Critical Developmental Stages in CD-1 Mice. *Int J Morphol* **2021**, 39(1):318-326.
 23. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malays J Med Sci*. 2017, 24(5):101–105. <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.5.11>
 24. Sasongko H, Kundarto W. (2021). Petunjuk Praktikum Farmakologi i, Edisi 1. Laboratorium Farmakologi Program Studi D3 Farmasi Sekolah Vokasi Surakarta. Available at http://spada.uns.ac.id/pluginfile.php/247916/mod_resource/content/2/buku%20praktikum%20farmakologi%202021.pdf.
 25. Gottlieb S, Zeller M. A Nicotine-Focused Framework for Public Health. *N Engl J Med* **2017**, 377(12):1111-1114. doi: 10.1056/NEJMp1707409.
 26. Srivastava, A., Verma, N., Kumar, V. et al. Biofilm inhibition/eradication: exploring strategies and confronting challenges in combatting biofilm. *Arch Microbiol* **2024**, 206, 212. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03938-0>
 27. Hatsukami DK, Jensen JA, Carroll DM, et al. Reduced nicotine in cigarettes in a marketplace with alternative nicotine systems: randomized clinical trial. *The Lancet* **2024**, 35 July:1-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lana.2024.100796>.
 28. Cohen JE, Amalia B, Luo W, McWhirter KJ, Masanga BC, Pankow JF. Eugenol, menthol and other flavour chemicals in kreteks and 'white' cigarettes purchased in Indonesia. *Tob Control*. 2023 Apr 24;tc-2022-057827. doi: 10.1136/tc-2022-057827.
 29. Francomano F, Caruso A, Barbarossa A, et al. β -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. *Appl. Sci*. 2019, 9(5420): 1-19. doi:10.3390/app9245420.
 30. Faizan M, Kumar R, Mazumder A, et al. Hantzsch reaction: The important key for pyridine/dihydropyridine synthesis. *Synth Communications*, **2024**:1–24. <https://doi.org/10.1080/00397911.2024.2377738>.
 31. Varma P, Otageri J, Kandasubramanian B. (2024). Biodiesel from fats: Fatty acid feedstock as a circular economy solution. *Int J Green Energy*, **2024**, February: 1–21.

<https://doi.org/10.1080/15435075.2024.2319219>.

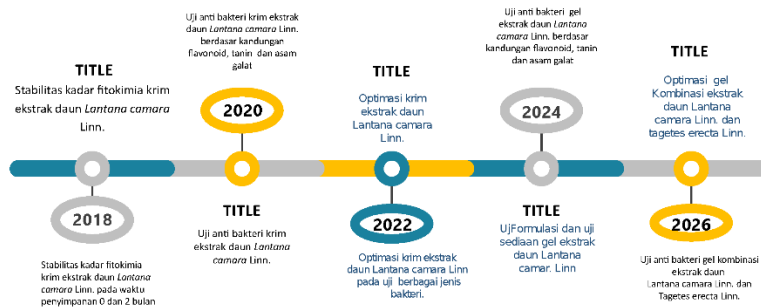
32. Lu X, Li G, Liu Y, et al. The role of fatty acid metabolism in acute lung injury: a special focus on immunometabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2024 Mar 8;81(1):120. doi: 10.1007/s00018-024-05131-4.
33. Hadi MY, Mohammed GJ, Hameed IH. Analysis of bioactive chemical compounds of *Nigella sativa* using gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharmacognosy Phytother* 2016, 8(2);8-24. DOI: 10.5897/JPP2015.0364.
34. Parwanto E, Tjahyadi D, Sisca S, Amalia H, Hairunisa N, Edy H, Oladimeji A, Djebli N. Low Doses of Kretek Cigarette Smoke Altered Rat Lung Histometric, and Overexpression of the p53 Gene. *Open Respir Med J*, 2024; 18: e18743064285619. <http://dx.doi.org/10.2174/0118743064285619240327055359>

...

LAMPIRAN 1. ROAD MAP PENELITIAN



PETA JALAN PENELITIAN [dr. DAVID TJAHYADI, M.KES.]



PETA JALAN PENELITIAN [EDY PARWANTO]

LAMPIRAN 2. LUARAN PENELITIAN

LUARAN 1 :

Kategori Luaran : Hak Kekayaan Intelektual

Status :

Jenis HKI : Hak Cipta

Nama HKI : Tampilan sel Purkinje pada Sprague Dawley yang terpapar asap kretek.

LUARAN 2 :

Kategori Luaran : Publikasi di Jurnal

Status : submitted

Jenis Publikasi Jurnal : Internasional Bereputasi

Nama Jurnal : Narra J

ISSN :

EISSN : 2807-2618

Lembaga Pengindek : Scopus Q1, Sinta 1

Url Jurnal : <http://narraj.org/main/submissions>

Judul Artikel : Histometric analysis to perform Purkinje cell abnormalities in rats due to low doses of kretek smoke exposure

BUKTI SUBMIT:

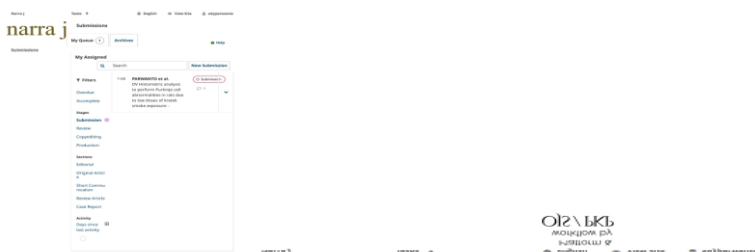
Histometric analysis to perform Purkinje cell abnormalities in rats due to low doses of kretek smoke exposure

David Tjahyadi^{1*}; Edy Parwanto²; Joey Josua Vidova Tjahyadi³; Laurentia Gabriella³, Hosea Jaya Edy⁴; Ashaolu Victoria Oladimeji⁵; Seçil Karahüseyin⁶



<http://narraj.org/main>

<http://narraj.org/main/submissions>



LUARAN 3 :

Kategori Luaran : Hak Kekayaan Intelektual

Status : Tercatat/Tersedia

Jenis HKI : Hak Cipta

Nama HKI : Tampilan Sel Purkinje Pada Sprague Dawley Yang Terpapar Asap Kretek

No. Pendaftaran : EC00202437996

Tanggal Pendaftaran : 2024-05-14

No. Pencatatan : 000613352

Penulis (Tim Peneliti) :

1. dr. David Tjahyadi, M.Kes.
2. Dr. dr. Edy Parwanto, M.Biomed.
3. Hosea Jaya Edy
4. Joey Josua Vidova Tjahyadi
5. Laurentia Gabriella



No.	Nama	Alamat
1.	dr. David Tjahyadi, M.Kes.	Perumahan Lirisan Blok 9 No. 12 RT 009 RW 001, Pagiangan Timur, Kota Padang, Sumatera Barat
2.	Dr. dr. Edy Parwanto, M.Biomed.	1. GABRIELLA, Y. VIDOVA, JOEY JOSUA, HOSSEA JAYA, TAMBURA, Diantara Jalan, Bukittinggi
3.	Hosea Jaya Edy	Kampung 1 RT 009 RW 001, Pagiangan Timur, Kota Padang, Sumatera Barat
4.	Joey Josua Vidova Tjahyadi	Perumahan Lirisan Blok 9 No. 12 RT 009 RW 001, Pagiangan Timur, Kota Padang, Sumatera Barat
5.	Laurentia Gabriella	17 Pagiangan Timur, RT 009 RW 001, Pagiangan Timur, Kota Padang, Sumatera Barat



LAMPIRAN: SURAT KESEDIAAN BERKOMITMEN



LAMPIRAN: SURAT PERNYATAAN

SURAT PERNYATAAN	STATEMENT LETTER
Yang bertanda tangan di bawah ini: Nama : Dr. Apt. Hosea Jaya Edy, S Farm, M Si. NIM : 0024108005 Institusi : Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado, Indonesia Menyatakan bersedia bekerja sama dalam penelitian berikut: Judul : Hubungan abnormalitas sel epitel, dan makrofag alveolar secara histologi dengan kadar p53 pada paru <i>Sprague-Dawley</i> setelah dipapari asap rokok Peneliti utama : dr. David Tjahyadi, M Kes. NIK : 2515/USAKTI Institusi : Bagian Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia Periode : Tahun 2022-2023. Demikian surat pernyataan ini kami buat agar dapat bermanfaat. Jakarta, 31 Agustus 2022 Yang menandatangani pernyataan  dr. David Tjahyadi, M Kes.  Dr. Apt. Hosea Jaya Edy, S Farm, M Si.	The undersigned below: Name : Ashaolu Victoria Oladimeji, M Sc., Ph. D, MRSC, ASC Institution : Department of Chemistry, LIFE, Loyola College, Chennai, India. Declare willingness to collaborate in the following research with title: "Effects of exposure to low doses of kretek cigarette smoke in the cerebrum and cerebellum of Sprague Dawley rats" Principal Investigators : dr. David Tjahyadi, M Kes. Institution : Histology Department, Faculty of Medicine, Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia Period : 2023-2024. We created this statement letter so that it can be useful. Jakarta, 16 November 2023 Signatory  (Dr. David Tjahyadi, M Kes.)  (Ashaolu Victoria Oladimeji, M Sc., Ph. D, MRSC, ASC)

LAMPIRAN: DRAF HKI

PEMBINAAN PENSIKULAN

1. Nama : dr. David Tjahyadi, M Kes., Ph. D, MRSC, ASC

2. NIM : 0024108005

3. Institusi : Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado, Indonesia

4. Judul : Hubungan abnormalitas sel epitel, dan makrofag alveolar secara histologi dengan kadar p53 pada paru *Sprague-Dawley* setelah dipapari asap rokok

5. Periode : Tahun 2022-2023.

6. Demikian surat pernyataan ini kami buat agar dapat bermanfaat.

Jakarta, 31 Agustus 2022

Yang menandatangani pernyataan


 dr. David Tjahyadi, M Kes.


 Dr. Apt. Hosea Jaya Edy, S Farm, M Si.

SURAT PERNYATAAN

The undersigned below:

Name : Ashaolu Victoria Oladimeji, M Sc., Ph. D, MRSC, ASC

Institution : Department of Chemistry, LIFE, Loyola College, Chennai, India.

Declare willingness to collaborate in the following research with title:

"Effects of exposure to low doses of kretek cigarette smoke in the cerebrum and cerebellum of Sprague Dawley rats"

Principal Investigators : dr. David Tjahyadi, M Kes.

Institution : Histology Department, Faculty of Medicine, Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia

Period : 2023-2024.

We created this statement letter so that it can be useful.

Jakarta, 16 November 2023

Signatory


 (Dr. David Tjahyadi, M Kes.)


 (Ashaolu Victoria Oladimeji, M Sc., Ph. D, MRSC, ASC)

PEMBINAAN PENSIKULAN

1. Nama : dr. David Tjahyadi, M Kes., Ph. D, MRSC, ASC

2. NIM : 0024108005

3. Institusi : Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado, Indonesia

4. Judul : Hubungan abnormalitas sel epitel, dan makrofag alveolar secara histologi dengan kadar p53 pada paru *Sprague-Dawley* setelah dipapari asap rokok

5. Periode : Tahun 2022-2023.

6. Demikian surat pernyataan ini kami buat agar dapat bermanfaat.

Jakarta, 31 Agustus 2022

Yang menandatangani pernyataan


 dr. David Tjahyadi, M Kes.


 Dr. Apt. Hosea Jaya Edy, S Farm, M Si.

LAMPIRAN DRAF JURNAL

PEMBINAAN PENSIKULAN

1. Nama : dr. David Tjahyadi, M Kes., Ph. D, MRSC, ASC

2. NIM : 0024108005

3. Institusi : Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado, Indonesia

4. Judul : Hubungan abnormalitas sel epitel, dan makrofag alveolar secara histologi dengan kadar p53 pada paru *Sprague-Dawley* setelah dipapari asap rokok

5. Periode : Tahun 2022-2023.

6. Demikian surat pernyataan ini kami buat agar dapat bermanfaat.

Jakarta, 31 Agustus 2022

Yang menandatangani pernyataan


 dr. David Tjahyadi, M Kes.


 Dr. Apt. Hosea Jaya Edy, S Farm, M Si.

SURAT PERNYATAAN

The undersigned below:

Name : Ashaolu Victoria Oladimeji, M Sc., Ph. D, MRSC, ASC

Institution : Department of Chemistry, LIFE, Loyola College, Chennai, India.

Declare willingness to collaborate in the following research with title:

"Effects of exposure to low doses of kretek cigarette smoke in the cerebrum and cerebellum of Sprague Dawley rats"

Principal Investigators : dr. David Tjahyadi, M Kes.

Institution : Histology Department, Faculty of Medicine, Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia

Period : 2023-2024.

We created this statement letter so that it can be useful.

Jakarta, 16 November 2023

Signatory


 (Dr. David Tjahyadi, M Kes.)


 (Ashaolu Victoria Oladimeji, M Sc., Ph. D, MRSC, ASC)

PEMBINAAN PENSIKULAN

1. Nama : dr. David Tjahyadi, M Kes., Ph. D, MRSC, ASC

2. NIM : 0024108005

3. Institusi : Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado, Indonesia

4. Judul : Hubungan abnormalitas sel epitel, dan makrofag alveolar secara histologi dengan kadar p53 pada paru *Sprague-Dawley* setelah dipapari asap rokok

5. Periode : Tahun 2022-2023.

6. Demikian surat pernyataan ini kami buat agar dapat bermanfaat.

Jakarta, 31 Agustus 2022

Yang menandatangani pernyataan


 dr. David Tjahyadi, M Kes.


 Dr. Apt. Hosea Jaya Edy, S Farm, M Si.



LAMPIRAN: ANALISIS DATA

LAMPIRAN 4. DATA SITOMETRIK SEL PURKINJE

PERHITUNGAN SITOMETRIK SEL PURKINYE DI CEREBELLUM SPRAGUE DAWLEY

	KELOMPOK I				KELOMPOK II			
Tikus I	AREA (um ²)	PERIMETER (um)	LENGTH (um)	WIDTH (um)	AREA (um ²)	PERIMETER (um)	LENGTH (um)	WIDTH (um)
Nomor sampel 1	564.49	92.79	22.94	15.96	284.29	66.15	20.01	19.42
Nomor sampel 2	580.42	93.67	26.27	26.04	294.22	65.76	19.23	13.21
Nomor sampel 3	589.25	96.22	33.04	21.59	286.26	63	21.15	13.73
Nomor sampel 4	555.77	92.17	26.01	24.83	307.34	64.95	18.46	8.84
Nomor sampel 5	606.31	91.42	25.74	18.8	259.66	64	17.45	12.08
Nomor sampel 6	546.42	87.07	33.66	22.45	298.27	64.75	19.66	19.63
Mean	573.78	92.22	27.94	21.61	288.34	64.77	19.33	14.49
SD	20.42	2.76	3.98	3.43	14.93	1.05	1.17	3.89
Tikus II								
Nomor sampel 1	582.17	89.25	35.45	27.87	314.15	66.76	21.64	10.3
Nomor sampel 2	528.12	82.09	33.58	27.6	326.41	75.3	25.12	11.4
Nomor sampel 3	551.98	88.49	25.09	22.54	278.26	66.02	23.37	15.51
Nomor sampel 4	593.74	93.59	32.48	24.68	316.28	68.29	21.99	14.47
Nomor sampel 5	534.42	86.75	31.68	26.75	299.62	71.28	26.64	17.62
Nomor sampel 6	579.02	97.28	34.31	19.46	289.53	69.73	24.09	12.55
Mean	561.58	89.58	32.10	24.82	304.04	69.56	23.81	13.64
SD	24.87	4.84	3.36	3.02	16.57	3.11	1.73	2.50
Tikus III								
Nomor sampel 1	558.92	86.9	27.73	21.91	291.89	71.27	21.63	15.34
Nomor sampel 2	572.84	93.28	30.81	28.37	301.92	68.92	26.34	14.47
Nomor sampel 3	569.18	88.37	25.65	24.73	296.99	70.23	22.81	17.83
Nomor sampel 4	582.66	94.28	29.83	26.97	279.73	64.82	22.87	12.55

Nomor sampel 5	586.17	86.92	31.28	29.78	315.97	69.36	24.38	11.78
Nomor sampel 6	613.51	93.46	32.89	30.22	308.19	76.24	25.33	16.74
Mean	580.55	90.54	29.70	27.00	299.12	70.14	23.89	14.79
SD	17.22	3.19	2.39	2.92	11.60	3.39	1.61	2.14

Tikus IV

Nomor sampel 1	572.17	81.25	28.62	27.82	322.14	69.62	21.72	11.21
Nomor sampel 2	537.26	82.09	29.34	26.33	326.41	74.32	23.49	16.21
Nomor sampel 3	542.89	88.49	31.24	29.37	282.26	68.46	24.27	13.79
Nomor sampel 4	611.27	87.46	28.79	26.88	321.28	67.44	22.57	12.73
Nomor sampel 5	572.22	82.95	25.89	23.57	299.62	72.78	26.11	12.74
Nomor sampel 6	588.92	97.28	32.67	29.91	297.31	71.27	23.97	14.99
Mean	570.79	86.59	29.43	27.31	308.17	70.65	23.69	13.61
SD	25.41	5.49	2.14	2.10	16.14	2.40	1.38	1.63

Tikus V

Nomor sampel 1	574.14	89.11	28.83	26.93	301.29	67.51	18.47	9.93
Nomor sampel 2	568.29	92.84	27.29	25.89	288.48	63.88	17.45	12.68
Nomor sampel 3	562.73	91.02	29.93	26.88	283.74	62.98	19.61	18.76
Nomor sampel 4	601.86	83.37	31.28	29.73	302.82	70.32	21.39	12.92
Nomor sampel 5	572.73	92.82	32.73	29.83	269.38	63.11	23.72	16.22
Nomor sampel 6	536.69	81.39	26.97	24.13	289.92	70.75	24.62	13.11
Mean	569.41	88.43	29.51	27.23	289.27	66.43	20.88	13.94
SD	19.16	4.49	2.06	2.03	11.22	3.28	2.63	2.82

Tikus VI

Nomor sampel 1	576.36	79.53	28.38	24.01	319.72	68.98	17.92	9.77
Nomor sampel 2	527.89	91.89	35.45	30.92	318.21	75.21	22.28	11.28
Nomor sampel 3	586.66	85.77	28.89	26.77	281.73	69.35	21.99	14.75
Nomor sampel 4	563.79	89.24	32.17	28.61	312.82	67.82	18.58	9.18
Nomor sampel 5	586.17	81.82	33.82	28.92	301.11	71.97	24.25	13.71
Nomor sampel 6	604.15	98.48	35.47	31.26	286.79	72.69	23.27	14.58
Mean	574.17	87.79	32.36	28.42	303.40	71.00	21.38	12.21
SD	23.99	6.34	2.87	2.48	14.86	2.53	2.34	2.25

Tikus VII

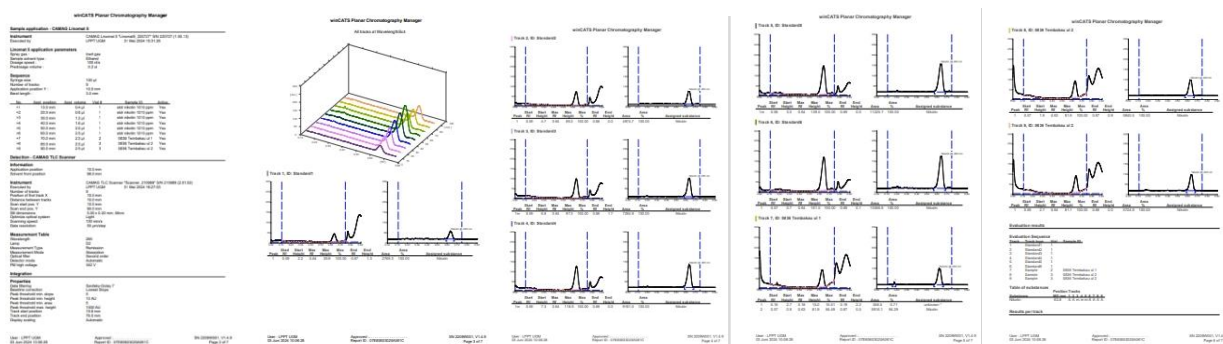
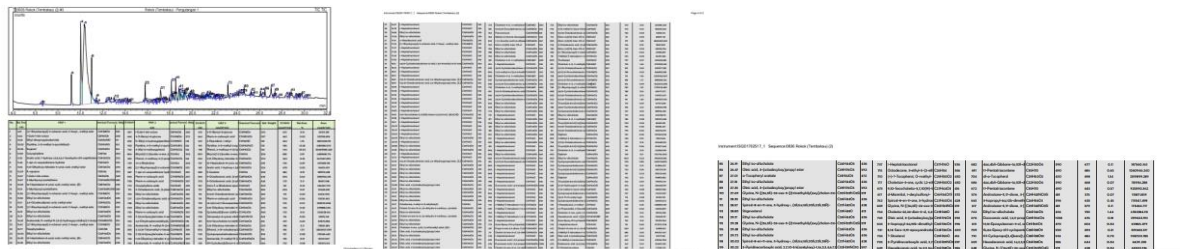
Nomor sampel 1	598.73	81.35	32.04	28.71	297.99	72.63	24.21	14.75
----------------	--------	-------	-------	-------	--------	-------	-------	-------

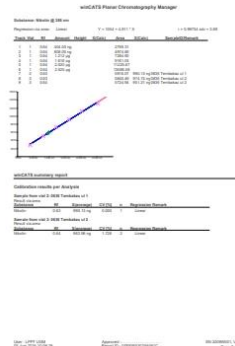
Nomor sampel 2	572.68	89.74	28.08	26.92	277.69	67.33	19.62	16.73
Nomor sampel 3	588.74	88.89	27.79	23.29	281.93	71.28	25.71	11.21
Nomor sampel 4	547.39	87.79	33.86	28.68	304.47	66.87	19.71	9.28
Nomor sampel 5	602.79	96.91	35.14	30.22	275.79	70.36	21.97	11.19
Nomor sampel 6	589.77	91.83	33..85	29.67	291.09	78.01	24.27	12.64
Mean	583.35	89.42	31.38	27.92	288.16	71.08	22.58	12.63
SD	18.67	4.66	2.98	2.31	10.59	3.71	2.33	2.47

Tikus VIII

Nomor sampel 1	555.72	91.28	33.02	28.99	308.41	65.96	19.86	10.23
Nomor sampel 2	582.19	89.28	33.66	30.82	315.61	68.21	18.23	15.67
Nomor sampel 3	551.98	88.54	26.92	24.87	279.98	67.02	19.62	14.73
Nomor sampel 4	608.32	92.37	26.79	24.86	264.22	65.23	18.92	12.92
Nomor sampel 5	598.87	93.24	28.83	27.88	294.22	75.73	26.31	18.26
Nomor sampel 6	560.02	86.77	29.42	28.37	309.21	67.52	20.12	16.23
Mean	576.18	90.25	29.77	27.63	295.28	68.28	20.51	14.67
SD	21.79	2.25	2.70	2.16	18.16	3.47	2.67	2.55

LAMPIRAN: KANDUNGAN ZAT PADA KRETEK





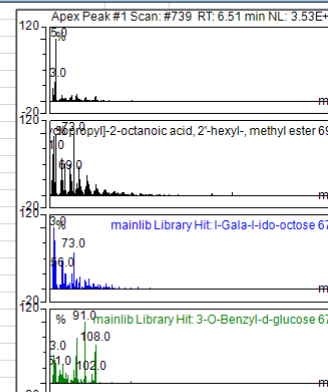
Injection Details									
Injection Name:	Rokok (Tembakau) - Pengulangan 1				Run Time (min):	27.99			
Vial Number:	41				Injection Volume:	1.00			
Injection Type:	Unknown								
Calibration Level:									
Instrument Method:	Screening Daun				Dilution Factor:	1.0000			
Processing Method:	Screening				Sample Weight:	1.0000			
Injection Date/Time:	19/Apr/24 10:12								
Library Search Results									
Ret. Time:	6.511								
Hit# 1									
Component:	[1,1'-Bicyclopropyl]-2-octanoic acid, 2'-hexyl-, methyl ester								
SI:	697								
RSI:	700								
Library:	mainlib								
Hit# 2									
Component:	l-Gala-l-ido-octose								
SI:	673								
RSI:	696								
Library:	mainlib								
Hit# 3									
Component:	3-O-Benzyl-d-glucose								
SI:	672								
RSI:	676								
Library:	mainlib								

Apex Peak #1 Scan: #739 RT: 6.51 min NL: 3.53E+06

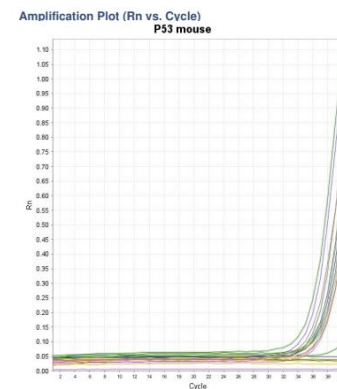
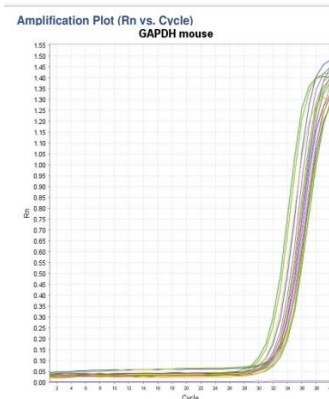
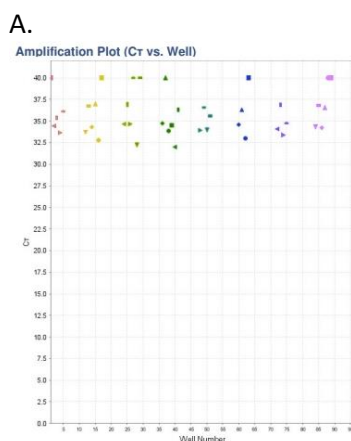
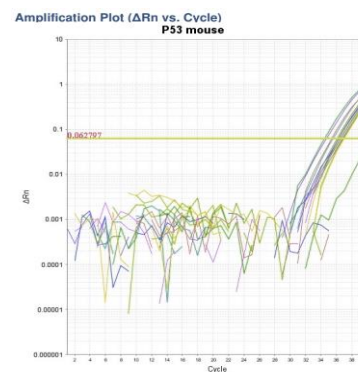
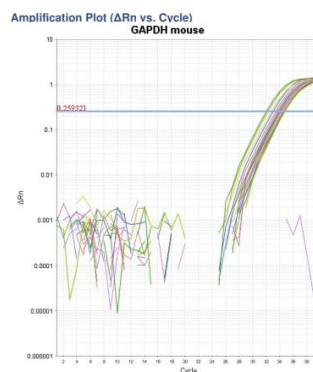
[1,1'-Bicyclopropyl]-2-octanoic acid, 2'-hexyl-, methyl ester 697

mainlib Library Hit: l-Gala-l-ido-octose 673

% 91.0 mainlib Library Hit: 3-O-Benzyl-d-glucose 672



Lampiran: Ekspresi gen p53 Hasil optimalisasi Applied Biosystems 7500 Fast Instrument



Hasil ekspresi gen p53 dari sampel otak Sprague Dawley

Target	Sampel	RQ: 2 ⁻ $\Delta\Delta CT$	
		Kelompok 1	Kelompok 3
P53	1	1.00	3.98
P53	2	1.00	2.03
P53	3	1.00	2.89
P53	4	1.00	2.41
P53	5	1.00	3.17
P53	6	1.00	2.79
Rerata		1.00	2.88
SD		0	0.67