



**PENGARUH PEMBERIAN JUS MENGGUDU
(*Morinda citrifolia L*)
DENGAN PEMBERIAN DOSIS BERTINGKAT
TERHADAP JUMLAH TROMBOSIT
PADA TIKUS GALUR WISTAR YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

**LAPORAN HASIL
KARYA TULIS ILMIAH**

**Diajukan sebagai syarat untuk mengikuti ujian hasil Karya Tulis Ilmiah
mahasiswa program strata-1 kedokteran umum**

**MARISA RACHIM
G2A008110**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
TAHUN 2012**

LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN HASIL KTI

**PENGARUH PEMBERIAN JUS MENGGUDU
(*Morinda citrifolia L*)
DENGAN PEMBERIAN DOSIS BERTINGKAT
TERHADAP JUMLAH TROMBOSIT
PADA TIKUS GALUR WISTAR YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

Disusun oleh

**MARISA RACHIM
G2A008110**

Telah disetujui

Semarang, 17 Juli 2012

Pembimbing 1

Pembimbing 2

**dr. Akhmad Ismail, Msi. Med
19710828 199702 1 001**

**dr. Neni Susilaningsih, M.Si
19630128 198902 2 001**

Ketua Penguji

Penguji

**dr.R.B.Bambang
19570512 195703 2 001**

**Witjahyo, M. Kes
19540413 198303 1 002**

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama Mahasiswa : Marisa Rachim

NIM : G2A008110

Program Studi : Program Pendidikan Sarjana Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Judul KTI : Pengaruh Pemberian Jus Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) dengan Pemberian Dosis Bertingkat terhadap Jumlah Trombosit pada Tikus Galur Wistar yang Terpapar Asap Rokok

Dengan ini menyatakan bahwa:

- 1) KTI ini ditulis sendiri tulisan asli saya sendiri tanpa bantuan orang lain selain pembimbing dan narasumber yang diketahui oleh pembimbing
- 2) KTI ini sebagian atau seluruhnya belum pernah dipublikasi dalam bentuk artikel ataupun tugas ilmiah lain di Universitas Diponegoro maupun di perguruan tinggi lain
- 3) Dalam KTI ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis orang lain kecuali secara tertulis dicantumkan sebagai rujukan dalam naskah dan tercantum pada daftar kepustakaan

Semarang, 17 Juli 2012

Yang membuat pernyataan,

Marisa Rachim

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena atas rahmat dan karuniaNya, laporan akhir hasil penelitian Karya Tulis Ilmiah ini dapat selesai. Penulisan Karya Tulis Ilmiah ini dilakukan dalam rangka memenuhi sebagian persyaratan untuk mencapai gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Rektor Universitas Diponegoro yang telah member kesempatan kepada kami untuk menimba ilmu di Universitas Diponegoro.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Fakultas Kedokteran UNDIP yang telah memberikan sarana dan prasarana kepada kami sehingga kami dapat menyelesaikan tugas ini dengan baik dan lancar.
3. Dr. Akhmad Ismail, Msi. Med dan dr. Neni Susilaningsih, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing kami dalam penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini.
4. Orang tua beserta keluarga kami yang senantiasa memberikan dukungan moral maupun material.
5. Para sahabat yang selalu member dukungan dalam menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah Ini.
6. Serta pihak lain yang tidak mungkin kami sebutkan satu-persatu atas bantuannya secara langsung maupun tidak langsung sehingga Karya Tulis ini dapat terselesaikan dengan baik.

Akhir kata, semoga Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang membantu dan senantiasa memberikan berkat dan rahmat yang berlimpah bagi kita semua.

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
ABSTRAK.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.5 Orisinalitas Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Trombosit	7
2.1.1 Pembentukan Trombosit.....	7
2.1.2 Struktur Trombosit	9
2.1.3 Fungsi Trombosit	11
2.2 Rokok	11
2.2.1 Bahan- Bahan Yang Terkandung Dalam Rokok.....	12
2.2.1.1 Tar	12

2.2.1.2 Karbon Monoksida.....	13
2.2.1.3 Nikotin.....	13
2.2.2 Hubungan Rokok dengan Jumlah Trombosit.....	14
2.3 Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L)	16
2.3.1 Deskripsi Tanaman	16
2.3.2 Kandungan Mengkudu	17
2.3.3 Hubungan Mengkudu dengan Jumlah Trombosit.....	20
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS....	21
3.1 Kerangka Teori.....	21
3.2 Kerangka Konsep.....	22
3.3 Hipotesis.....	22
BAB IV METODE PENELITIAN	23
4.1 Ruang Lingkup Penelitian.....	23
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	23
4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	23
4.4 Populasi dan Sampel Penelitian.....	24
4.4.1 Populasi.....	24
4.4.2 Sampel Penelitian.....	25
4.4.2.1 Kriteria Inklusi.....	25
4.4.2.2 Kriteria Eksklusi.....	25
4.4.3 Cara Sampling	25
4.4.4 Besar Sampel.....	25
4.5 Variabel Penelitian	26
4.5.1 Variabel Bebas.....	26
4.5.2 Variabel Tergantung.....	26
4.6 Definisi Operasional.....	26
4.7 Cara Pengumpulan Data.....	27
4.7.1 Bahan.....	27
4.7.2 Alat	27
4.7.3 Cara Kerja.....	27
4.7.3.1 Prosedur Pengumpulan Data	27

4.7.3.2 Cara Pemaparan Asap Rokok.....	28
4.7.3.3 Prosedur Pengukuran Jumlah Trombosit.....	29
4.8 Alur Penelitian.....	31
4.9 Analisis Data	32
4.10 Etika Penelitian.....	32
BAB V HASIL PENELITIAN	33
BAB VI PEMBAHASAN	36
BAB VII SIMPULAN DAN SARAN	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN.....	47

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Penelitian yang telah dilakukan.....	5
Tabel 2. Kadar nikotin dan karbon monoksida dari beberapa merk rokok.....	14
Tabel 3. Hasil pengukuran jumlah trombosit pada tiap kelompok.....	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. <i>Determinants of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis</i>	15
Gambar 2. <i>Morinda citrifolia</i>	16
Gambar 3. Kerangka Teori.....	21
Gambar 4. Kerangka Konsep.....	22
Gambar 5. Alur Penelitian.....	31
Gambar 6. Boxplot rerata jumlah trombosit.....	34

DAFTAR SINGKATAN

ADP	: <i>Adenosine diphosphate</i>
DTS	: <i>Dense tubular system</i>
EDTA	: <i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
ETS	: <i>Environmental Tobacco Smoke</i>
GEMs	: <i>Glycolipid-enrich membrane domains</i>
GMC-SF	: <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HSCs	: <i>Hematopoetic stem cells</i>
IFN-gamma	: <i>Interferon-gamma</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
iNOS	: <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
JAK/STAT	: <i>Janus kinase-signal transducer and activator of transcription</i>
mRNA	: <i>messenger Ribonucleic acid</i>
NO	: <i>Nitric oxide</i>
ROI	: <i>Reactive oxygen intermediate</i>
SCF	: <i>Stem Cell Factor</i>
SCSS	: <i>Surface-connected canalicular system</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNJ	: <i>Tahitian Noni Juice</i>
TPO	: <i>Thrombopoietin</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. *Etical clearance*

Lampiran 2. *Output* analisis program statistik

Lampiran 3. Dokumentasi penelitian

Lampiran 4. Biodata mahasiswa

ABSTRAK

Latar belakang : Rokok dapat membentuk radikal bebas seperti *nitric oxide* (NO) yang akan memacu pengeluaran mediator inflamasi dan meningkatkan produksi trombosit. Perubahan jumlah trombosit dan aktivasi trombosit ini akan meningkatkan risiko *cardiac ischaemia*. Mengkudu (*Morinda citrifolia L*) mengandung antioksidan yang dapat mencegah terhadap oksigen radikal bebas dan mempunyai efek anti-inflamasi dibutuhkan untuk menurunkan produksi trombosit yang berlebihan.

Tujuan : Membuktikan ada pengaruh pemberian jus mengkudu (*Morinda citrifolia L*) dengan pemberian dosis bertingkat terhadap jumlah trombosit pada tikus yang terpapar asap rokok.

Metoda : Penelitian ini adalah penelitian eksperimental *Post Test Only Control Group Design*. Sampel terdiri dari 20 tikus wistar, yang dibagi secara acak menjadi 4 kelompok: Kelompok K diberi diet standar dan tidak diberi mengkudu, kelompok P1, P2, P3 diberi diet standar dan diet mengkudu dengan dosis bertingkat 1ml/hari, 2ml/hari, 4ml/hari setelah diberi paparan asap rokok 2 batang per hari. Perlakuan diberikan selama 30 hari. Hari ke-31 sampel darah retroorbita diambil untuk pemeriksaan jumlah trombosit. Uji statistik menggunakan *One Way Anova*.

Hasil : Jumlah trombosit kelompok K (999,40+138,502) lebih tinggi dibanding kelompok P3 (882,60+619,705), P2(843,40+130,378) dan P1(839,20+155,046) mempunyai rerata paling rendah dibanding seluruh kelompok. Uji *One Way Anova* antara kelompok kontrol dan perlakuan tidak terdapat perbedaan bermakna ($p=0,85$, $p>0,05$).

Kesimpulan : Tidak terdapat pengaruh pemberian jus mengkudu (*Morinda citrifolia L*) dengan pemberian dosis bertingkat terhadap jumlah trombosit pada tikus yang terpapar asap rokok.

Kata kunci : *Morinda citrifolia L*, trombosit, asap rokok.

ABSTRACT

Background : Smoking can formed free radicals such as nitric oxide (NO), which would spur inflammatory mediators and increased the production of platelets. Changes in platelets counts and platelet activation would increase the risk of cardiac ischaemia. Noni (*Morinda citrifolia* L) contains antioxidants that can prevent against oxygen free radicals and has anti-inflammatory effect is required to reduce the excessive production of platelets.

Aim : the aim of the study was to prove the effect of noni juice in grading dosage on the amount of platelets on wistar mice which were exposed by cigarette smokes.

Methods : This study was experimental Post Test Only Control Group Design. Sample consisted of 20 wistar rats, which were divided randomly into four groups: Group K were given a standard diet and given no noni, the P1, P2, P3 were given standard diet and diet a dose of noni-rose 1ml/day, 2ml/day, 4ml/day after being given exposure to cigarette smoke 2 cigarettes per day. Treatment given for 30 days. Day-to-31 blood samples taken for examination retroorbita platelet counts. Statistical test using One Way Anova.

Results: Platelet count group K(999,40+138,502) higher than P3 (882,60+619,705), P2(843,40+130,378) and P1(839,20+155,046) has the lowest average compared to the group. One Way Anova test between control and treatment groups there were no significant differences ($p=0,85$, $p>0,05$).

Conclusions: there was no effect of noni juice in grading dosage on the amount of platelets on wistar mice which were exposed by cigarette smokes.

Keywords : *Morinda citrifolia* L, platelets, smoke cigarettes.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Prevalensi merokok telah meningkat di negara berkembang dan diperkirakan pada abad 21 sejumlah 1 milyar kematian disebabkan oleh penggunaan rokok.¹ Berdasarkan data WHO, terdapat 1,3 Milyar perokok di dunia dan sepertiganya berasal dari populasi global yang berusia 15 tahun ke atas serta 84% diantaranya berasal dari dunia ketiga.² Menurut *National Institute for Health and Clinical Excellence*, 24% perokok di Belanda adalah remaja usia 16 tahun dan prevalensinya akan meningkat menjadi 43% pada usia 20 sampai 34 tahun. Rokok dapat menyebabkan kanker paru dan diestimasikan 90% kematian akibat kanker paru di Amerika terjadi pada laki-laki dan 80% pada wanita.^{3,4} Di Indonesia diperkirakan bahwa konsumsi rokok setiap tahun mencapai 199 miliar batang rokok atau urutan ke-4 setelah RRC (1679 miliar batang), AS (480 miliar), Jepang (230 miliar), dan Rusia (230 miliar). Dalam 10 tahun terakhir konsumsi rokok di Indonesia mengalami peningkatan sebesar 44,1 %.⁵

Kandungan kimia tembakau yang sudah teridentifikasi jumlahnya mencapai 2.500 komponen, bereaksi dengan komponen lain dan membentuk komponen baru. Di dalam asap rokok kandungan yang berbahaya antara lain nikotin, karbon monoksida, tar dan eugenol untuk rokok kretek.^{6,7} Rokok tembakau dapat membentuk radikal bebas seperti *nitric oxide* (NO) yang akan memacu sintesis tromboksan sebagai agen *prothrombic* dan akan menghambat produksi prostasiklin sebagai *antithrombic*.⁸ Konsentrasi nikotin dalam plasma

akan meningkat 5 ng/ml hingga 24 ng/ml selama merokok dan < 1ng/ml jika tidak merokok.⁹ Konsentrasi nikotin dalam plasma yang meningkat akan memicu simpatis kemudian limpa akan melepaskan trombosit yang distimulus oleh *alfa adrenoceptor* sehingga jumlah trombosit dalam darah meningkat.¹⁰ Perubahan jumlah trombosit dan aktivasi trombosit ini akan meningkatkan risiko *cardiac ischaemia*.⁸ Menurut *Suwansaksri et al.*, tidak ada perbedaan yang signifikan jumlah trombosit dalam darah pada pria perokok dan tidak perokok.¹¹ Hasil observasi *Brummit et al.* menemukan tidak adanya hubungan antara jumlah trombosit dengan merokok pada orang yang sehat.¹² Namun pada penelitian yang dilakukan oleh *Chao et al.* menunjukkan adanya peningkatan jumlah trombosit pada pria perokok kronis dibandingkan dengan pria yang tidak merokok.¹³ Penelitian yang dilakukan *Butkiewicz et al.* Menunjukkan adanya peningkatan jumlah trombosit pada pria perokok dibanding pria yang tidak merokok walaupun secara statistik tidak signifikan.⁸

Thrombopoietin (TPO) merupakan faktor pertumbuhan dalam proliferasi dan maturasi megakariosit. Peningkatan produksi TPO didukung oleh limpa dan sumsum tulang.¹⁴ Konsentrasi TPO pada perokok lebih rendah daripada orang yang tidak merokok, namun menurunnya konsentrasi TPO ini tidak merefleksikan gangguan pada trombositopoiesis. Hal ini menunjukkan tingginya nilai *reticulated platelets* yang mengindikasikan percepatan restorasi platelet dan meningkatnya *platelet turnover*.⁸

Penelitian terdahulu dilaporkan bahwa NO endogen dan eksogen dapat menginduksi apoptosis pada megakariosit. Inhibisi dan tidak adanya *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) yang merupakan derivat dari NO akan menurunkan produksi trombosit dan berkurangnya trombosit dalam sirkulasi.¹⁵

Tumor Necrosis Factor α (TNF α) merupakan mediator proinflamasi yang diinduksi oleh NO dari asap tembakau. TNF α dan interferon yang lain dapat menstimulasi ataupun menghambat trombositopoiesis tergantung adanya sinyal lain. Regulator negatif dalam trombositopoiesis antara lain Interleukin 4 (IL- 4) dan PF-4.¹⁴

Hasil pemeriksaan 17 ekstrak tanaman yang digunakan sebagai tanaman obat Indian menunjukkan adanya kemungkinan efek pada regulasi NO dengan menggunakan *sodium nitroprusside* sebagai donor NO *in vitro*, *Morinda citrifolia* menunjukkan NO *scavenging* yang signifikan.¹⁶ *Morinda citrifolia* biasa digunakan sebagai minuman dalam bentuk jus, salah satu jus yang ada di pasaran yang digunakan adalah *Tahitian Noni Juice* (TNJ).

Menurut hasil penelitian *Hirazumi A et al*, *Morinda citrifolia* dapat menstimulasi pelepasan beberapa mediator seperti TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-12, *interferon-gamma* (IFN-gamma) dan NO namun tidak berpengaruh pada IL-2 dan mensupresi pengeluaran IL-4.¹⁷ Berdasarkan penelitian University of Hawaii, mengkudu dapat meningkatkan produksi NO dan mendorong pembukaan pembuluh darah yang menyempit.¹⁸

Pengaruh rokok terhadap nilai hitung trombosit dan adanya bahan kandungan antioksidan dalam jus mengkudu (*Morinda citrifolia*) masih menjadi kontroversi sehingga mendorong peneliti untuk mengetahui pengaruh rokok terhadap trombosit dan pengaruh jus mengkudu terhadap perubahan jumlah trombosit pada perokok.

1.2 Rumusan Masalah

Masalah yang mendasari penelitian ini adalah apakah pemberian jus mengkudu berpengaruh terhadap jumlah trombosit tikus wistar yang diberi paparan asap rokok ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan pengaruh pemberian dosis bertingkat jus mengkudu (*Morinda citrifolia L*) terhadap jumlah trombosit pada tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok.

1.3.2 Tujuan Khusus

Adapun tujuan khusus penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Membuktikan perbedaan jumlah trombosit pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok antara tikus wistar yang diberi jus mengkudu dosis bertingkat dengan yang tidak diberi jus mengkudu.
- b. Membuktikan perbedaan jumlah trombosit pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok antara kelompok yang diberi jus mengkudu dosis bertingkat.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai peran dan manfaat dari jus mengkudu sebagai minuman yang memiliki efek dalam mengatasi inflamasi terutama peningkatan trombosit akibat paparan asap rokok.

1.5 Orisinalitas Penelitian

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian yang sudah pernah dilakukan terdapat pada variabel tergantungnya, dimana belum ada penelitian yang melihat hubungan jus mengkudu dengan paparan asap rokok. Perbedaan yang kedua, sampel penelitian menggunakan tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*). Perbedaan ketiga adalah pada parameter yang diukur adalah jumlah trombosit.

Tabel 1. Penelitian yang telah dilakukan

Peneliti,Penerbit,Tahun	Judul Penelitian	Hasil Penelitian
Mian-Ying Wang, M Nawal Lutfiyya, Vicki Weidenbacher-Hoper, Gary Anderson, Chen X Su, and Brett J West. Chem Cent J. 2009; 3: 13.	Antioxidant activity of noni juice in heavy smokers	Perbandingan nilai post-test menunjukkan ada perbedaan yang signifikan antara laki-laki dan perempuan, serta antara kelompok dosis TNJ. Pengamatan terakhir menunjukkan ambang batas aktivitas antioksidan dicapai dengan dosis harian 29,5 ml. ¹⁹
Afa Kehaati Palu, Raevonne A. Santiago,Brett J.West, Norman Kaluhiokalani, Jarakae Jensen. American Chemical Society.ACSSymposium Series,Vol.993,September 19. 2008.	The Effects of <i>Morinda citrifolia</i> L. Noni on High Blood Pressure: Mechanistic investigation and case study	Efek mengkonsumsi TNJ (4 oz/hari) selama 30 hari secara signifikan menurunkan tekanan darah tinggi (rerata pretritmen 144/83), rerata posttritmen 132/46) terhadap 10 pasien yang didiagnosis mengalami hipertensi. ²⁰
Jamsai Suwansaksri, Viroj Wiwanitkit, dan Suphan Soogarun. Clin Appl Thrombosis/Hemostasis 10(3)-.287-288, 2004	Effect of Smoking on Platelet Count and Platelet Parameters: An Observation	Penelitian observasional 25 polisi perokok dan 5 polisi tidak perokok di Thailand, tidak ada perbedaan yang signifikan pada hitung trombosit antara perokok dan tidak perokok. ²¹

<p>Elisabeth Battinelli, Scott R. Willoughby, Thomas Foxall, C. Robert Valeri, and Joseph Loscalzo. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>. 2001;98(25):14458-63</p>	<p>Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide.</p>	<p>NO meningkatkan produksi trombosit pada saat tahapan akhir megakaryocytopoiesis.¹⁵</p>
<p>Elin Yulinah S., Nurul Fitriyani, Joseph I. Sigit Jurnal Kedokteran Maranatha .Vol 7, No 2 (2008)</p>	<p>Efek Antiagregasi Platelet Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L.), Rimpang Jahe Merah (Zingiber officinale var. Sunti Val.) dan Kombinasinya pada Mencit Jantan Galur Swiss Webster</p>	<p>Ekstrak mengkudu dosis 100 mg/kgbb, ekstrak jahe merah dosis 50mg/kgbb, kombinasi ekstrak mengkudu 100 mg/kgbb dan jahe merah 50mg/kgbb serta ekstrak mengkudu 50 dan ekstrak jahe merah 25mg/kgbb dapat meningkatkan waktu perdarahan, waktu koagulasi secara bermakna ($p < 0,05$).²²</p>
<p>Dipa Yuniharilmy. UNDIP.2011</p>	<p>Efek Vitamin E terhadap Jumlah Leukosit dan Neutrofil Tikus Wistar yang Leukositosis Setelah Diberi Paparan Asap Rokok</p>	<p>Jumlah total leukosit dan neurofil pada tikus wistar yang terpapar asap rokok yang diberi vitamin E lebih rendah secara bermakna dibanding detanpa pemberian vitamin E.²³</p>
<p>Herlisa Anggraini. UNDIP.2011</p>	<p>The Effect of Noni Juice on Nitric Oxide and Reactive Oxygen Intermediate Macrophages on Mice Exposed to Cigarette Smoke</p>	<p>Jus mengkudu memberikan hasil tidak ada perbedaan bermakna secara statistik terhadap produksi NO dan ROI makrofag bronchoalveoli pada tikus yang terpapar asap rokok.²⁴</p>

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Trombosit

2.1.1 Pembentukan Trombosit

Trombosit dihasilkan dalam sumsum tulang melalui fragmentasi sitoplasma megakariosit melalui rangsangan TPO. Megakariosit berasal dari megakarioblas yang timbul dari proses diferensiasi sel asal hemapoetik. Megakariosit mengalami pematangan dengan replikasi inti endomitotik yang sinkron, volume sitoplasma akan bertambah besar sejalan dengan bertambahnya lobus inti menjadi dua kali lipat. Pada stadium inti delapan, sitoplasma akan menjadi granular dan melepaskan trombosit. Setiap megakariosit akan menghasilkan 4000 trombosit. Interval waktu pada manusia untuk diferensiasi sel induk sampai produksi trombosit sekitar 10 hari. Umur trombosit dalam sirkulasi sekitar 10 hari, diameter trombosit rata-rata 1-2 μm dan volume sel rerata 5,8 fl. Hitung trombosit normal sekitar $2,5 \times 10^5 / \text{ml}$ (batas $1,5 - 3,5 \times 10^5 / \mu\text{l}$).²⁵⁻²⁷

Regulator utama trombositopoesis adalah TPO dan reseptornya MPL (CD110). MPL diekspresikan pada *Hematopoietic stem cells* (HSCs), megakariosit dan trombosit, pada tingkat yang berbeda dan menenukan aktivasi *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) *signal transduction pathway* (JAK2, STAT1, STAT3 dan STAT5). Pada tahun 1994, kloning dari gen TPO menunjukkan lokasinya pada kromosom 3. Beberapa penelitian menunjukkan hubungan antara tingkat TPO pada sirkulasi dan trombosit (reseptor MPL, selama hemostasis normal hitung trombosit stabil dan sirkulasi TPO pada

konsentrasi basal karena mengganti produksi di liver dan ginjal. Ikatan yang konstan dan degradasi oleh *MPL-expressing cells* merupakan mekanisme *clearance* dari TPO. Peningkatan TPO akan meningkatkan jumlah megakariosit dalam sumsum tulang dan limpa, peningkatan ukuran megakariosit dan peningkatan antigen marker spesifik serta peningkatan jumlah trombosit dalam sirkulasi darah 3-10 kali lipat.¹⁴

Beberapa kasus stres trombopoetik terdapat peningkatan produksi TPO didukung oleh limpa dan sumsum tulang. Mekanisme untuk mengontrol produksi TPO dengan cara meregulasi pemotongan TPO-mRNA.²⁸

IL-3 merupakan sitokin yang dihasilkan oleh limfosit T yang mampu merangsang trombositopoiesis. *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GMC-SF) mempunyai potensi yang kurang dibandingkan dengan IL-3 dalam menstimulasi progenitor megakariosit. *Stem Cell Factor* (SCF), IL-1, IL-6 dan IL-11 yang bukan merupakan *lineage-specific* dari megakariosit, dapat meningkatkan aktivitas faktor pertumbuhan lain dalam trombositopoiesis.²⁹ IL-11 dapat meningkatkan jumlah megakariosit dan jumlah trombosit dalam sirkulasi darah. IL-6 merupakan sitokin yang berperan dalam pematangan megakariosit yang berperan bersama IL-3 walaupun secara tidak langsung akan meningkatkan produksi TPO oleh hepar.^{28,30}

Trombosit yang beredar dalam sirkulasi darah merupakan hasil keseimbangan antara produksi trombosit di sumsum tulang dan distribusi serta distribusi pada darah tepi dan limpa. Trombositosis diakibatkan oleh produksi

trombosit yang meningkat dan perubahan pada penyimpanan di limpa, bukan disebabkan oleh umur trombosit yang memanjang.³⁰

Trombositosis dibedakan menjadi 2 yaitu trombositosis primer dan trombositosis sekunder(reaktif). Pada trombositosis primer terjadi gangguan pada komponen mieloproliferatif, contohnya trombositopenia esensial, mielofibrosis dengan mieloid metaplasia, polisitemia vera, leukemia mielositik akut / kronik.^{31,32} Trombositosis sekunder terjadi karena adanya peningkatan kadar sitokin, katekolamin, IL-6, IL-1 yang diproduksi dalam keadaan inflamasi akut, infeksi, neoplasma, atau pada keadaan stress. Adanya peningkatan sitokin akan meningkatkan produksi TPO di hati dan meningkatkan produksi trombosit. Trombositosis sekunder bersifat sementara dan akan menurun ketika stimulus primer berhenti.³³⁻³⁵

2.1.2 Struktur Trombosit

Trombosit merupakan fragmen-fragmen sel granular, berbentuk cakram dan tidak berinti yang merupakan unsur seluler sumsum tulang terkecil.²⁵ Diameter trombosit sekitar 2 μ m dengan volume 8 fl. Dengan menggunakan mikroskop elektron, trombosit yang inaktif berbentuk cakram datar dengan kontur yang halus, sistem saluran terbuka dan permukaannya terhubung dengan sistem kanalikuli. Struktur trombosit dibagi menjadi empat area yaitu permukaan trombosit, struktur membran, *cytoskeleton* dan *granules*.

Pada permukaan trombosit terdapat membran plasma, *glycolipid-enrich membrane domains* (GEMs), dan *glycocalyx*. Membran plasma memisahkan intra dan ekstrasel, mempunyai komposisi, distribusi dan fungsi yang sangat kompleks,

menggabungkan sejumlah glikoprotein dan lipid menjadi fosfolipid bilayer yang mengintegrasikan kondisi ekstra dan intrasel seperti permeabilitas, stimulasi agonis, adhesi trombosit dan agregasi. GEMs mengandung banyak kolesterol, sphingolipid, dan asam lemak jenuh rantai panjang . *Glycocalyx* mengandung glikoprotein, glikolipid, mukopolisakarida, dan protein plasma yang teradsorpsi.

Membran trombosit terdiri dari *surface-connected canalicular system* (SCSS) dan *dense tubular system* (DTS). SCSS merupakan membran reservoir internal yang memfasilitasi penyebaran trombosit dan pembentukan filopodia setelah adhesi serta sebagai reservoir untuk membran glikoprotein seperti gpIIb-IIIa yang meningkat pada permukaan trombosit setelah aktivasi. Berbeda dengan SCSS, DTS merupakan sistem tertutup yang sempit dan tubulus yang limit dengan diameter 40 – 60 nm.

Cytoskeleton terdiri atas protein yang dapat dibentuk menjadi *fibrous element* yaitu mikrotubulus dan mikrofilamen. Mikrofilamen berperan dalam mekanisme kontraktile trombosit. Mikrotubulus membentuk lingkaran pada ekuator dan menjaga bentuk cakram trombosit.

Zona *Granules* dan organel berisi berbagai organel yang tersebar pada trombosit dan akan berkumpul di tengah jika trombosit dalam keadaan aktif. *Granules* yang disekresi adalah α -*granules* dan *dense bodies* yang merupakan efektor utama yang mengandung ADP dan fibrinogen.³⁶

2.1.3 Fungsi Trombosit

Peran trombosit dalam hemostasis antara lain berperan dalam proses adhesi pada jaringan subendotel, memicu agregasi pada tempat terjadinya kerusakan pembuluh darah, memacu proses koagulasi pada permukaan fosfolipid. Selain itu trombosit juga berperan melepaskan substansi biokimia yang penting dalam hemostasis dan menginduksi terjadinya retraksi bekuan³⁷

2.2 Rokok

Rokok adalah hasil olahan tembakau terbungkus termasuk cerutu atau bentuk lainnya yang dihasilkan dari tanaman *Nicotiana tabacuni*, *Nicotiana rustica* dan spesies lainnya atau sintetisnya yang mengandung nikotin dan tar dengan atau tanpa bahan tambahan.³⁸

Rokok berdasarkan bahan baku atau isi terbagi dalam kategori: 1) rokok putih, yaitu rokok dengan bahan baku hanya daun tembakau yang diberi saus untuk mendapatkan efek rasa dan aroma tertentu; 2) rokok kretek, yaitu rokok dengan bahan baku berupa daun tembakau dan cengkeh yang diberi saus untuk mendapatkan efek rasa dan aroma tertentu; 3) rokok klembak, yaitu rokok dengan bahan baku berupa daun tembakau, cengkeh, dan kemenyan yang diberi saus untuk mendapatkan efek rasa dan aroma tertentu.³⁹

Rokok berdasarkan penggunaan filter dibagi menjadi dua yaitu rokok filter dan rokok non filter. Rokok filter adalah rokok yang pada bagian pangkalnya terdapat gabus sedangkan rokok non filter adalah rokok yang pada bagian pangkalnya tidak terdapat gabus. Rokok non filter biasa disebut juga rokok kretek, tidak adanya gabus pada pangkal rokok kretek menyebabkan asap yang dihasilkan

lebih banyak dari rokok filter karena tidak terdapat filter yang mengurangi asap yang keluar dari rokok.⁴⁰

Asap rokok atau *Environmental Tobacco Smoke* (ETS) mengandung komponen gas dan komponen partikel. ETS terdiri dari asap utama (*mainstream smoke*) yang berasal dari mulut perokok dan asap sampingan (*sidestream smoke*) yang dihasilkan dari sudut rokok yang dibakar. Asap sampingan merupakan komponen utama dari ETS yang hampir seluruhnya fase gas dan setengah dari kontaminannya adalah partikel.^{41,42}

Rokok mengandung lebih dari 4000 partikel yang sangat berbahaya bagi metabolisme sel seperti adalah tar, nikotin, dan CO. Selain itu juga mengandung bahan – bahan kimia beracun antara lain: *Hydrogen Cyanide, Ammonia, Toluene, Acetone, Methanol, Napthalene, Vinyl Chloride, Dimethylnitrosamine, Arsenic, DDT, Urethane, Dibenzacridine, Pyrene, Cadmium, Benzopyrene, Naphthylamin, Butane, Phenol, Polonium-210 dan Toluidine.*^{2,43,44}

Asap rokok merupakan campuran lebih dari 4700 senyawa kimia termasuk oksidan dengan konsentrasi tinggi yaitu 10^{14} molekul per hisapan. Radikal bebas banyak terdapat pada tar dan gas dari asap rokok. Gas asap rokok mengandung sekitar 10^{15} radikal per *puff*, terutama alkil dan peroksil.⁴⁵

2.2.1 Bahan-Bahan Yang Terkandung Dalam Rokok

2.2.1.1 Tar

Tar adalah sejenis cairan kental berwarna coklat tua atau hitam yang merupakan substansi hidrokarbon. Kadar tar dalam rokok antara 0.5 – 35 mg/ batang. Rokok yang mengandung tar 22 mg/ batang disebut *high-tar cigarettes*,

15 – 21/ batang mg disebut *medium-tar cigarettes*, dan kurang dari 7 mg/ batang disebut *low-tar cigarettes*.^{2,46}

Rokok yang menggunakan filter dapat mengalami penurunan kandungan tar sekitar 5-15 mg. efek karsinogenik tetap bisa masuk dalam paru-paru walaupun rokok diberi filter. Kadar tar meningkat saat rokok dibakar dan hembusan terakhir dari rokok mengandung tar 2x lebih banyak dari hembusan yang pertama.^{2,47}

2.2.1.2 Karbon Monoksida

CO adalah gas beracun yang tidak berwarna dan tidak berbau yang merupakan hasil pembakaran tidak sempurna dari bahan yang mengandung karbon. Dalam rokok terdapat CO sejumlah 2%-6% pada saat merokok.^{47,48}

CO mempunyai kemampuan untuk berikatan kuat dengan hemoglobin sehingga dapat mengganggu transportasi O₂.⁴⁹ Perokok pasif mempunyai level CO-Hb yang lebih tinggi dibandingkan dengan orang yang tidak merokok.⁵⁰ CO yang dihisap oleh perokok paling rendah sejumlah 400 ppm sudah dapat meningkatkan kadar karboksihemoglobin dalam darah sejumlah 2-16%.⁴⁷

2.2.1.3 Nikotin

Kandungan nikotin dalam rokok bervariasi tiap mereknya, berkisar 1.8-41.3 mg/g tiap rokok dengan rata-rata 8.32 mg/g. Konsentrasi nikotin dalam darah juga bervariasi yaitu sekitar 4 – 72 ng/ml dengan rata-rata 33ng/ml.⁵¹ Nikotin dalam darah dapat mencapai otak dalam waktu 10 detik.⁵²

Menurut penelitian yang dilakukan Dewi Susanna *et al* menunjukkan bahwa kandungan nikotin dalam rokok kretek lebih besar dari rokok filter. Nikotin yang terdapat dalam asap rokok arus samping 4–6 kali lebih besar dari asap rokok arus utama.⁴⁰

Nikotin menyebabkan ekskresi katekolamin dalam darah meningkat. Hal ini akan meningkatkan denyut jantung, tekanan darah, dan konstriksi pembuluh darah perifer.⁵³ NO endogen dirangsang oleh nikotin yang kemudian akan meningkatkan tingkat dopamin post sinaps.⁵⁴

Tabel 2. Kadar nikotin dan karbon monoksida dari beberapa merk rokok.⁵⁵

Merk Rokok	<i>Particulate</i> (mg)	Nikotin* (mg)	Karbon monoksida (mg)
Djarum	53,7	5,07	19,5
Dji Sam Soe	40,7	5,31	23,0
Gudang Garam	52,0	5,28	18,2
Wismilak	48,3	5,10	19,7
Australian Brand	17,0	1,1	14,2

**nilai rata-rata.*

2.2.2 Hubungan Rokok dengan Jumlah Trombosit

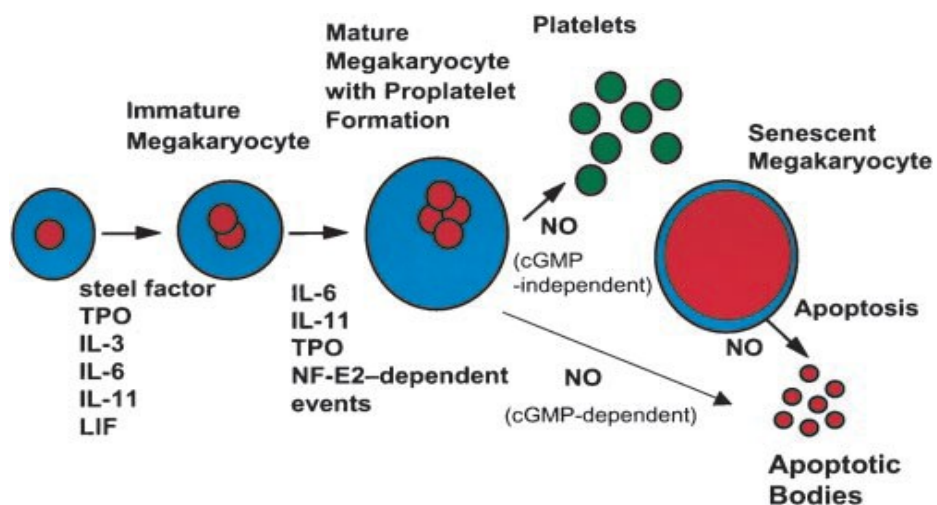
Merokok mempunyai efek buruk membentuk radikal bebas yang kemudian akan memecah NO.⁸ NO merupakan radikal bebas heterodiatom yang bertanggung jawab dalam vasoregulator dan fungsi homeostatis sel endotel. NO endogen dan eksogen juga dapat menginduksi apoptosis pada megakariosit. Dari beberapa penelitian disebutkan bahwa produksi NO akan terganggu oleh merokok.^{15,56}

Merokok dapat meningkatkan produksi superoksida vaskular yang menyebabkan penurunan NO dan secara bersamaan akan meningkatkan siklooksigenase dan *eicosanoid* vasokonstriksi.⁵⁷

Berdasarkan penelitian Molnar *et al.* dengan memblokir sintesis NO pada hewan dengan NOS inhibitor yaitu L-nitroarginin secara intravena menunjukkan penurunan jumlah trombosit sebesar 50% dibandingkan dengan kontrol yang diinjeksi saline.¹⁵

Menurut penelitian Nagase *et al.* tidak adanya iNOS derivat dari NO berasosiasi dengan menurunnya produksi trombosit yang kemudian juga akan menurunkan jumlah trombosit pada sirkulasi.¹⁵

NO berperan pada fase terminal megakariositopoiesis yaitu khususnya pada proses pelepasan trombosit. Namun sebelumnya juga terdapat peran TPO sebagai faktor pematangan penting. Lupia *et al* mengatakan bahwa perokok mempunyai level TPO yang lebih tinggi dibandingkan bukan perokok dan akan meningkatkan aktivasi trombosit.⁵⁸



Gambar 1. *Determinants of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis.*¹⁵

2.3 Mengkudu (*Morinda citrifolia* L)

2.3.1 Deskripsi Tanaman

Morinda citrifolia L merupakan tanaman tropis yang sudah dipercaya sebagai tanaman obat-obatan dan makanan sejak Polynesian bermigrasi ke Asia Tenggara 2000 tahun yang lalu.⁵⁹ Menurut H.B. Guppy, kira-kira 60 persen dari 80 spesies *Morinda* tumbuh di pulau-pulau besar maupun kecil, di antaranya Indonesia, Malaysia dan pulau-pulau yang terletak di Lautan India dan Lautan Pasifik. Hanya sekitar 20 spesies *Morinda* yang mempunyai nilai ekonomis, antara lain: *Morinda bracteata*, *Morinda officinalis*, *Morinda fructus*, *Morinda tinctoria* dan *Morinda citrifolia*. *Morinda citrifolia* adalah jenis yang paling populer, sehingga sering disebut sebagai "Queen of The *Morinda*". Spesies ini mempunyai nama tersendiri di setiap negara, antara lain Noni di Hawaii, Nonu atau Nono di Tahiti, Cheese Fruit di Australia, Mengkudu, Pace di Indonesia dan Malaysia.

Filum: Angiospermae, Sub filum: Dycotiledones, Divisi: Lignosae, Famili: Rubiaceae, Genus: *Morinda*, Spesies: *Morinda citrifolia*.⁶⁰



Gambar 2. *Morinda citrifolia* ⁶¹

Ciri umum mengkudu:

- a. Pohon, tinggi 4-6 m, batang bengkok-bengkok, dahan kaku, akar tunggang, kulit batang coklat keabu-abuan atau coklat kekuningan, berlekah dangkal, tidak berbulu, anak cabang bersegi empat.
- b. Berdaun tebal hijau mengkilap letak berhadap-hadapan, ukuran besar, tebal dan tunggal, bentuk jorong lanset, ukuran 15-50x5-17 cm, tepi daun rata, ujung lancip-lancip pendek, pangkal daun bentuk pasak, urat daun menyirip, warna hijau mengkilap, tidak berbulu, ukuran daun penumpu bervariasi, bentuk segitiga lebar.
- c. Perbungaan tipe bonggol bulat, bergagang 1-4cm, tumbuh di ketiak daun penumpu, bentuk corong, panjang 1,5 cm, putih dan harum.
- d. Buah bulat lonjong sebesar telur ayam diameter mencapai 7,5-10 cm, permukaan terbagi dalam sel-sel poligonal berbintik dan berkulit, awal warna hijau kemudian menjadi putih kekuningan, setelah matang putih transparan dan lunak, aroma seperti keju busuk karena percampuran asam kaprik dan asam kaproat, berbau tengik dan berasa tidak enak, diduga kedua senyawa ini bersifat aktif sebagai antibiotik.⁶²

2.3.2 Kandungan Mengkudu

Zat-zat penting yang terkandung pada setiap bagian tanaman mengkudu, antara lain;

- 1) akarnya, mengandung: alizarin, *chlororubin*, *damnacanthal*, *hexose*, *morindadiol*, *morindanigrine*, *morindine*, *morindone*, *mucilaginous matter*, *mormanda-canthal*, *pentose*, *rubiadine*, *soranjidiol*, *sterols*, *antraquinone*, *glycoside*;

2) buahnya, mengandung: *glucoside, acetic acid, benzoic acid, alcohol benzol, asam butanoit, ethyl decanoate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl palmiate, eugenol, glukosa, asam heptanoat, hexanal, hexanamide, lenoleic acid, polisaccaride, potassium, scopoletin, selenium, sodium, xeronine, asperulosidic acid, ascorbic acid, calcium, L-arginine, iron, thiamin, beta caroten, macin, alanin;*

3) daunnya, mengandung: *ascorbic acid, calcium, iron, thiamin, beta caroten, macin, alanine, L-arginine, aspartic acid, citrifolinoside A, cystein, cystine, glutamic acid, glycine, histidin, isoleucine, methionine, phenylalanine, proline, riboflavine, serine, threonine, tryptophane, valine, beta-cytosterol.*⁶²

Kandungan mengkudu antara lain:

a. Zat nutrisi.

Nutrisi yang terdapat dalam mengkudu seperti protein, vitamin, mineral yang tersedia dalam jumlah cukup pada buah dan daun, salah satunya adalah selenium yang berfungsi sebagai antioksidan.⁶²

b. Terpenoid.

Terpenoid merupakan senyawa hidrokarbon isometrik terdapat pada lemak esensial, dapat membantu tubuh dalam proses sintesis organik dan pemulihan sel-sel tubuh.⁶²

c. Zat anti bakteri

Aktivitas antibakteri *acubin, L-asperuloside, dan alizarin* dalam buah mengkudu, serta beberapa antrakinon dalam akar mengkudu, semua terbukti sebagai agen antibakteri. Senyawa ini telah ditunjukkan dapat melawan strain

bakteri menular seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgaii*, *Staphylococcus Staphylococcus*, *Baciillis subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, dan *Shigela*.⁵⁹

d. *Scolopetin*

Menurut Neil Solomon, *scolopetin* adalah senyawa fitonutrien yang dapat mengikat serotonin dan berfungsi memperlebar saluran pembuluh darah yang mengalami penyempitan. *Scolopetin* dapat bekerja secara sinergis dengan netraceuticals lain untuk mengatur tekanan darah tinggi menjadi normal, tetapi tidak menurunkan tekanan darah yang sudah normal. Menurut Harrison, *scolopetin* dapat meningkatkan kelenjar pineal di dalam otak, yang kemudian digunakan untuk menghasilkan hormon melatonin, dimana serotonin akan berperan sebagai neurotransmitter dan prekursor hormon melatonin. *Scolopetin* juga bersifat fungisida, misalnya terhadap *Pythium, sp.*⁶²

e. *Damnacanthal*

Jurnal Cancer Letter (1993) melaporkan penemuan zat aktif kanker (*damnacanthal*) dalam ekstrak mengkudu yang mampu menghambat pertumbuhan sel-sel kanker . Berdasarkan penelitian yang dilakukan di Universitas Hawaii, sari buah mengkudu dapat menghambat sel tumor dengan cara merangsang kekebalan tubuh.⁶²

f. *Xeronine dan Proxeronine*

Heinicke, menyatakan bahwa buah mengkudu mengandung prekursor alami untuk *xeronine* yang bernama *proxeronine*. *Proxeronine* diubah menjadi *xeronine alkaloid* di dalam tubuh bersama dengan enzim disebut

proxeroninase yang mampu memodifikasi molekul struktur protein. *Xeronine* dalam mengkudu dapat membantu mengatasi tekanan darah tinggi, kram menstruasi, arthritis, bisul lambung, keseleo, cedera, mental depresi, pikun, pencernaan yang buruk, ketergantungan obat, dan rasa sakit.⁵⁹

g. Antioksidan

Asam askorbat, beta karoten, alkaloid, terpenoid, beta sitosterol, karoten, dan polifenol seperti flavonoid, flavon glikosida, rutinosa, dll. Mengkudu juga mengandung asam kaproat, asam kaprik dan asam kaprilat. Asam kaproat dan asam kaprik yang menyebabkan bau busuk yang tajam ketika mengkudu masak, sedangkan asam kaprilat membuat rasa buah tidak enak.^{63,64}

h. Polisakarida

Galaktosa, arabinosa, rhamnosa dan asam glukoronat.⁶⁴

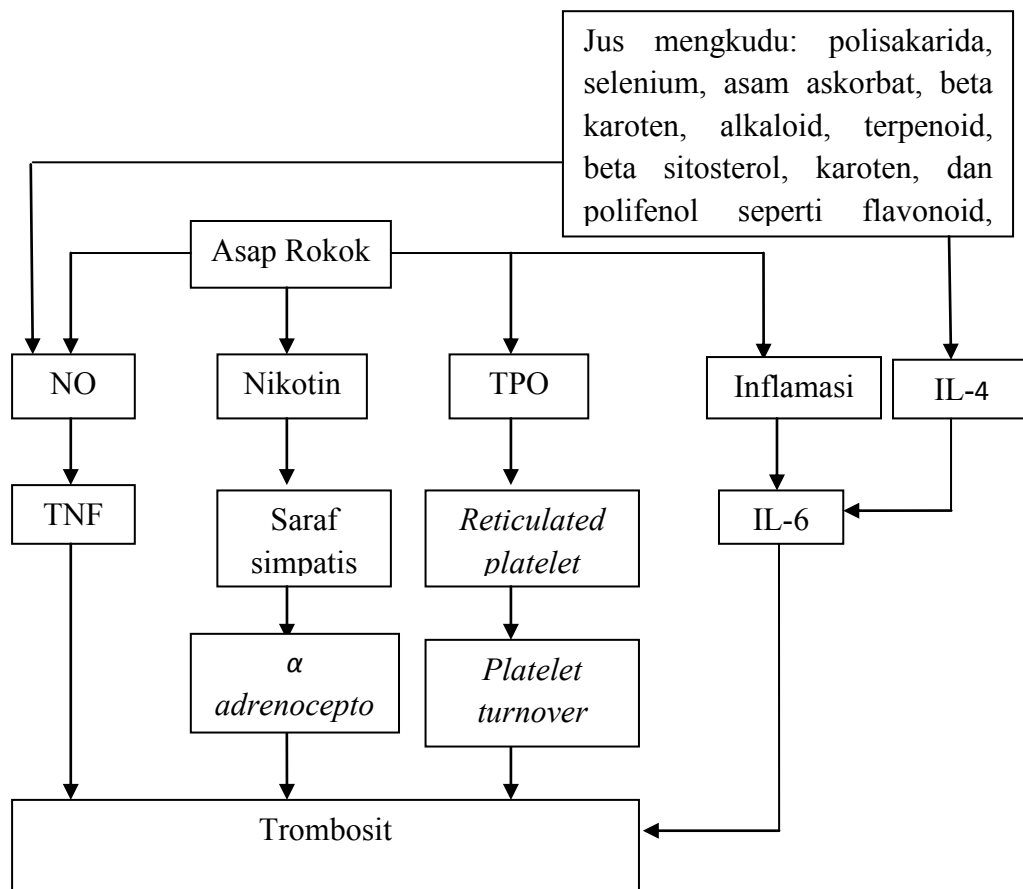
2.3.3 Hubungan Mengkudu dengan Jumlah Trombosit

Menurut hasil penelitian *Hirazumi A et al*, *Morinda citrifolia* dapat menstimulasi pelepasan beberapa mediator seperti TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-12, *interferon-gamma* (IFN-gamma) dan NO namun tidak berpengaruh pada IL-2 dan mensupresi pengeluaran IL-4.¹⁷ Regulator negatif dalam trombositopoesis antara lain Interleukin 4 (IL- 4) dan PF-4.¹⁴ IL-4 dihasilkan oleh Th-2 yang menghambat mediator inflamasi seperti IL-1, IL-6, TNF- α .⁶⁵ Penelitian terdahulu dilaporkan bahwa NO endogen dan eksogen dapat menginduksi apoptosis pada megakariosit. Inhibisi dan tidak adanya *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) yang merupakan derivat dari NO akan menurunkan produksi trombosit dan berkurangnya trombosit dalam sirkulasi.¹⁵

BAB III

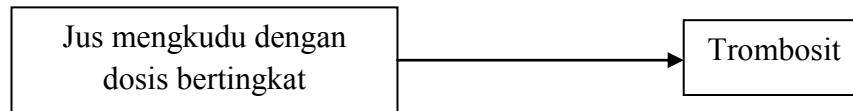
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka Teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka Konsep

3.3 Hipotesis

Hipotesis mayor pada penelitian ini adalah terdapat pengaruh pemberian dosis bertingkat jus mengkudu (*Morinda citrifolia L*) terhadap jumlah trombosit pada tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi paparan asap rokok.

Hipotesis minor pada penelitian ini sebagai berikut :

- a. Terdapat perbedaan jumlah trombosit pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok antara tikus yang diberi jus mengkudu dosis bertingkat dengan yang tidak diberi jus mengkudu.
- b. Terdapat perbedaan jumlah trombosit pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok antara kelompok yang diberi jus mengkudu dosis bertingkat.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

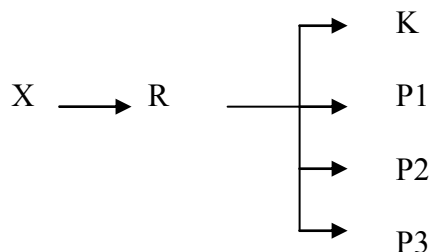
Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah Ilmu Histologi, Patologi Klinik dan Farmakologi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat pemeliharaan dan intervensi hewan coba akan dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang selama 30 hari, sedangkan tempat pemeriksaan trombosit akan dilaksanakan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Semarang .

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *the post test only-control group*, yang menggunakan hewan coba sebagai obyek penelitian. Perlakuan berupa pemberian jus mengkudu pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok. Parameter pengukuran variabel berupa produksi trombosit.



Keterangan :

X → R : masa adaptasi selama 1 minggu

R : randomisasi

K : Kontrol, tikus wistar diberi pakan standard, dan paparan asap rokok kretek dua kali dalam sehari, pagi dan sore selama 30 hari, tanpa pemberian jus mengkudu.

P1 : Perlakuan 1, tikus wistar diberi pakan standard, diberi paparan asap rokok kretek dua kali dalam sehari, pagi dan sore selama 30 hari. 30 menit setelah diberi paparan asap rokok dilakukan pemberian jus mengkudu dengan dosis 1 ml/ hari melalui sonde.

P2 : Perlakuan 2, tikus wistar diberi pakan standard, diberi paparan asap rokok, kretek dua kali dalam sehari, pagi dan sore selama 30 hari. 30 menit setelah diberi paparan asap rokok dilakukan pemberian jus mengkudu dengan dosis 1 ml/ hari melalui sonde.

P3 : Perlakuan 3, tikus wistar diberi pakan standard, diberi paparan asap rokok kretek dua kali dalam sehari, pagi dan sore selama 30 hari. 30 menit setelah diberi paparan asap rokok dilakukan pemberian jus mengkudu dengan dosis 1 ml/ hari melalui sonde.

4.4 Populasi dan Sampel Penelitian

4.4.1 Populasi

Populasi penelitian ini adalah tikus wistar yang diberi paparan asap rokok.

4.4.2 Sampel Penelitian

Sampel adalah bagian dari populasi yang memenuhi kriteria penelitian.

Kriteria penelitian adalah sebagai berikut:

4.4.2.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi meliputi :

- 1) Tikus galur murni wistar
- 2) Jenis kelamin jantan
- 3) Umur 15 minggu
- 4) Berat badan 180 - 220 gram
- 5) Sehat dan aktif selama pemberian paparan asap rokok

4.4.2.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi meliputi :

- 1) Tikus sakit selama masa adaptasi
- 2) Tikus mati selama masa perlakuan

4.4.3 Cara Sampling

Cara sampling pada penelitian ini adalah secara randomisasi atau acak.

4.4.4 Besar Sampel

Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan WHO⁶⁶, minimal 5 ekor per kelompok yang diambil secara acak / randomisasi. Sampel dibagi dalam 4 kelompok yaitu kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan dengan jumlah sampel 5 ekor tiap kelompok, sehingga jumlah yang dibutuhkan adalah 20 ekor.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas :

- Jus mengkudu

4.5.2 Variabel tergantung:

- Jumlah trombosit

4.6 Definisi Operasional

1. Pemberian jus mengkudu adalah pemberian *Tahitian Noni Juice* (TNJ) atau jus mengkudu melalui sonde yang diberikan 30 menit setelah diberi paparan asap rokok dengan dosis; pada kelompok 1 sejumlah 1 ml/hari; kelompok 2 sejumlah 2 ml/hari; kelompok 3 sejumlah 4 ml / hari selama 30 hari.

Skala : Rasio

2. Jumlah trombosit adalah trombosit dalam cairan darah retroorbita yang diukur menggunakan Hema analyzer.

Skala : Rasio

3. Asap rokok adalah asap rokok kretek tanpa filter yang dipaparkan dengan dosis 2 batang dalam sehari, pada jam 09.00 dan jam 15.00 wib selama 30 hari.

Pemeriksaan variabel jumlah trombosit dilakukan oleh peneliti dan dibantu analis yang berpengalaman dari Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Semarang.

4.7 Cara Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah tikus galur wistar (*Rattus norvegicus*), *Tahitian Noni Juice* (TNJ), pakan standard untuk tikus galur wistar, rokok kretek merk Dji Sam Soe tanpa filter, darah retroorbita, larutan Na₂EDTA 10%.

4.7.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah kandang hewan, sonde lambung, botol vial, tabung kapiler, Hema analyzer.

4.7.3 Cara Kerja

4.7.3.1 Prosedur Pengumpulan Data

Cara pengumpulan data meliputi langkah-langkah sebagai berikut :

- 1) Sampel diadaptasi selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standard.
- 2) Dilakukan pengelompokan dengan acak sederhana, 20 ekor tikus wistar dibagi dalam 4 kelompok.
- 3) Kelompok K diberi pakan standard, paparan asap rokok dengan dosis 2 batang dalam sehari, pada jam 09.00 dan 15.00 wib selama 30 hari. Hari ke 31, darah retroorbita tikus wistar diambil untuk dilakukan pemeriksaan jumlah trombosit.
- 4) Kelompok P1 diberi pakan standard, paparan asap rokok dengan dosis 2 batang dalam sehari, pada jam 09.00 dan 15.00 wib. 30 menit setelah diberi paparan asap rokok dilakukan pemberian jus mengkudu dengan dosis 1

ml/hari melalui sonde selama 30 hari. Hari ke 31, darah retroorbita tikus wistar diambil untuk dilakukan pemeriksaan jumlah trombosit.

- 5) Kelompok P2 diberi pakan standard, paparan asap rokok dengan dosis 2 batang dalam sehari, pada jam 09.00 dan 15.00 wib. 30 menit setelah diberi paparan asap rokok dilakukan pemberian jus mengkudu dengan dosis 2 ml/hari melalui sonde selama 30 hari. Hari ke 31, darah retroorbita tikus wistar diambil untuk dilakukan pemeriksaan jumlah trombosit.
- 6) Kelompok P3 diberi pakan standard, paparan asap rokok dengan dosis 2 batang dalam sehari, pada jam 09.00 dan 15.00 wib. 30 menit setelah diberi paparan asap rokok dilakukan pemberian jus mengkudu dengan dosis 4 ml/hari melalui sonde selama 30 hari. Hari ke 31, darah retroorbita tikus wistar diambil untuk dilakukan pemeriksaan jumlah trombosit.

4.7.3.2 Cara Pemaparan Asap Rokok

Hewan coba ditempatkan dalam kandang hewan sesuai dengan kelompoknya. Pada saat akan diberi paparan asap rokok, hewan coba dipindahkan dalam kandang khusus berupa kotak yang di dalamnya terdapat jeruji pembatas untuk memisahkan hewan coba dengan ujung rokok yang terbakar, sehingga hewan coba dapat secara langsung terkena paparan asap rokok tersebut. Kotak perlakuan memiliki dua lubang, dimana fungsi lubang pertama; sebagai jalan arus pengeluaran asap yang dipaparkan, sedangkan fungsi lubang kedua; untuk memasukkan ujung rokok yang dibakar. Adapun asap rokok dihembuskan berulang kali dengan bantuan spuit sampai rokok habis terbakar. Asap rokok diberikan dua kali setiap hari, pada jam 09.00 dan jam 15.00 wib.

4.7.3.3 Prosedur Pengukuran Jumlah Trombosit

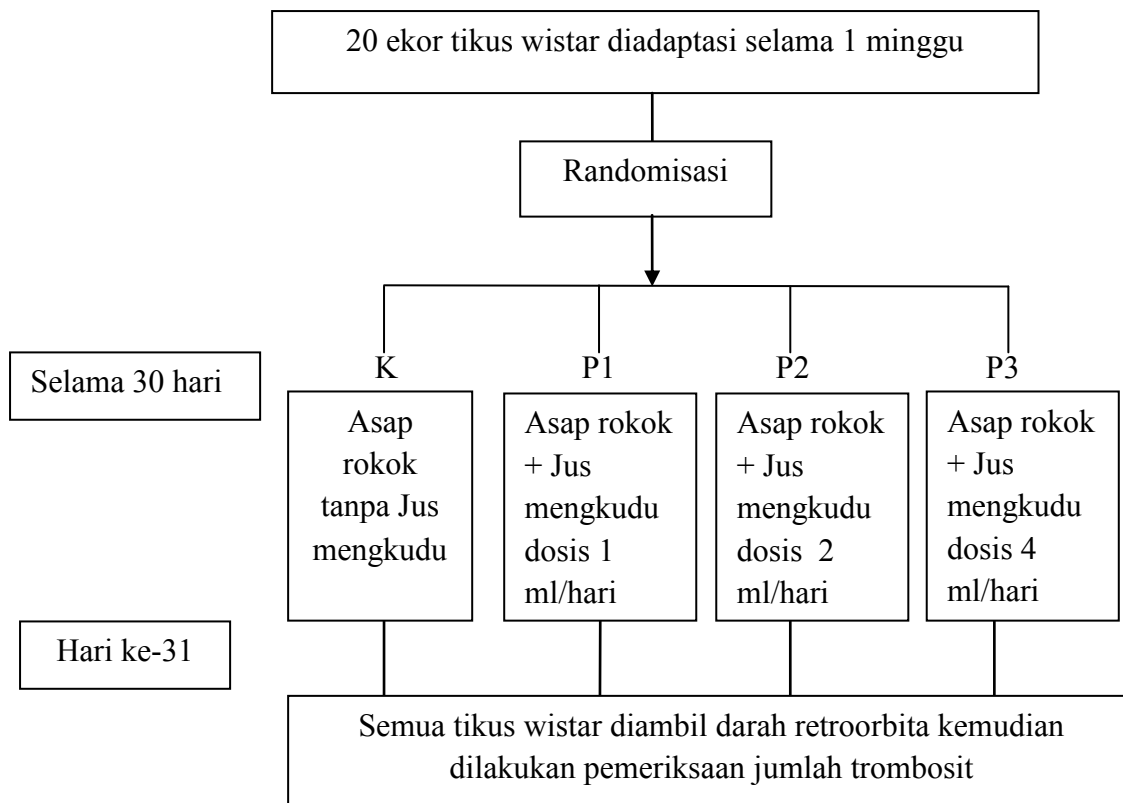
1. Persiapan sebelum menyalakan alat
 - a. Periksa volume reagen
 - b. Periksa cairan reagen (keruh atau kotor)
 - c. Periksa seluruh selang (bila terdapat tekukan)
 - d. Periksa botol pembuangan, jika penuh kosongkan kembali
2. Menyalakan alat
 - a. Tekan tombol power pada bagian belakang, posisi ON (I). Tunggu proses inialisasi 4-7 menit, hingga pada layar tampil menu [count].
 - b. Apabila pada 'error message' muncul tulisan 'Background Abnormal', maka tekan [MENU] lalu masuk ke [SERVICE] dan pilih [MAINTENACE]. Lakukan [CLEAN BATH]. Setelah proses itu selesai, kembali ke [COUNT] dan alat bias langsung dioperasikan (running).
 - c. Apabila Background Normal, maka tidak perlu melakukan prosedur di atas.
3. Whole blood count
 - a. Tekan tombol [MENU] → "Count" → Enter, lalu tekan tombol [MODE] maka pada layar atas muncul meriksaan dengan metode ("Whole Blood-ALL", "WB-WBC/HGB", atau "WB-RBC/PLT") dengan display warna biru.
 - b. Tekan tombol [F1] untuk mengisi atau menuliskan data pasien.

- c. Kocok antikoagulan dengan cara membolak-balikan tabung hingga merata, dengan perbandingan dosis K2EDTA (1,5 – 2,2 mg/ml darah)
 - d. Masukkan antikoagulan pada sampel probe hingga menyentuh ke dasar tabung.
 - e. Lalu tekan tombol probe, dan hasil akan tampil di layar.
4. Capillary blood count
- a. Tekan tombol [MENU] → “Count” → Enter, lalu tekan tombol [MODE] maka pada layar atas muncul meriksaan dengan metode (“Prediluted-ALL”, “PB-WBC/HGB”, atau “PB-RBC/PLT”) dengan display warna biru.
 - b. Siapkan sampel cup yang bersih pada ujung sampel probe, lalu tekan tombol [DILUENT], maka cairan Diluent akan keluar sebanyak 1,6 ml.
 - c. Tambahkan segera 20 ul darah kapiler dengan menggunakan pipet pada sampel cup yang telah terisi Diluent. Pastikan darh kapiler pada pipet telah terampur keseluruhan dengan Diluent (ulangi beberapa kali aspirating dan dispensing pada pipet).
 - d. Kocok hingga rata, lalu inkubasi selama 5 menit, lalu kocok kembali dan letakkan sampel cup yang sudah tercampur pada sampel probe hingga menyentuh dasar probe.
 - e. Tekan tombol probe untuk proses perhitungan. Dan hasil akan tampil pada layar.

5. Mematikan alat

Tekan tombol [MENU] → “Shutdown” → Enter, jika benar ingin mematikan alat pilih YES lalu Enter. Muncul perintah pada layar untuk menghisapkan “E-Z Cleanser” pada probe lalu tekan tombol probe. Proses mematikan alat akan bekerja. Sampai muncul “Turn Off theAnalyzer Now” maka matika tombol power di belakang alat.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan *editing*, *coding*, dan *entry* dalam *file* komputer. Setelah dilakukan *clearing*, data dianalisis secara statistik dengan bantuan program SPSS 16.0.

Analisis data menampilkan nilai rerata dan simpang baku dari variabel tergantung produksi trombosit, hasil ditampilkan dalam Box-Plot. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilks*. Data yang terdistribusi normal dilakukan uji *One Way Anova* dan tidak dilanjutkan *post hoc test Bonferroni* karena nilai signifikansi $p > 0,05$.

4.10 Etika Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba yang dipelihara pada kandang yang memadai dan diberi makan minum secara cukup dengan pakan standard. Sampel pemeriksaan menggunakan darah retroorbita hewan coba yang dibantu oleh analis yang berpengalaman.

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Herlisa Anggraini dengan judul Pengaruh Pemberian Jus Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) terhadap *Nitric Oxide* (NO) dan *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) Makrofag Tikus yang Terpapar Asap Rokok yang telah mendapatkan persetujuan *ethical clearance* dari Komisi Etika Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro – RSUP Dr Kariadi Semarang.

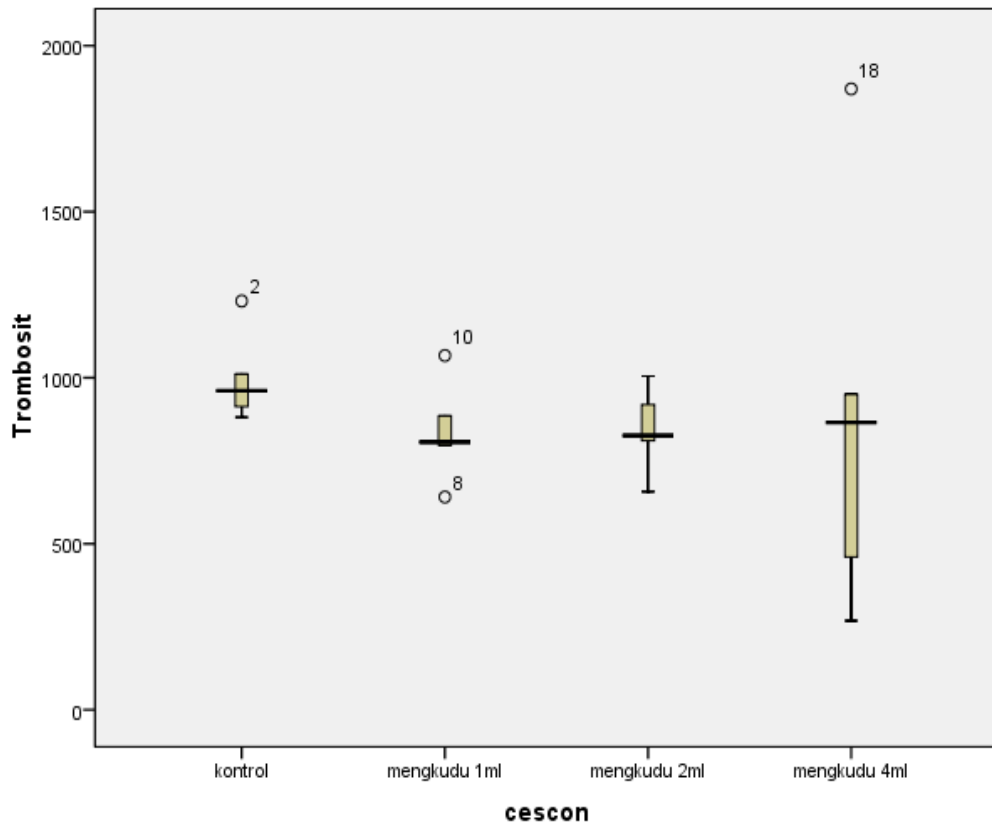
BAB V

HASIL PENELITIAN

Berdasarkan kriteria inklusi yang memenuhi didapatkan 20 ekor tikus yang memenuhi syarat. Dalam perjalanan penelitian selama 30 hari, didapatkan beberapa tikus mati. Tikus mati tersebut dikeluarkan dari penelitian, sehingga jumlah tikus pada akhir penelitian 20 ekor, yaitu masing-masing 5 ekor pada kelompok K, P1, P2, dan P3. Data yang diambil adalah jumlah trombosit dari masing-masing kelompok.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Jumlah Trombosit pada Tiap Kelompok (dalam 10^3)

Kelompok percobaan	N	Mean	SD
Kontrol	5	999,40	138,502
Perlakuan 1	5	839,20	155,046
Perlakuan 2	5	843,40	130,378
Perlakuan 3	5	882,60	619,705



Gambar 6. Boxplot Rerata Jumlah Trombosit

Dari tabel 3 diperoleh data rerata jumlah trombosit kelompok kontrol (999,40+138,502) lebih tinggi dibanding kelompok perlakuan 3 atau yang diberi mengkudu 4ml/hari (882,60+619,705). Kelompok perlakuan 2 atau yang diberi mengkudu 2ml/hari (843,40+130,378) memiliki rerata lebih rendah dari kelompok kontrol (999,40+138,502). Kelompok perlakuan 1 atau yang diberi mengkudu 1ml/hari (839,20+155,046) mempunyai rerata paling rendah dibanding seluruh kelompok.

Uji normalitas terhadap data dengan uji *Shaphiro-Wilk* diperoleh hasil bahwa data berdistribusi normal. Hasil uji homogenitas varian dari data yang ada (*Levene Test*) diperoleh data dengan varian yang homogen ($p > 0,05$). Karena distribusi data normal dan varian homogen ($p > 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *one way Anova*. Hasil dari uji statistik *one way Anova* didapatkan nilai $p = 0,859$ ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan perbandingan antar kelompok penelitian tidak bermakna secara statistik.

BAB VI

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini didapat bahwa rerata jumlah trombosit pada kelompok yang diberi mengkudu dan diet standar lebih rendah dibanding kelompok yang tidak diberi mengkudu dan hanya diberikan diet standar, hasil tersebut tidak bermakna secara statistik sehingga hipotesis penelitian ini yang menyatakan terdapat perbedaan jumlah trombosit pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok antara tikus yang diberi jus mengkudu dosis bertingkat dengan yang tidak diberi jus mengkudu ditolak. Meskipun penelitian ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan jumlah trombosit tikus yang diberi mengkudu dan tidak diberi mengkudu, namun jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Dyah Mustika Nugraheni, pada penelitian ini didapatkan nilai trombosit yang lebih tinggi.⁶⁷

Jumlah trombosit yang lebih tinggi dikarenakan paparan asap rokok yang menyebabkan berbagai mekanisme terjadi seperti peningkatan konsentrasi nikotin yang memicu saraf simpatis kemudian melepaskan trombosit ke dalam sirkulasi yang distimulus oleh *alfa adrenoceptor*.¹⁰ Asap rokok yang dipaparkan juga memicu proses inflamasi sehingga terjadi peningkatan kadar sitokin dan IL-6 yang memicu produksi TPO di hepar dan meningkatkan produksi trombosit.³³⁻³⁵ TNF alfa merupakan mediator proinflamasi yang diinduksi oleh NO dari asap rokok yang dapat menstimulasi ataupun menghambat trombositopoesis.¹⁴

Hasil penelitian pengukuran produksi trombosit ini belum dapat membuktikan secara signifikan penggunaan jus mengkudu dari tumbuhan *Morinda citrifolia L* sebagai salah satu tumbuhan yang mengandung senyawa antioksidan untuk mengurangi kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh asap rokok. Meskipun pada penelitian terdahulu disebutkan bahwa pada perokok aktif yang mengkonsumsi 2 ons TNJ dengan dosis 2 kali sehari selama 30 hari dapat melindungi individu dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh asap tembakau.⁵⁹ Penelitian yang dilakukan oleh Herlisa Anggraini didapatkan bahwa pemberian jus mengkudu memberikan hasil tidak terdapat perbedaan bermakna secara statistik terhadap produksi NO dan ROI makrofag bronchoalveoli pada tikus yang terpapar asap rokok.²⁴ NO merupakan molekul gas yang diproduksi oleh *inducible NO synthase* (iNOS) dengan cara mengubah asam amino L-arginin menjadi NO dan *citrulin*, dan bereaksi dengan Fe untuk menghambat terjadinya ribonukleotida reduktase, menyebabkan sintesa DNA terhambat dan proliferasi sel berhenti.^{68,69} Penelitian terdahulu dilaporkan bahwa NO endogen dan eksogen dapat menginduksi apoptosis pada megakariosit. Inhibisi dan tidak adanya *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) yang merupakan derivat dari NO akan menurunkan produksi trombosit dan berkurangnya trombosit dalam sirkulasi.¹⁵

Hipotesis yang kedua menyatakan terdapat perbedaan jumlah trombosit pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok antara kelompok yang diberi jus mengkudu dosis bertingkat. Dari hasil penelitian ini didapatkan perbedaan jumlah trombosit setelah diberi mengkudu dengan dosis yang berbeda namun hasilnya tidak signifikan sehingga hipotesis yang kedua juga ditolak. Diantara ketiga

kelompok perlakuan P1, P2, dan P3, kelompok P1 atau yang diberi mengkudu dosis 1 ml mempunyai nilai trombosit yang paling rendah dibandingkan P2 dan P3. Kelompok P2 dan P3 berturut-turut produksi trombosit kemudian meningkat.

Palu et al mengatakan bahwa mengkudu meningkatkan sistem imun dengan mengaktivasi *canabinoid* (CB2) reseptor, menekan produksi sitokin IL-4 dan meningkatkan produksi IFN- γ yang diikuti oleh aktivasi makrofag.⁷⁰ Menurut hasil penelitian *Hirazumi A et al*, Polisakarida dalam *Morinda citrifolia* memiliki kemampuan untuk menghambat TNF- α dan juga bersifat antioksidan. *Polisakarida -rich fraction*, yang dihasilkan dari jus buah mengkudu melalui presipitasi etanol, menstimulasi pelepasan beberapa mediator seperti TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-12, *interferon-gamma* (IFN-gamma) dan mensupresi pengeluaran IL-4.¹⁷ IL-4 merupakan regulator negatif dalam trombositopoiesis sehingga supresi dari IL-4 memungkinkan peningkatan jumlah trombosit. *Asahina* mengatakan ekstrak alkohol dari morinda menghambat produksi tumor necrosis faktor- α (TNF- α). Ekstrak mengkudu juga dimungkinkan melepas mediator dari efektor sel murin, termasuk TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-12, IFN- γ , dan NO.⁷¹ Menurut *Hirazumi* dan *Asahina*, mengkudu dapat menekan TNF- α namun juga memungkinkan melepaskan mediator TNF- α sehingga hal ini memungkinkan produksi trombosit tidak dapat ditekan secara maksimal.

Berdasarkan hal tersebut di atas dimungkinkan pemberian jus mengkudu dapat mempengaruhi produksi trombosit namun pada penelitian ini hasilnya tidak signifikan. Penelitian ini memiliki keterbatasan pada metode penelitian dimana tidak dilakukan pretest sehingga tidak dapat dipastikan terdapat peningkatan

jumlah trombosit. Perbedaan dengan penelitian Dyah Mustika Nugraheni⁶⁷ tampak bahwa jumlah trombosit pada penelitian ini lebih karena proses inflamasi yang terjadi dan efek mengkudu itu sendiri.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

Berdasarkan penyajian data dan pembahasan pada bab sebelumnya, maka dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- c. Perbedaan jumlah trombosit tidak bermakna pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok antara tikus wistar yang diberi jus mengkudu dosis bertingkat dengan yang tidak diberi jus mengkudu.
- d. Perbedaan jumlah trombosit tidak bermakna pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok antara kelompok yang diberi jus mengkudu dosis bertingkat.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian pendahuluan produksi trombosit sebelum diberi mengkudu untuk mengetahui peningkatan atau penurunan trombosit setelah diberi mengkudu.
2. Perlu penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian jus mengkudu dalam variasi waktu dan dosis berbeda sehingga dapat diperoleh dosis optimal dan efek yang adekuat terhadap produksi trombosit secara bermakna.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan jumlah sampel yang lebih banyak dan waktu perlakuan yang lebih lama.

DAFTAR PUSTAKA

1. Smoking cessation [Internet]. London: BMJ; 2011 [updated 2011 Jun 15; cited 2011 Nov 16]. Available from:
<http://bestpractice.bmj.com/bestpractice/monograph/411/basics/epidemiology.html>
2. Gondodiputro S. Bahaya tembakau dan bentuk-bentuk sediaan tembakau. Bagian Ilmu Kesehatan Masyarakat Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. Bandung. 2007;1-2, 9-112.
3. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2005.
4. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans and their Supplements: A complete list. Tobacco Smoking and Tobacco Smoke Volume 83;2002.
5. Epidemiologi rokok. [Internet] Himapid FKM Unhas; 2007 [updated 2007 Des 22; cited 2011 Nov 16]. Available from:
<http://himapid.blogspot.com/2007/12/epidemiologi-rokok.html>
6. Tirtosastro S, Murdiyati AS. Kandungan Kimia Tembakau dan Rokok. Buletin Tanaman Tembakau, Serat & Minyak Industri, 2010;2(1):33–43.
7. Muhammad I. Efek Antioksidan Vitamin C Terhadap Tikus (*Rattus norvegicus* L) Jantan Akibat Pemaparan Asap Rokok[dissertation]. Bandung; 2009.
8. Butkiewicz AM, Kemono-Chetnik I, Dymicka-Piekarska V, Matowicka-Karna J, Kemono H, Radziwon P. Does smoking affect thrombocytopoiesis and platelet activation in women and men? *Adv Med Sci.* 2006;51:123-6.
9. Zevin S, Saunders S, Gourlay SG, Peyton J, Benowitz NL. Cardiovascular effects of carbon monoxide and cigarette smoking. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38:1633-1638.
10. Mundal HH, Hjemdahl P, Gjesdal K. Acute effects of low dose nicotine gum on platelet function in non-smoking hypertensive and normotensive men. *Eur J Clin Pharmacol.* 1995;47:411-416.

11. Suwansaksri J, Wiwanitkit V, Soogarun S. Effect of smoking on platelet count and platelet parameters: an observation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2004; 10: 287-8.
12. Brumit DR, Barker HF. The determination of a reference range for new platelet parameters produced by the Bayer ADVIA TM 120 full blood count analyser. *Clin Lab Haem.* 2000; 22: 103-7.
13. Chao FC, Tullis JL, Alper CA, Glynn RJ, Silbert JE. Alternation in plasma proteins and platelet functions with aging and cigarette smoking in healthy men. *Thromb Haemost.* 1982; 47: 259-64.
14. Gugliotta G, Baccarani M. A review of the clinical and biological features of reactive thrombocytosis. *Journal of Platelets.* 2011; 2:96-99.
15. Battinelli E, Willoughby SR, Foxall T, Valeri CR, Loscalzo J. Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(25):14458-63.
16. Jagetia GC, Baliga MS. The evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain Indian medicinal plants in vitro: a preliminary study. *J Med Food.* 2004;7(3):343-8.
17. Hirazumi A, Furusawa E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. *Phytother Res.* 1999;13(5):380-7.
18. Elkins R. *The Noni Revolution.* Woodland Publishing, 2002. p. 116.
19. Wang MY, Lutfiyya MN, Hoper VW, Anderson G, Su CX, West BJ. Antioxidant activity of noni juice in heavy smokers. *Chem Cent J.* 2009; 3: 13.
20. Palu AK, Santiago AK, West BJ, Kaluhiokalani N, Jensen J. The Effects of *Morinda citrifolia* L. Noni on High Blood Pressur. American Chemical Society. ACS Symposium Series, Vol.993, September 19. 2008.
21. Suwansaksri J, Wiwanitkit V, Soogarun S. Effect of Smoking on Platelet Count and Platelet Parameters: An Observation. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis.*2004;10(3):287-288.
22. Yulinah ES, Fitriyani N, Sigit JI. Efek Antiagregasi Platelet Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* var. *Sunti* Val.) dan Kombinasinya pada Mencit Jantan Galur Swiss Webster. *J Kedokteran Maranatha.* 2008;7(2):12-16

23. Yuniharilmy D. Efek Vitamin E terhadap Jumlah Leukosit dan Neutrofil Tikus Wistar yang Leukositosis Setelah Diberi Paparan Asap Rokok. UNDIP 2011
24. Anggraini H. The Effect of Noni Juice on Nitric Oxide and Reactive Oxygen Intermediate Macrophages on Mice Exposed to Cigarette Smoke[dissertation]. Semarang;2011.
25. Nagata Y, Nagahisa H, Aida Y, Okutomi K, Nagasawa T, Todokoro K. Thrombopoietin Induces Megakaryocyte Differentiation in Hematopoietic Progenitor FDC-P2 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270: 19673-19675.
26. Hoffbrand, AV, Pettit JE. Trombosit, pembekuan darah, dan hemostasis. Dalam : Hoffbrand, AV, Pettit JE ed. *Essential haematology*. Terjemahan: Dewi Asih Mahanani. Ed 4. Jakarta .EGC. 2005; 221-18.
27. Kaushansky K. Megakaryocytes. In : John P. Greer, John Foerster, George M. Rodges. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Lppincot Williams & Walkins. 2009;12(1): 468-18.
28. Skoda RC. Thrombocytosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:159-167.
29. Erickson-Miller CL, Ji H, Murphy MJ. Megakaryocytopoiesis and platelet production: does stem cell factor play a role?. *Stem Cells*. 1993;11(2):163-9.
30. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al. (eds). *Hematology. Basic Principle and Practice*. Fourth Edition. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone;2005.
31. Schafer AI. Thrombocytosis. *N Engl J Med*.2004; 350:1211-1219.
32. Lal A. Thrombocytosis, *Essential, eMedicine*, Oct 2009.
33. Vannucchi AM, Barbui T. Thrombocytosis and Thrombosis. *Hematology*. 2007;(1):363-70.
34. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood J*. 2001;98: 2720-2725.
35. Mantadakis E, Tsalkidis A , Chatzimichae. Thrombocytosis in Childhood. *Indian J Pediatr*. 2008;45:669-77.

36. Calverley DC. Platelet structure and function in hemostasis and thrombosis. In : John P. Greer, John Foerster, George M. Rodgers. Wintrobe's Clinical Hematology. Vol 1. Edisi 12. Philadelphia : Lppincot Williams & Walkins. 2009;1(12):490-19.
37. Suharti C. Penyakit Perdarahan. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro.2010;2:4-5.
38. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 81 Tahun 1999 Tentang Pengamanan Rokok Bagi Kesehatan[Internet]. Indonesia: Depkes [cited 2011 Des 8]. Available from : <http://gizi.depkes.go.id/gaya->
39. Rokok [Internet]. Indonesia:Wikipedia [cited 2011 Des 9] Available from : <http://id.wikipedia.org/wiki/Rokok>
40. Susanna D, Hartono B, Fauzan H. Penentuan Kadar Nikotin Dalam Asap Rokok. Makara Kesehatan. 2003;7(2):23.
41. Rubenstein D, Jesty J, Bluestein D. Differences Between Mainstream and Sidestream Cigarette Smoke Extracts and Nicotine in the Activation of Platelets Under Static and Flow Conditions. Circulation. 2004; 109: 78-83.
42. Moir D, Rickert WS, Levasseur G, LaroseY, Maertens R, White P, et al. Comparison of Mainstream and Sidestream Marijuana and Tobacco Cigarette Smoke Produced under Two Machine Smoking Conditions. Chem. Res. Toxicol.2007.
43. Slaughter E, Gersberg RM, Watanabe K, Rudolph J, Stransky C, Novotny TE. Toxicity of cigarette butts, and their chemical components, to marine and freshwater fish. Tob Control. 2011;20:418
44. Harris JE. Cigarette Smoke Components and Disease: Cigarette Smoke Is More Thana Triad of Tar, Nicotine, and Carbon Monoxide. Smoking and Tobacco Control Monograph No. 7, Chapter 5.
45. Hanslavina A. Effect of vitamin C and E on airway goblet cells in rat due to cigarette smoke exposure.Universa Medica.2006; 25(2):61.
46. Martin T[Internet]. Tar in Cigarettes. The Toxic Chemicals in Cigarettes. New York: About.com;2010 [Updated 2010 Jun 15; cited 2011 Des 2011] Available from: http://quitsmoking.about.com/od/chemicalsinsmoke/a/tar_in_cigs.htm
47. Sitepoe M. Usaha Mencegah Bahaya Merokok. Jakarta : Gramedia. 1997:21-5.

48. Raub J A, Mathieunolf M, Hampson NB, Thom SR. Carbon Monoxide Poisoning - A Public Health Perspective. *Carbon Monoxide Poisoning - a Public Health Perspective. Toxicology.*2000; (145):1-14.
49. Peers C, Dallas ML, Scragg JL. Ion channels as effectors in carbon monoxide signaling. *Commun Integr Biol.* 2009; 2(3): 241–242.
50. Puente-Maestu L, Bazonza N, Pérez MC, Ruiz de Oña JM, Rodriguez Hermosa JL, Tatay E. Relationship between tobacco smoke exposure and the concentrations of carboxyhemoglobin and hemoglobin, *Arch Bronconeumol.* 1998;34(7):339-43.
51. Hadidi KA, Mohammed FI. Nicotine content in tobacco used in hubble-bubble smoking. *Saudi Med J.* 2004;25(7):912-7.
52. Nicotine and other poisons[Internet]. London: NSWgovernmmt;2007 [update 2007 Oct 3; cited 2011 Desember 11] Available from: <http://www.health.nsw.gov.au/factsheets/general/nicotine.html>
53. Baraas F. Mencegah serangan jantung dengan menekan kolesterol. Jakarta: Yayasan Kardia Iqratama; 2003.
54. Vleeming W. The role of nitric oxide in cigarette smoking and nicotine addiction. *Nicotine Tob Res.*2002;4 (3):341-348.
55. Rusiawati Y. Pengaruh Merokok terhadap Kesehatan. Puslit Penyakit Tidak Menular dan Dept. of Science and Environment Australia. *Cermin Dunia Kedokteran* No. 62. Jakarta; 1990.
56. Rajat S. Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circ.* 2001;104:1905-191.
57. Leopoldo R, Demaster E G. Cigarette smoke-induced endothelium dysfunction: role of superoxide anion. *Journal of hypertension.* 2001; 19(5):891-897.
58. Lupia E. Thrombopoietin contributes to enhanced platelet activation in cigarette smokers. *Atherosclerosis.* 2010;210(1):314-9.
59. Ying WM, West BJ, Jensen CJ, Nowicki D, Chen S, Palu AK, Anderson G. *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23(12): 1127 -1141.
60. Waha MG, Wijayanti L. Sehat dengan Mengkudu. Jakarta: MSF Group; 2000.

61. Dr. Abhay Kumar Pati [Internet]. *Morinda citrifolia*. India: PRLog (Press Release); 2010 [updated 2010 Jun 25; cited 2012 Feb 3]. Available from: <http://www.prlog.org/10749295-noni-morinda-citrifolia-drabhay-kumar-pati-biotechayur-orissa-india.html>
62. Bangun A.P, Sarwono B. *Khasiat dan Manfaat Mengkudu*. Jakarta. AgroMedia Pustaka. 2004 : 6-24.
63. Suhartono E, Fachir H, Setiawan B. Rokok sebagai sumber radikal bebas dalam Kapita selekta biokimia : Stres oksidatif dasar & penyakit. Banjarmasin. Pustaka Banua. 2007;1(2): 117-8.
64. Wang, M.Y. and C. Su.. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (noni). *Ann.NY Acad. Sci.* 2001; 9(52): 161–168.
65. Prof Dr H Ibelgaufits [Internet]. Interleukin-4. London: COPE; 2011 [updated 2011 Jun 21; cited 2012 Agustus 1]. Available from: <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=IL4>
66. World Health Organization. *Research Guidelines for Evaluation The Safety and Efficiency of Herbal Medicines*. Manila. 1993: 33-44.
67. Nugraheni DM. *Efek Minyak Atsiri Bawang Putih (Allium sativum) terhadap Jumlah Platelet pada Tikus Wistar yang Diberi Diet Kuning Telur*. UNDIP 2011
68. Oca MM, Torres SH, Sanctis D, Mata A, Hernandez N, Talamo C. Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD. *Eur Respir J.* 2005;26:390-7.
69. Ishimura Y, Shimada H, Suematsu M, editors. *Oxygen homeostasis and its dynamics*. Tokyo, Japan: Springer-Verlag. 1998; 289-92.
70. Palu AK, Kim AH, West BJ, Deng S, Jensen J, White L. The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: Its molecular mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology.* 2008;115:502-506.
71. Asahina AY, Ebesu JSM, Ichinotsubo D, Tongson J, Hokama Y. Effect of okadaic acid (OA) and Noni fruit extraction in the synthesis of tumor necrosis factor- α (TNF- α) by peripheral blood mononuclear (PBN) cells in vitro. *The Proceedings of the International Symposium of Ciguatera and Marine Natural Products*; 1994. p.197-205.