



**PENGARUH PEMBERIAN JUS NONI (*Morinda Citrifolia* L)
DOSIS BERTINGKAT TERHADAP PRODUKSI *NITRIC OXIDE*
(NO)
MAKROFAG PERITONEUM PADA TIKUS GALUR WISTAR
YANG DIBERI PAPARAN
ASAP ROKOK**

**LAPORAN HASIL
KARYA TULIS ILMIAH**

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

**NOVITASARI SOESILO
G2A008129**

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

ABSTRAK

Latar Belakang Asap Rokok mengandung radikal bebas (tar,H₂O₂,NO)².Kandungan radikal bebas yang tinggi pada rokok dapat memacu pembentukan NO oleh makrofag peritoneum jauh lebih banyak. Sehingga diperlukan antioksidan eksogen. Buah Noni (*Morinda citrifolia* L) mengandung antioksidan alami yang mampu menangkal radikal bebas.

Tujuan : Membuktikan ada pengaruh pemberian jus Noni terhadap produksi Nitric Oxide (NO) makrofag peritoneum pada tikus galur wistar yang diberi paparan asap rokok.

Metode :Penelitian ini dilakukan pada tikus Wistar jantan. Semua Wistar diberi paparan asap rokok dalam selama 30 hari. Hewan coba dibagi dalam 4 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 5 tikus. Kontrol tanpa jus Noni, kelompok perlakuan 1 diberi jus Noni 1 ml, kelompok perlakuan 2 diberi 2 ml, kelompok perlakuan 3 diberi 4 ml. Pemberian jus Noni pada menit ke 30 setelah pemaparan asap rokok. Semua Wistar diterminasi pada hari ke 31. Pengukuran variabel berupa produksi NO (Nitric Oxide) makrofag peritoneum yang diukur dengan ELISA reader.

Hasil: Uji ANOVA didapatkan perbedaan kadar NO antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan(p=0.000). Post Hoc Test didapatkan perbedaan signifikan kadar NO makrofag peritoneum antara kontrol dengan kelompok perlakuan 2 dan 3 (p=0.036 dan p=0.001). Tidak terdapat perbedaan antara kontrol dengan kelompok perlakuan 1 secara statistik (p=0.271). Antara kelompok perlakuan 1 dengan kelompok perlakuan 2 dan 3 juga terdapat perbedaan yang signifikan (p=0.003 dan p=0.000). Tetapi antara kelompok perlakuan 2 dan 3 tidak terdapat perbedaan signifikan (p=0.075).

Kesimpulan: Jus Noni mempengaruhi kadar NO makrofag peritoneum pada tikus galur Wistar yang diberi paparan asap rokok.

Kata Kunci: Rokok, radikal bebas, nitric oxide, *Morinda citrifolia* L, antioksidan, makrofag

ABSTRACT

Background : The cigarette smoke contain free radicals (tar,H₂O₂,NO,etc).They can increase the forming of NO peritoneum macrophage more than usual .So, it's very important to use exogenous antioxidant such as Noni (Morinda citrifolia L) to balance the number of oxidant/free radical and antioxidant.

Aim: The aim of the study was to prove the effect of giving Noni juice in Nitric Oxide production peritoneum macrophage in Wistar mice which were exposure by cigarette smoke.

Method: This research used male wistar mice as object of experiment. All of mice were exposed by cigarette smoke for 30 days. There were 4 groups. Each group consisted of 5 mice.

control(K): without Noni juice

Treated Group 1 :1 ml of Noni juice (P1)

Treated group 2 : 2 mls of Noni juice(P2)

Treated group 3 :4 mls of Noni juice (P3)

Noni juice were given 30 minutes after exposed by cigarette smoke.

All mice were terminated on 31th days.

The dependence variable that measured was NO production peritoneum macrophage with ELISA reader.

Result: ANOVA test got $p=0.000$. Post Hoc test , there were significant difference of treated group 2 and 3 to control group ($p=0.036$ and $p=0.001$). There was no difference between treated group 1 and control group ($p=0.271$). There were differences in treated group 1 to treated group 2 and 3 ($p=0.003$ and $p=0.000$). Between treated group 2 and 3 there was no significant difference ($p=0.075$).

Conclusion: Noni juice influenced the production of NO peritoneum macrophage in Wistar mice which were exposed by cigarette smoke.

Key words: Cigarette, free radical,nitric oxide, Morinda citrifolia L,antioxidant,macrophage

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rokok dikonsumsi luas setelah diproduksi pada awal abad ke 20. Sebagian besar perokok berasal dari negara berkembang dan dari golongan sosial ekonomi rendah. Prevalensi perokok di Indonesia adalah 69% pria dan 4% wanita. Merokok diestimasikan 90% menyebabkan kanker paru – paru pada pria, dan sekitar 70% pada wanita. Di negara – negara industri, sekitar 56% - 80% merokok menyebabkan penyakit pernafasan kronis dan sekitar 22% penyakit kardiovaskular. Dari seluruh perokok yang ada 70% yang menderita penyakit akibat merokok adalah negara berkembang. Indonesia menduduki peringkat ke-4 jumlah perokok terbanyak di dunia dengan jumlah sekitar 141 juta orang, dengan kenaikan konsumsi rokok tertinggi di dunia (44%). Konsumsi rokok Indonesia setiap tahun diperkirakan mencapai 199 miliar batang rokok. Akibatnya adalah kematian sebanyak 5 juta orang pertahunnya. Bila hal ini tidak dapat dicegah, maka jumlah kematian akan meningkat dua kali mendekati 10 juta orang pertahun pada tahun 2020. Tahun 2005, biaya yang harus dikeluarkan akibat penyakit terkait tembakau mencapai 18,1 milyar USDolar.¹Rokok merupakan salah satu polutan berupa gas yang mengandung

berbagai bahan kimia antara lain nikotin, karbon monoksida, tar dan eugenol (dalam rokok kretek).²

Asap rokok dapat mempengaruhi metabolisme makrofag dengan mengaktifkan makrofag untuk melepaskan leukotrien B₄, IL-8 dan TNF- α menyebabkan meningkatnya produksi superoksida (O₂⁻) dan H₂O₂, juga menyebabkan kerusakan oksidatif makromolekul seperti lipid, protein, dan DNA, dapat menghilangkan antioksidan, serta membentuk radikal bebas seperti nitrit oksida (NO), nitrit peroksida (NO₂) dalam fase gas serta quinone (Q), semiquinone (HQ) dan hydroquinone (HQ₂) dalam fase tar.^{2,3,4}

Peningkatan mediator inflamasi juga akan meningkatkan ekspresi *nitric oxide* (NO) dalam jumlah besar melalui aktivasi iNOS.⁵ *Nitric oxide* (NO) merupakan suatu molekul biologi yang terdapat di seluruh tubuh, dihasilkan oleh sejumlah tipe sel yang akan memberikan efek merugikan dan menguntungkan di tingkat seluler dan vaskuler. Pada kondisi inflamasi, NO mempunyai kontribusi yang penting, dimana NO akan diproduksi dalam jumlah yang besar oleh iNOS yang terdapat pada makrofag. Kadar NO lebih mudah untuk diperiksa dan lebih stabil.^{6,7} Makrofag berperan dalam inflamasi akut bersama dengan neutrofil. Makrofag merupakan sel yang terdapat pada organ tertentu. Makrofag banyak terdapat pada rongga peritoneum. Oleh sebab itu isolasi *nitric oxide* dari makrofag peritoneum lebih mudah diperiksa kadarnya.⁶

Antioksidan adalah senyawa yang memiliki kemampuan untuk menetralkan radikal bebas dengan cara menyumbangkan elektronnya pada molekul radikal bebas. Radikal bebas merupakan senyawa yang sangat reaktif.⁸ Keseimbangan antara antioksidan dan oksidan dalam keadaan istirahat cukup untuk mencegah gangguan fungsi fisiologis normal, namun adanya kenaikan oksidan atau penurunan antioksidan dapat mengganggu keseimbangan dan berhubungan dengan aktivasi fagosit, serta merupakan konsekuensi dari respon inflamasi.⁹ Dan oksidan dapat diperoleh dari rokok (tar dan asap rokok), netrofil, makrofag, xanthine oxidase dan infeksi¹⁰ Kerusakan oksidatif dapat dihalangi oleh senyawa antioksidan yang terdapat dalam tumbuhan, melalui reduksi dengan radikal bebas, membentuk kelat dengan senyawa logam katalitik, dan menangkap oksigen.⁷

Salah satu tumbuhan yang dapat berfungsi sebagai antioksidan adalah *Morinda citrifolia* L atau yang dikenal dengan nama noni atau mengkudu karena antara lain mengandung selenium, asam askorbat, beta karoten, alkaloid, terpenoid, beta sitosterol, karoten, dan polifenol seperti flavonoid, flavon glikosida, rutinosa. Buah noni biasa digunakan menjadi minuman yang memiliki efek dalam kesehatan yang disajikan dalam bentuk jus. *Tahitian Noni Juice* adalah salah satu bentuk jus buah noni yang ada di pasaran. Penelitian Wang menyatakan bahwa antioksidan dalam *Tahitian Noni Juice* (TNJ) dapat melindungi individu dari asap rokok dengan *scavenging* oksigen bebas dan radikal peroksida lipid dan *quenching*. Hasilnya menunjukkan bahwa TNJ dapat melindungi individu dari kerusakan oksidatif yang

disebabkan oleh asap tembakau.¹¹ Salah satu penelitian yang dilakukan oleh Palu et al membuktikan bahwa secara *in vivo* pemberian *Tahitian Noni Juice* (TNJ) melalui *oral ad libitum* selama 16 hari dapat menekan produksi IL-4 yang berperan dalam respon alergi dan inflamasi pada saluran pernafasan, tetapi meningkatkan produksi IFN- γ yang berperan dalam mengaktifkan makrofag, sehingga membuktikan bahwa TNJ dapat memodulasi sistem kekebalan tubuh.¹² Menurut penelitian Hokama, aktifitas imunologi dari ekstrak alkohol dari buah noni/mengkudu yang sudah dilaporkan adalah penghambatan TNF- α yang merupakan promotor tumor endogen dan berperan dalam reaksi inflamasi. Hasil penelitian Wang et al membuktikan bahwa jus noni sangat potensial untuk menghambat radikal bebas. Aktivitas antioksidan TNJ dibandingkan dengan tiga jenis antioksidan, yaitu; vitamin C, bubuk biji anggur dan pknogenol, yang diukur dengan menggunakan aktivitas penghambatan superoxide anion radicals (SAR), adalah 2,80x lebih kuat dari vitamin C, 1,40x lebih besar dari pknogenol, dan 1,10x lebih besar dari biji anggur.¹³

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh jus noni yang mengandung berbagai zat antioksidan terhadap produksi *nitric oxide* makrofag peritoneum.

1.2 Masalah Penelitian

Masalah yang mendasari penelitian ini adalah

Apakah ada pengaruh pemberian jus noni terhadap produksi *Nitric Oxide* (NO) makrofag peritoneum tikus galur Wistar yang diberi paparan asap rokok?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan ada pengaruh pemberian jus noni terhadap produksi *Nitric Oxide* (NO) makrofag peritoneum pada tikus galur Wistar yang diberi paparan asap rokok.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis perbedaan produksi *Nitric Oxide* (NO) makrofag peritoneum pada tikus galur Wistar yang diberi paparan asap rokok antara kelompok yang diberi jus noni dosis bertingkat dan tidak diberi jus noni.
2. Menganalisis perbedaan produksi *Nitric Oxide* (NO) makrofag peritoneum pada tikus galur Wistar yang diberi paparan asap rokok antara kelompok yang diberi jus noni dosis bertingkat.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah tentang peran dan manfaat jus noni sebagai minuman yang memiliki efek dalam mengatasi inflamasi terutama akibat oleh paparan asap rokok.

1.5 Orisinalitas Penelitian

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian yang sudah pernah dilakukan adalah dimana belum ada penelitian yang melihat hubungan jus noni dengan produksi *Nitric Oxide* (NO) dan paparan asap rokok. Perbedaan yang kedua, sampel penelitian menggunakan tikus galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Perbedaan ketiga adalah pada parameter yang diukur adalah produksi *Nitric Oxide* (NO) makrofag peritoneum.

Tabel 1. Penelitian yang sudah dilakukan

Peneliti,Penerbit,Tahun	Judul Penelitian	Hasil Penelitian
I Ketut Adnyana,Elin Yulinah,Andreanus A. Soemardji,Endang Kumolosasi,Maria Immaculata Iwo,Joseph Iskendarso.Sigit Suwenda. ITB. 2004	Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	Ekstrak buah mengkudu menurunkan kadar glukosa serum tikus pada model toleransi glukosa, namun tidak bermakna secara statistik. ¹⁴
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. ¹⁵
Ismiyati Muhammad. Institut Pertanian Bogor. 2009	Efek antioksidan Vitamin C terhadap tikus (<i>Rattus norvegicus</i> L) jantan akibat pemaparan asap rokok	Pemberian vitamin C terbukti dapat menurunkan kadar MDA dan mempertahankan aktivitas SOD. ²

<p>Afa Kehaati Palu, Raevonne A. Santiago, Brett J. West, Norman Kaluhiokalani, Jarakae Jensen. American Chemical Society. <i>ACS Symposium Series</i>, Vol. 993, September 19, 2008.</p>	<p>The Effects of <i>Morinda citrifolia</i> L. Noni on High Blood Pressure: Mechanistic investigation and case study</p>	<p>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.¹⁶</p>
<p><u>Wang MY, Peng L, Lutfiyya MN, Henley E, Weidenbacher-Hoper V, Anderson G.</u> ACCR. 2008</p>	<p><i>Morinda citrifolia</i> (Noni) fruit juice lowers cancer risk in current smokers by reducing <i>Malondialdehyde</i> (MDA)-DNA adducts</p>	<p>Uji klinik pada manusia yang dilakukan pada 245 perokok aktif membuktikan efek mengkonsumsi TNJ (4 atau 6 oz/hari) selama 1 bulan signifikan mereduksi karsinogenik di dalam limfosit jenis MDA-DNA adduct (53,36%) dan aromatik DNA adduct (44,9%) dibandingkan placebo.¹⁷</p>
<p>Afa K. Palu, R. D. Seifulla. Brett J. West. <i>Journal of Medicinal Plants Research</i> Vol. 2(7), pp. 154-158. 2008</p>	<p><i>Morinda citrifolia</i> L. (noni) improves athlete endurance: Its mechanisms of action</p>	<p>TNJ meningkatkan antioksidan 25% dengan adanya penurunan lipid peroksidase ($p < 0.05$) dibandingkan kelompok placebo.¹⁸</p>
<p>Yueniwati, Yuyun; Mulyohadi, Ali. <i>Jurnal Kedokteran YARSI</i> volume 12. Nomor 1:85-92. 2004</p>	<p>Pengaruh paparan asap rokok kretek terhadap peroksidasi lemak dan sistem proteksi superoksid dismutase hepar tikus Wistar</p>	<p>Asap rokok kretek dapat meningkatkan radikal bebas dan menurunkan dismutase superoksida sebagai sistem pelindung enzimatis dalam hati tikus Wistar.¹⁹</p>
<p>Herlisa Anggraini. UNDIP. 2011</p>	<p>Pengaruh pemberian jus mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L)</p>	<p>Uji <i>one way Anova</i> menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna pada</p>

terhadap <i>nitric oxide</i> (NO) Dan <i>reactive oxygen intermediate</i> (ROI) Makrofag tikus yang terpapar asap rokok	produksi NO <i>bronchoalveolar</i> p=0.079. Uji <i>Kruskal Wallis</i> menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna pada index produksi ROI makrofag <i>bronchoalveolar</i> dengan p=0.135. ²⁰
---	--

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radikal Bebas, Oksidan dan Antioksidan

Sistem imun tergantung dari keseimbangan antara radikal bebas dan status antitoksin dan tubuh. Paparan oksidan yang tinggi akan menurunkan sistem imun. Peningkatan stres oksidan dan disfungsi imun ditemukan pada perokok. Radikal bebas yang diproduksi di dalam tubuh normal akan dinetralkan oleh antioksidan yang ada di dalam tubuh. Bila kadar radikal bebas terlalu tinggi maka kemampuan dari antioksidan endogen tidak memadai untuk menetralkan radikal bebas sehingga terjadi keadaan yang tidak seimbang antara radikal bebas dengan antioksidan.²¹

Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Dalam kepustakaan kedokteran radikal bebas sering disamakan dengan oksidan karena memiliki sifat yang mirip dan dapat menyebabkan kerusakan yang sama walaupun prosesnya berbeda.^{22,23} Oksidan adalah bahan kimia elektrofil

yang sangat reaktif dan dapat memindahkan elektron dari molekul lain dan menghasilkan oksidasi pada molekul tersebut. Oksidan yang dapat merusak sel berasal dari berbagai sumber yaitu:²²

a) Berasal dari tubuh sendiri, berupa senyawa yang sebenarnya berasal dari proses biologi normal namun oleh suatu sebab terdapat dalam jumlah yang berlebihan.^{22.23}

b) Berasal dari luar tubuh yang berperan menimbulkan dampak negatif adalah asap rokok, NO, NO₂ dan ozon. Efek radikal bebas dalam tubuh akan dinetralkan oleh antioksidan yang dibentuk oleh tubuh sendiri dan suplemen dari luar melalui makanan, minuman atau obat-obatan, seperti karotenoid, vitamin C, E, dan lain-lain.²⁴

Antioksidan adalah senyawa-senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan (*scavenging*), menghambat pembentukan ataupun meniadakan efek spesies oksigen reaktif.²⁵ Berdasarkan fungsinya sistem antioksidan tubuh dalam melindungi jaringan terhadap efek negatif radikal bebas dapat dikelompokkan menjadi 5 macam yaitu : 1) antioksidan primer berfungsi mencegah terbentuknya radikal bebas baru, yaitu enzim superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (GPX), dan katalase; 2) antioksidan sekunder berfungsi menangkap radikal bebas serta mencegah terjadinya reaksi berantai, yaitu vitamin C, vitamin E, dan beta karoten; 3) antioksidan tersier berfungsi memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas, yaitu jenis enzim misalnya metionin sulfosida

reduktase yang dapat memperbaiki DNA dalam inti sel; 4) oxygen scavenger berfungsi mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi, misalnya vitamin C; 5) chelators atau sequesstrants bersifat mengikat logam yang mampu mengkatalisis reaksi oksidasi misalnya asam sitrat dan asam amino.⁷

Menurut Phyllis A Balch, Cnc & James F, yang termasuk antioksidan eksogen adalah : *Alpha lipoic acid (ALA)*, *Bilberry (Vaccinium myrtillus)*, *Burdock (Artium lappa)*, *Carotenoids*, *Coenzyme Q 10*, *Curcumin (Tumeric)*, *Flavonoids*, *Garlic*, *Ginkgo biloba*, *Glutathione*, *Grape seed extract*, *Green tea*, *Melatonin*, *Methionine*, *N-Acetylcysteine (NAC)*, *Nicotinamide Adenine dinucleotide (NADH)*, *Oligomeric Proanthocyanidins (OPCs)*, *Pycnogenol*, *Selenium*, *Silymarin*, Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E, dan Seng.²⁶

Beberapa fungsi antioksidan eksogen antara lain; vitamin E dapat mengatasi singlet oksigen, superoksida dan radikal bebas peroksil; vitamin A mampu mengatasi singlet oksigen; B-karoten mampu mengatasi superoksida, peroksil dan singlet oksigen; vitamin C mengatasi radikal peroksil, superoksida dismutase terhadap radikal superoksida, katalase terhadap H₂O₂ dan glutation peroksidase mengatasi H₂O₂ dan LOOH. Kemampuan B-karoten untuk menginaktifkan radikal bebas bukan karena dapat berubah menjadi provitamin A, tetapi karena adanya ikatan rangkap yang banyak pada struktur molekul menangkap radikal peroksil di dalam jaringan pada tekanan parsial oksigen yang rendah.²⁵

2.2 Nitric oxide (NO) dan Makrofag peritoneum

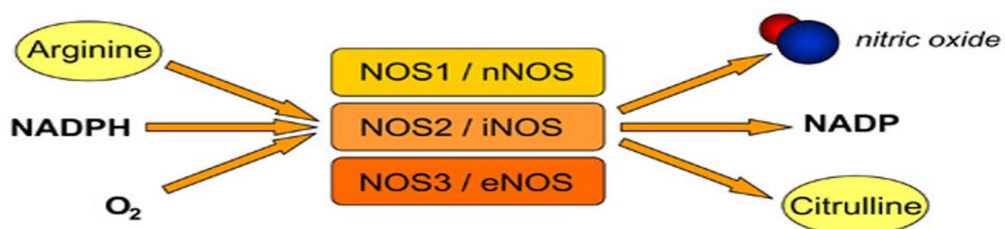
Nitric oxide (NO) merupakan radikal bebas yang dibentuk dari asam amino L-arginin oleh *Nitric Oxide Synthase* (NOS). *Nitric Oxide Synthase* (NOS) pada manusia (dan tikus) mempunyai tiga macam bentuk, yaitu: 1) *Neuron Nitric Oxide* (nNOS atau NOS-1) yang ditemukan pada sel saraf berperan sebagai neuromodulator atau neuromediator,²⁷ 2) *Endothelial Nitric Oxide* (eNOS atau NOS-3) yang ditemukan pada sel endotel pembuluh darah berfungsi mempertahankan tekanan pembuluh darah tetap rendah dan mencegah perlengketan leukosit serta platelet ke dinding pembuluh darah.^{27,28,29} dan 3) *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS atau NOS-2) yang ditemukan pada makrofag. NO yang dikatalase oleh iNOS pada keadaan normal tidak dapat ditemukan. NO ini banyak terdapat pada kondisi inflamasi. Makrofag merupakan mediator imunitas seluler. Makrofag merupakan sel inflamatorik yang berperan pada respon imun akut bersama neutrofil. Makrofag terdapat pada tempat tertentu dan tidak dapat berpindah ke lokasi inflamasi. Makrofag banyak terdapat di rongga peritoneum. Oleh sebab itu pemeriksaan kadar NO yang diproduksi oleh makrofag pada kondisi inflamasi banyak menggunakan supernatan cairan peritoneum sebagai sampel untuk dilakukan pemeriksaan kadarnya. Makrofag juga merupakan sel yang menetap di suatu bagian tubuh tertentu sehingga lebih mudah dilakukan isolasi untuk diperiksa produksi NO. Stimulasi makrofag oleh IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , dan *Lipopolysaccharide* (LPS) akan memacu transkripsi gen yang menyebabkan peningkatan kadar *Nitric Oxide Synthase* (NOS). Sekresi NO akan meningkat mengikuti peningkatan NOS^{5,30,31}

NO merupakan sinyal transmitter intraseluler. Peran dari NO telah diselidiki pada berbagai organ. Pada sistem respirasi, NO berasal dari NOS (NO synthase). Adapun NO menginduksi bronchodilatasi dan vasodilatasi pembuluh darah pulmonal untuk memelihara homeostasis. Sebaliknya, jika terdapat jumlah yang berlebihan dari NOS (lebih spesifik iNOS, NO₂) pada inflamasi saluran napas dan parenkim paru akan memberi efek yang kurang menguntungkan. Pada reaksi inflamasi paru terdapat penelitian adanya stress nitrosative yang berlebihan.²⁶

Nitrit Oksida (NO) mempunyai banyak manfaat bagi tubuh, salah satu yang terpenting adalah peranannya dalam sistem imun tubuh. NO bekerja sama dengan lisosom makrofag membunuh patogen seperti bakteri, jamur dan virus dalam proses fagositosis.^{32,33}

Kadar nNOS dan eNOS dalam tubuh relatif stabil, sedangkan untuk kadar iNOS dapat dipengaruhi oleh adanya inflamasi.^{28,29,30}

Adanya rangsangan inflamasi akan menghasilkan NO seribu kali lebih banyak. Kelebihan jumlah NO akan diubah menjadi bentuk peroksinitrit (ONOO⁻) yang mempunyai efek sitotoksik.²⁷



Gambar 1 : Sintesis *Nitric Oxide* ³²

Produksi NO berlebihan dapat meningkatkan pengaktifan enzim *guanylate cyclase* yang dapat menimbulkan efek negatif, antara lain ketidakaktifan enzim tertentu, induksi protein penyebab stres bahkan kerusakan DNA. ²⁸

2.3 Rokok

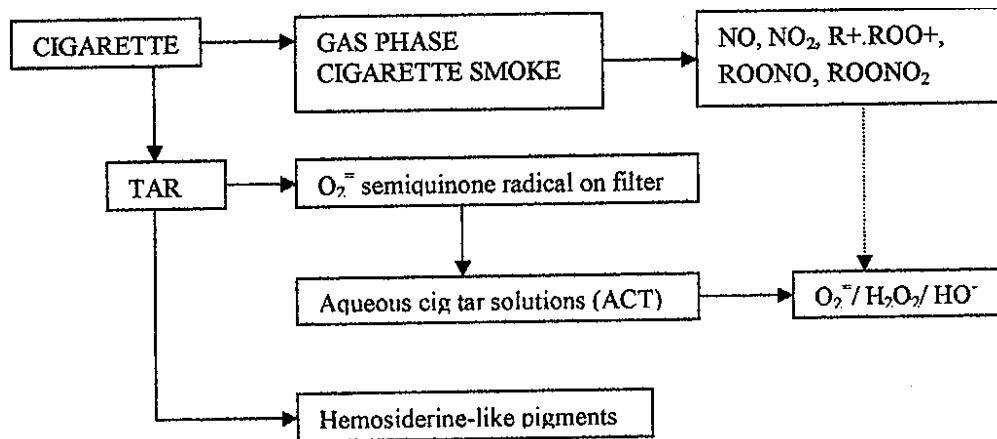
Rokok adalah silinder dari kertas berukuran panjang antara 70 hingga 120 mm (bervariasi tergantung negara) dengan diameter sekitar 10 mm yang berisi daun-daun tembakau yang telah dicacah. Rokok berdasarkan bahan baku atau isi terbagi dalam kategori: 1) rokok putih, yaitu rokok dengan bahan baku hanya 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. ³⁴

Satu batang rokok yang dibakar, akan dihasilkan kira-kira 500 mg gas (92%) dan bahan-bahan partikel padat (8%) yang berupa droplet aerosol cair dan partikel tar padat submikroskopik. ³⁵ Asap rokok mengandung ribuan komponen kimia, termasuk 1.015 spesies reaktif dalam fase gas, khususnya oksida nitrat (NO). ³⁵

Inhalasi asap rokok telah menunjukkan menyebabkan stres oksidatif, dan merupakan konsekuensi dari respon inflamasi disebabkan oleh merokok, oksidasi

lebih lanjut NO terjadi pada CS (*cigarette smoke*) untuk menghasilkan oksida nitrogen sangat beracun.³⁶

Racun utama pada rokok 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.*¹



Gambar 2 : Komponen asap rokok³⁷

2.3.1 Bahan – Bahan Yang Terkandung Dalam Rokok

2.3.1.1 Tar

Tar adalah sejenis cairan kental berwarna coklat tua atau hitam yang merupakan substansi hidrokarbon. Pada saat rokok dihisap, tar masuk ke dalam rongga mulut sebagai uap padat asap rokok, setelah dingin akan menjadi padat dan membentuk endapan berwarna coklat pada permukaan gigi, saluran pernafasan dan paru-paru.¹

Pada rokok yang menggunakan filter dapat mengalami penurunan kandungan tar sekitar 5-15 mg. Walaupun rokok diberi filter, efek karsinogenik tetap bisa masuk dalam paru-paru, ketika pada saat merokok hirupannya dalam-dalam, menghisap berkali-kali dan jumlah rokok yang digunakan bertambah banyak.³⁸

2.3.1.2 Karbon Monoksida

Karbon monoksida (CO) yang dihisap oleh perokok tidak akan menyebabkan keracunan CO, sebab pengaruh CO yang dihirup oleh perokok sedikit demi sedikit, dengan lamban namun pasti akan berpengaruh negatif pada jalan nafas.³⁸

Gas CO mempunyai kemampuan mengikat hemoglobin yang terdapat dalam eritrosit, lebih kuat dibandingkan oksigen, sehingga setiap ada asap tembakau, disamping kadar oksigen udara yang sudah berkurang, ditambah lagi eritrosit akan semakin kekurangan oksigen karena yang diangkut adalah CO.¹

Dalam rokok terdapat CO sejumlah 2%-6% pada saat merokok, sedangkan CO yang dihisap oleh perokok paling rendah sejumlah 400 ppm sudah dapat meningkatkan kadar karboksihemoglobin dalam darah sejumlah 2-16%.³⁸

2.3.1.3 Nikotin

Nikotin yaitu zat atau bahan senyawa pirididin yang terdapat dalam *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica* dan spesies lainnya. Nikotin dapat meracuni syaraf tubuh, meningkatkan tekanan darah, menyempitkan pembuluh perifer.³⁹ Kandungan nikotin berkisar dari <13 mg, mempunyai efek farmakologis yang mendorong faktor habituasi atau ketergantungan psikis.³⁵

Jumlah nikotin yang dihisap dipengaruhi oleh berbagai faktor kualitas rokok, jumlah tembakau setiap batang rokok, dalamnya isapan, lamanya isapan, dan menggunakan filter rokok atau tidak.³⁸

Rokok kretek mengandung 60%–70% tembakau, sisanya 30%–40% cengkeh dan ramuan lain.³⁹

Rokok kretek lebih berbahaya daripada rokok putih, karena kandungan tar, nikotin, dan karbon monoksida di dalamnya lebih tinggi. Konsumsi rokok kretek di Indonesia mencapai 88%.⁴⁰

Tabel 2. Kadar nikotin dan karbon monoksida dari beberapa merk rokok.⁴¹

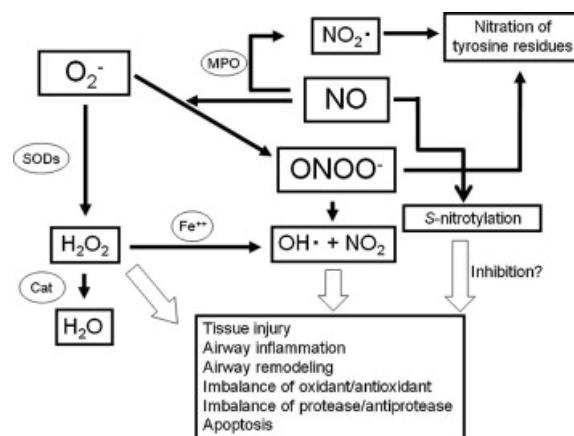
Merk Rokok	<i>Particulate</i> (mg)	Nikotin* (mg)	Karbon monoksida (mg)
Djarum	53,7	5,07	19,5
Dji Sam Soe	40,7	5,31	23,0
Gudang Garam	52,0	5,28	18,2
Wismilak	48,3	5,10	19,7
Australian Brands	17,0	1,1	14,2

**nilai rata-rata.*

2.3.2. Hubungan Rokok, Proses Inflamasi dan NO

Asap rokok mengandung molekul radikal bebas sebanyak 10^{16} molekul radikal bebas per satu hisapan, berbagai bahan kimia, tar, asbestos, H_2O_2 dan lainnya.⁹ Oksidan/radikal dalam asap rokok mempunyai jumlah yang cukup untuk memainkan peranan yang besar terjadinya kerusakan saluran napas. Kerusakan saluran napas inilah yang menimbulkan proses inflamasi. Inflamasi dapat terjadi karena pelepasan berbagai mediator yang berasal dari jaringan rusak, sel

mast,leukosit dan komplemen. Salah satu mediator inflamasi yang pengeluarannya dipengaruhi oleh asap rokok adalah TNF α dan IL 8 yang mengaktifkan dan diproduksi oleh makrofag.³³ Aktivasi makrofag menyebabkan produksi NO yang dikatalase oleh iNOS jauh lebih banyak. Telah diketahui bahwa oksidan asap tembakau menghabiskan antioksidan intraseluler dalam sel paru (in vivo) melalui mekanisme yang dikaitkan terhadap stress oksidan.⁴²



Gambar 3: skema pembentukan radikal bebas (NO) oleh rokok melalui pengaktifan sitokin⁴²

Berbagai penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil bahwa asap rokok dapat merupakan faktor resiko terbesar terjadinya Penyakit Paru Obstruktif Kronik (PPOK), juga dapat menyebabkan hipoksia kronik jantung-paru, aterosklerosis, penurunan fungsi kardiovaskuler, dan penyakit paru lainnya, seperti emfisema. Asap rokok dihubungkan dengan tidak berfungsinya endotel yang merupakan tahap awal

dari terjadinya aterosklerosis. Tidak berfungsinya endotel ini diduga disebabkan oleh degradasi sekunder NO membentuk turunan radikal bebas.⁹

Penelitian yang dilakukan oleh *International Agency for Research on Cancer* (IARC) pada hewan percobaan, terutama tikus memberikan hasil bahwa asap rokok menimbulkan efek biologis yaitu adanya peningkatan aktivasi enzim antioksidan, peningkatan ekspresi oksida nitrat sintase dan berbagai protein kinase kolagenase.⁴³

2.4 Noni (*Morinda citrifolia* L)

2.4.1 Deskripsi tanaman

Menurut H.B. Guppy, ilmuwan Inggris yang mempelajari Noni sekitar tahun 1900, 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*.⁴⁴



Gambar 4: *Morinda citrifolia* ⁴⁵

Ciri umum noni

- 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, hijau sepanjang tahun.
- 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. Daun dapat dimakan dan banyak mengandung vitamin A.
- 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, jelang masak jadi putih kekuningan, setelah matang putih transparan dan lunak, banyak mengandung air, 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.⁴⁶

2.4.2 Kandungan Noni

Zat-zat penting yang terkandung pada setiap bagian tanaman noni, antara lain;¹²

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

2) buahnya, mengandung: 1-butanol, 1-hexanol, *glucoside*, *acetic acid*, *benzoic acid*, *alcohol benzol*, asam butanoit, asam kaprit, asam kaproit, asam kaprilik, asam dekanat, asam elaidik, *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*, *glysine*, *histidin*, *isoleucine*, *methionine*, *phenylalanine*, *proline*, *riboflavine*, *serine*, *threonine*, *tryptophane*, *valine*, *beta-cytosterol*.⁴⁶

Kandungan buah noni antara lain:

a. Zat nutrisi.

Nutrisi yang terdapat dalam mengkudu seperti protein, vitamin, mineral yang tersedia dalam jumlah cukup pada buah, salah satunya adalah selenium yang berfungsi sebagai antioksidan.⁴⁶ Selenium merupakan ko-faktor dari enzim glutathione peroksidase selain membantu mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas juga dapat menurunkan sintesis dari leukotrien B4 yang merupakan mediator inflamasi.⁴⁷

b. Terpenoid.

Terpenoid merupakan senyawa hidrokarbon isometrik terdapat pada lemak esensial, dapat membantu tubuh dalam proses sintesis organik dan pemulihan sel-sel tubuh.⁴⁶

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*. Bushnell melaporkan bahwa mengkudu secara tradisional digunakan untuk mengobati patah tulang, luka dalam, memar, dan luka.¹²

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.*⁴⁶

e. *Damnacanthal*

Jurnal Cancer Letter 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.⁴⁶

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.¹²

h. Antioksidan : asam askorbat, beta karoten, alkaloid, terpenoid, beta sitosterol, karoten, dan polifenol seperti flavonoid, flavon glikosida, rutinosa, dll. Penelitian akhir-akhir ini membuktikan rutinosa merupakan antioksidan kuat yang memerangi radikal bebas. Noni 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.^{13,41}

i. Polisakarida antara lain : galaktosa, arabinosa, rhamnosa dan asam glukoronat.¹³

Penelitian Noni yang dilakukan oleh Hirazumi et al dan Hirazumi dan Furusawa tentang efek polisakarida kaya etanol *insoluble* presipitat dari noni menemukan bahwa Morinda memiliki mekanisme anti kanker dan efek imunitas. *Polisakarida* yang dihasilkan dari jus buah noni dapat menghambat pelepasan sitokin seperti TNF- α ¹²

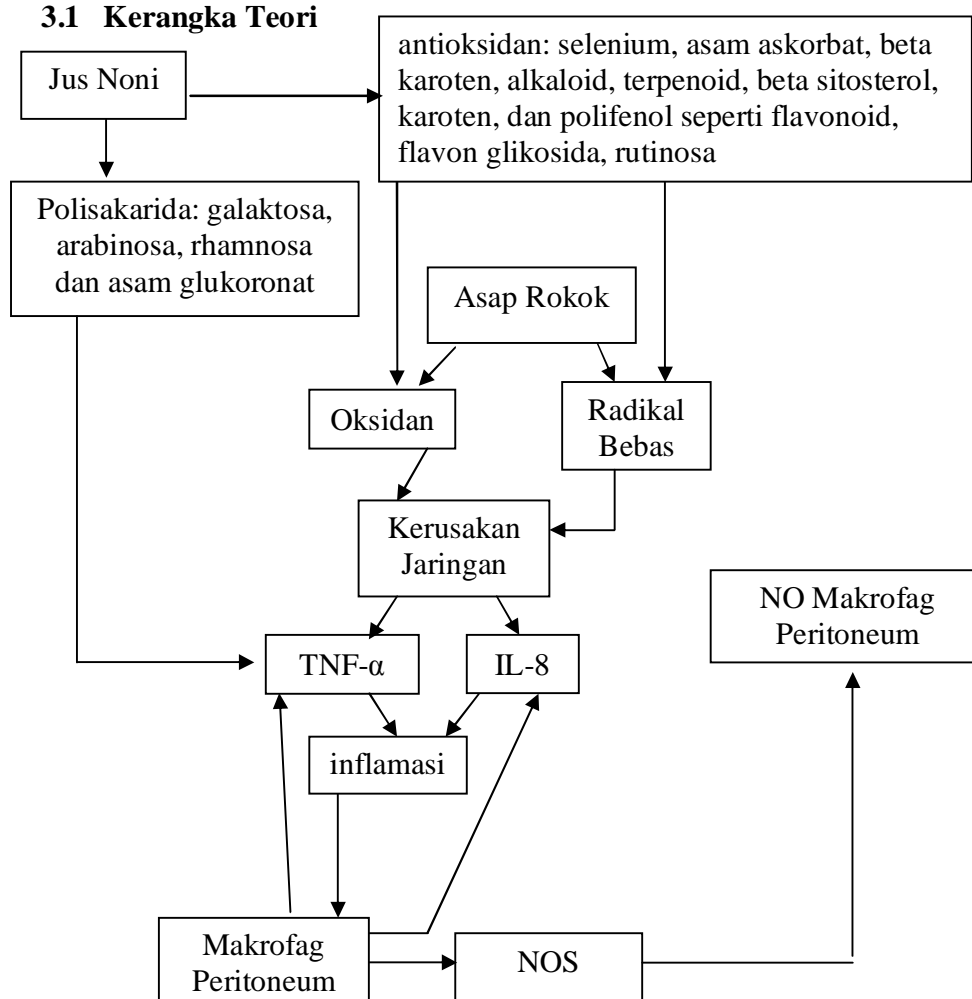
Uji farmakokinetik untuk mengetahui frekuensi konsumsi dan dosis harian dari jus noni telah dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa frekuensi konsumsi jus noni lebih penting daripada jumlah yang diminum. Konsentrasi *scolopetin* dalam beberapa organ mengindikasikan bahwa noni diserap oleh jaringan yang berbeda sekitar 1 jam setelah dikonsumsi.¹¹ Menurut penelitian Hokama, aktifitas imunologi dari ekstrak alkohol dari buah noni/mengkudu yang sudah

dilaporkan adalah penghambatan TNF- α yang merupakan promotor tumor endogen dan berperan dalam reaksi inflamasi. Hasil penelitian Wang menyatakan bahwa antioksidan dalam jus noni dapat melindungi individu dari asap rokok dengan *scavenging* oksigen bebas radikal peroksida lipid dan *quenching*. Hasil ini menunjukkan bahwa jus noni dapat melindungi individu dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh asap tembakau.¹³ Buah noni biasa dikonsumsi dalam bentuk jus. Jus noni ini dibuat dengan menggunakan buah noni tanpa biji dan kulit. Penelitian pada manusia dengan pemberian jus noni selama 30 hari pada kelompok kontrol placebo dan perlakuan dari 285 perokok berat menunjukkan ambang batas aktivitas antioksidan dari TNJ dicapai pada dosis harian 29,5 ml¹⁵

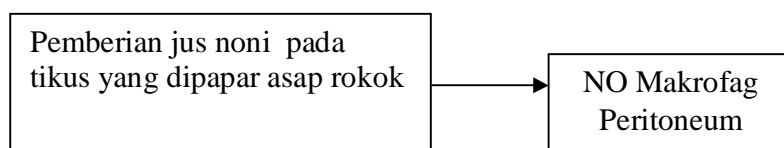
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori



3.2 Kerangka Konsep



3.3 Hipotesis

3.3.1 Hipotesis Mayor

Hipotesis mayor pada penelitian ini adalah ada pengaruh pemberian jus noni terhadap produksi *Nitric Oxide* (NO) makrofag peritoneum pada tikus galur Wistar yang diberi paparan asap rokok.

3.3.2 Hipotesis Minor

Hipotesis minor pada penelitian ini:

- 1) Ada perbedaan produksi *Nitric Oxide* (NO) makrofag peritoneum pada tikus galur Wistar yang diberi paparan asap rokok antara kelompok yang diberi jus noni dosis bertingkat dan tidak diberi jus noni.
- 2) Ada perbedaan produksi *Nitric Oxide* (NO) makrofag peritoneum pada tikus galur Wistar yang diberi paparan asap rokok antara kelompok yang diberi jus noni dosis bertingkat.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Ruang Lingkup Penelitian

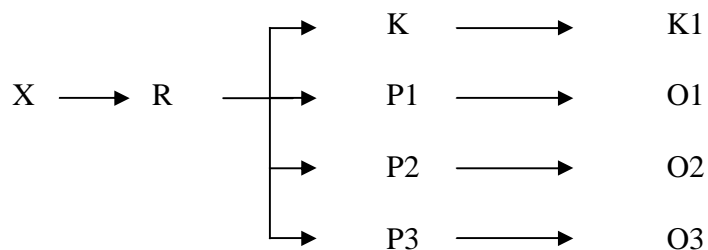
Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah Ilmu Farmakologi, Imunologi dan Histologi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan dan intervensi hewan coba telah dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang selama 30 hari, sedangkan tempat pemeriksaan NO makrofag telah dilaksanakan di Laboratorium Cebior Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang . Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2011.

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 noni pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok. Parameter pengukuran variabel berupa produksi NO (*Nitric Oxide*) makrofag peritoneum



Keterangan :

X → R : masa adaptasi selama 1 minggu

R : randomisasi

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

P1 : Perlakuan 1, tikus diberi pakan standar, diberi paparan asap rokok kretek dua kali dalam sehari pada pagi dan sore hari selama 30 hari, dan pemberian jus noni dengan dosis 1 ml/ hari melalui sonde 30 menit setelah diberi paparan asap rokok dengan dosis terbagi 2 sehubungan pemaparan asap rokok 2 kali sehari.

P2 : Perlakuan 2, tikus diberi pakan standar, diberi paparan asap rokok, kretek dua kali dalam sehari pada pagi dan sore hari selama 30 hari, dan pemberian jus noni dengan dosis 2 ml / hari melalui sonde 30 menit setelah diberi paparan asap rokok dengan dosis terbagi 2 sehubungan pemaparan asap rokok 2 kali sehari.

P3 : Perlakuan 3, tikus diberi pakan standar, diberi paparan asap rokok, kretek dua kali dalam sehari pada pagi dan sore selama 30 hari, dan pemberian jus noni dengan dosis 4 ml / hari melalui sonde 30 menit setelah diberi paparan asap rokok dengan dosis terbagi 2 sehubungan pemaparan asap rokok 2 kali sehari.

4.4 Populasi Dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian ini adalah tikus wistar yang diberi paparan asap rokok. Jumlah sampel yang digunakan berdasarkan WHO⁵¹, minimal 5 ekor per kelompok

yang diambil secara acak. Sampel dibagi dalam 4 kelompok yaitu kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan

4.4.1 Cara Pengambilan Sampel

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.

Kriteria eksklusi meliputi :

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

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas :

- Jus noni

4.5.2 Variabel Tergantung:

- Produksi NO makrofag peritoneum

4.6 Definisi Operasional

1. Pemberian jus noni adalah pemberian *Tahitian Noni Juice* (jus didapatkan dari pasaran) melalui sonde yang diberikan pada menit ke 30 menit setelah pemaparan

asap rokok dengan dosis; pada kelompok 1 sejumlah 1 ml/hari; kelompok 2 sejumlah 2 ml/hari; kelompok 3 sejumlah 4 ml / hari dalam dosis terbagi 2 sehubungan pemaparan asap rokok yang dilakukan sebanyak 2 kali.

Skala : Rasio

2. Produksi NO makrofag peritoneum adalah jumlah NO yang terdapat dalam supernatan kultur makrofag *peritoneum* yang diukur dengan Metode Griess dan dibaca absorbansinya menggunakan *automated microplate reader* (*Elisa reader*) pada panjang gelombang 550 nm.

Skala : Rasio

- 3.. Asap rokok adalah asap rokok kretek tanpa filter yang dipaparkan dengan dosis 2 batang dalam sehari, pada jam 09.00 wib dan jam 14.00 wib selama 30 hari.

Pemeriksaan variabel produksi NO makrofag peritoneum dilakukan oleh peneliti dan analis yang berpengalaman dari Laboratorium Cebior Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

4.7 Prosedur Pengumpulan Data

4.7.1 Bahan dan Reagen Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan adalah *Tahitian Noni Juice* (TNJ), pakan standar untuk tikus galur wistar, rokok kretek tanpa filter, cairan *peritoneum*.

Reagen yang digunakan adalah alkohol 70%, larutan *Free Hank's balanced salt solution* (CMF-HBSS), larutan asam asetat 3%, larutan *Roswell*

Park Memorial Institute (RPMI) 1640(GIBCO), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10 %, glutamin (GIBCO), penisilin-streptomisin (GIBCO), reagen Griess

4.7.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah kandang hewan, sonde lambung, semprit steril 1 cc, semprit steril 10 cc dengan jarum ukuran 18G/20G, seperangkat alat bedah steril, mikroskop cahaya, tabung reaksi, tabung sentrifus 50 ml steril, tabung berlapis silikon, inkubator CO₂, sentrifus, *microplate* dasar rata, *ELISA reader*, mikropipet, pipet pasteur steril, *Laminar flow hood*.

4.7.3 Jenis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah data primer dari laboratorium.

4.7.4 Cara Kerja

- 1) Sampel diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standar.
- 2) Dilakukan pengelompokan dengan acak sederhana, 20 ekor tikus dibagi dalam 4 kelompok.
- 3) Semua tikus diterminasi dengan cara dislokasi servikal. Sebelum diterminasi tikus dianestesi terlebih dahulu.
- 4) Kelompok K diberi pakan standar dan paparan asap rokok dengan dosis dua kali dalam sehari pada pagi dan sore hari selama 30 hari. Hari ke 31, cairan *peritoneum* tikus diambil untuk dilakukan pemeriksaan NO makrofag.

- 5) Kelompok P1 diberi pakan standar dan paparan asap rokok dengan dosis dua kali dalam sehari pada pagi dan sore hari. Pada menit ke 30 setelah pemaparan asap rokok diberikan jus noni melalui sonde lambung dengan dosis 1 ml/hari dengan dosis terbagi 2 sehubungan pemaparan asap rokok yang dilakukan 2 kali sehari. Pemaparan asap rokok dan pemberian jus noni dilakukan selama 30 hari. Hari ke 31, cairan *peritoneum* tikus diambil untuk dilakukan pemeriksaan NO makrofag.
- 6) Kelompok P2 diberi pakan standar dan paparan asap rokok dengan dosis dua kali dalam sehari pada pagi dan sore hari. Pada menit ke 30 setelah pemaparan asap rokok diberikan jus noni melalui sonde lambung dengan dosis 2 ml/hari dengan dosis terbagi 2 sehubungan pemaparan asap rokok yang dilakukan 2 kali sehari. Pemaparan asap rokok dan pemberian jus noni dilakukan selama 30 hari. Hari ke 31, cairan *peritoneum* tikus diambil untuk dilakukan pemeriksaan NO makrofag.
- 7) Kelompok P3 diberi pakan standar dan paparan asap rokok dengan dosis dua kali dalam sehari pada pagi dan sore hari. Pada menit ke 30 setelah pemaparan asap rokok diberikan jus noni melalui sonde lambung dengan dosis 4 ml/hari dengan dosis terbagi 2 sehubungan pemaparan asap rokok yang dilakukan 2 kali sehari. Pemaparan asap rokok dan pemberian jus noni dilakukan selama 30 hari. Hari ke 31, cairan *peritoneum* tikus diambil untuk dilakukan pemeriksaan NO makrofag.

4.7.4.1 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.

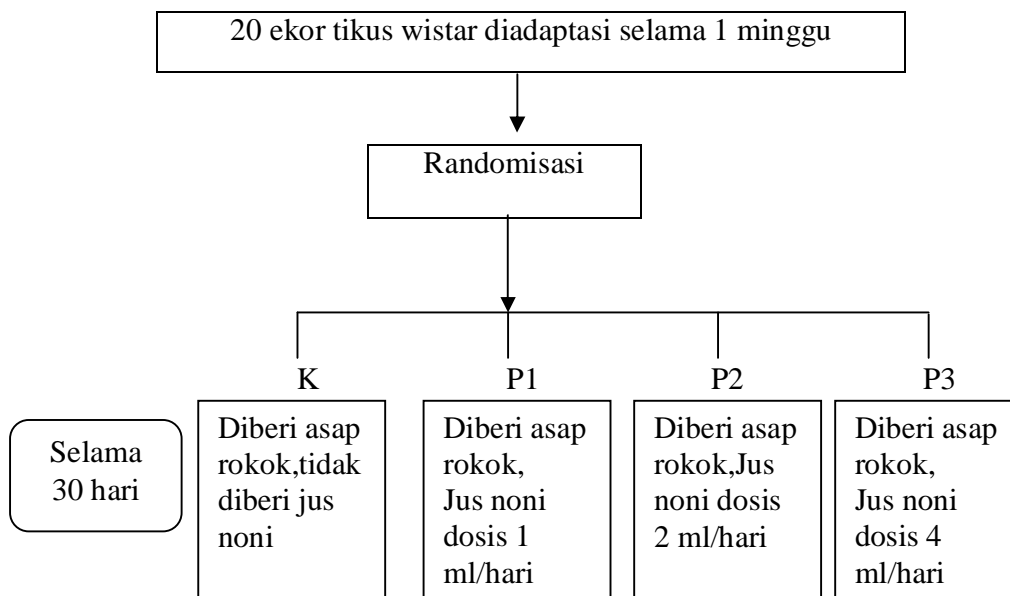
4.7.4.2 Prosedur Isolasi Makrofag Peritoneal Mencit

Terlampir.

4.7.4.3 Prosedur pengukuran produksi NO makrofag

Terlampir.

4.8 Alur Penelitian



Hari ke
31

Keter

Semua tikus diterminasi untuk diambil cairan peritoneum untuk kultur makrofag untuk pemeriksaan produksi NO makrofag

angan:

1. Pemberian paparan asap rokok dilakukan 2 kali sehari pada jam 09.00 dan 15.00 wib.
2. Pemberian jus noni dilakukan pada menit ke 30 setelah diberi paparan asap rokok.

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.

Analisis deskriptif menampilkan nilai rerata dan simpang baku dari variabel tergantung produksi NO, hasil ditampilkan dalam Box-Plot. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilks*. Data yang terdistribusi normal dilakukan uji *One Way Anova* dilanjutkan *post hoc test Bonferroni*, atau bila distribusi data tidak normal akan dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Nilai signifikasi dalam penelitian dengan hasil analisis $p < 0,05$.

4.10 Etika Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba yang dipelihara pada kandang yang memadai dan diberi makan minum secara cukup dengan pakan standar. Sampel pemeriksaan menggunakan cairan *peritoneum* hewan coba yang diambil dari rongga paru dilakukan oleh analis yang berpengalaman. Prosedur pengambilan cairan *peritoneum* mengharuskan hewan coba diterminasi dengan cara dislokasi bagian leher namun sebelumnya dianestesi terlebih dahulu.

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. Penelitian Herlisa Anggraini menggunakan sampel cairan *bronkoalveolar* untuk pemeriksaan NO dan ROI.

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Analisis Sampel

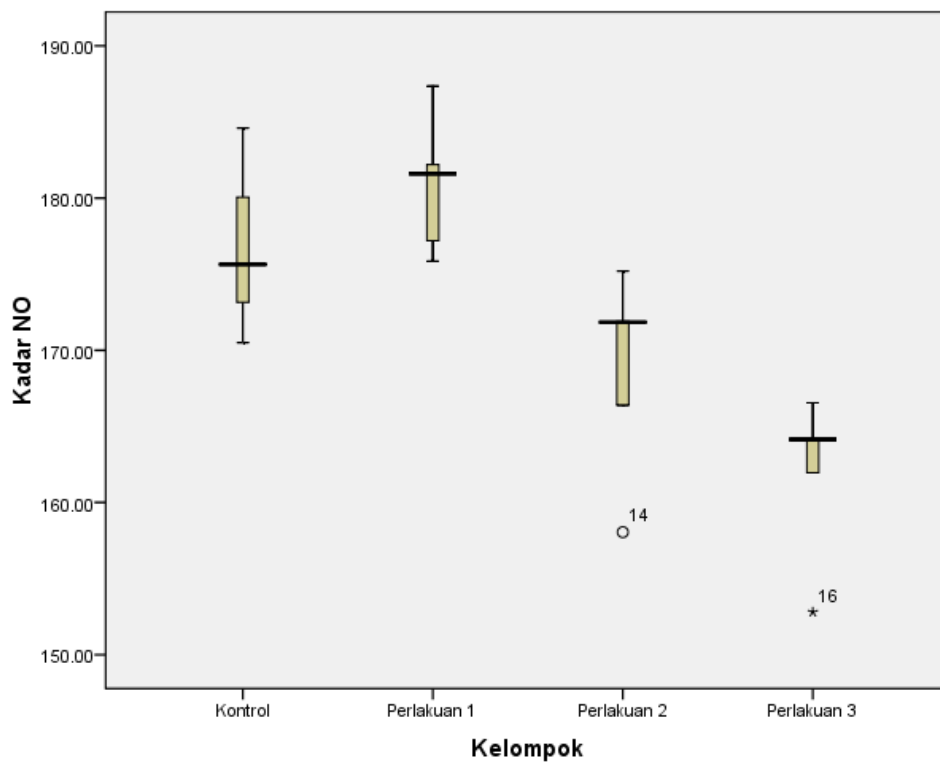
Jumlah sampel pada penelitian ini yaitu 20 ekor tikus wistar jantan yang dipelihara di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang selama 30 hari dan tidak ada sampel yang dieksklusi ataupun *drop out*. Kemudian sampel dibagi menjadi empat kelompok secara acak. Selama penelitian ini berlangsung, tidak terdapat satu ekor tikus wistar pun yang mati sehingga terminasi seluruh sampel dilakukan pada hari ke-31 penelitian.

5.2 Analisis Deskriptif

Analisa deskriptif menunjukkan rerata dan simpangan baku dari variable tergantung produksi *Nitric Oxide* (NO) makrofag peritoneum. Hasil ditampilkan dalam box plot. Dari sampel 20 ekor tikus wistar jantan didapatkan kadar NO dengan ELISA reader.

Tabel 3. Analisis Deskriptif NO Makrofag Peritoneum

Kelompok	N	Maksimum	Minimum	Rata-rata	SD
Kontrol	5	184.60	170.50	176.79	5.60663
Perlakuan 1	5	187.35	175.85	180.84	4.55404
Perlakuan 2	5	175.20	158.05	168.68	6.72910
Perlakuan 3	5	166.55	152.80	161.95	5.35159



Grafik 1. Grafik Box-Plot Kadar NO Makrofag Peritoneum

5.3 Analisis Inferensial

Uji normalitas data melalui uji *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50. Data yang diuji normalitasnya adalah kadar NO makrofag peritoneum.

Tabel 4. Uji Normalitas Shapiro Wilks

Kelompok	<i>Shapiro-Wilk</i>		
	Statistic	df	Sig.
<i>Kadar NO</i> <i>Kontrol</i>	.969	5	<i>.867</i>
<i>Perlakuan 1</i>	.944	5	<i>.696</i>
<i>Perlakuan 2</i>	.894	5	<i>.378</i>
<i>Perlakuan 3</i>	.780	5	<i>.109</i>

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Dari uji normalitas Shapiro Wilks didapatkan distribusi kadar NO makrofag peritoneum normal ($p > 0.05$).

Tabel 5. Uji Post Hoc

K-P	Kontrol	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
Kontrol	--	0.271	0.036*	0.001*
Perlakuan 1	0.271	--	0.003*	0.000*
Perlakuan 2	0.036*	0.003*	--	0.075
Perlakuan 3	0.001*	0.000*	0.075	--

*terdapat perbedaan signifikan $p < 0.05$

Melalui uji distribusi dan normalitas data didapatkan data adalah normal, maka dilanjutkan uji parametrik One way Anova . Dari uji One way Anova didapatkan $p = 0.000$. Hasil ini signifikan secara statistik dan diperlukan uji beda lanjutan menggunakan uji Post Hoc. Melalui uji Post Hoc kelompok kontrol (K) dibandingkan kelompok perlakuan 1 (P1) tidak didapatkan perbedaan yang signifikan $p = 0.271$ ($p > 0.05$). Antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 2 (P2)

didapatkan perbedaan signifikan $p= 0.036$ dan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 3 (P3) didapatkan perbedaan signifikan $p= 0.001$. Antara P1 dan P2 didapatkan perbedaan yang signifikan ($p=0.003$). Antara P1 dan P3 didapatkan perbedaan yang signifikan ($p=0.000$). Antara P2 dan P3 tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ($p=0.075$). Nilai p dapat dilihat dalam tabel 4. Perbedaan antar kelompok dikatakan signifikan apabila $p<0.05$.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian sebelumnya menunjukkan kadar NO yang diisolasi dari sel makrofag peritoneum tikus yang hanya diberi pakan standar dan akuades adalah 40-50 mM/L.⁵¹ Pada penelitian ini, kadar NO yang dibaca dengan ELISA Reader didapatkan kadar NO yang jauh lebih tinggi dari Wistar yang tidak diberi paparan asap rokok. Asap rokok mengandung oksidan yang diperkirakan jumlahnya 10^{15} - 10^{18} molekul radikal bebas per satu hisapan. Asap rokok selain mengandung radikal bebas juga dapat memicu tubuh untuk menghasilkan radikal bebas.⁵² Asap rokok dapat mempengaruhi metabolisme makrofag dengan mengaktifkan makrofag untuk melepaskan leukotrien B₄, IL-8 dan TNF- α . menyebabkan meningkatnya produksi superoksida (O_2^-) dan H_2O_2 , juga menyebabkan kerusakan oksidatif makromolekul seperti lipid, protein, dan DNA, karena dapat menghilangkan antioksidan, serta membentuk radikal bebas seperti nitrit oksida (NO), nitrit peroksida (NO_2) dalam fase gas serta quinone (Q), semiquinone (HQ) dan hydroquinone (HQ_2) dalam fase tar.^{2,3,4} *Nitric oxide* inilah yang berperan sebagai radikal bebas di dalam asap rokok dan yang dihasilkan tubuh karena paparan asap rokok. Radikal bebas yang dibentuk oleh karena paparan asap rokok ini diperantarai proses inflamasi. *Nitric Oxide* dibentuk oleh makrofag yang diperantarai oleh *Nitric Oxide Synthase*. *Nitric Oxide Synthase*

(NOS) pada manusia (dan tikus) mempunyai tiga macam bentuk, yaitu: 1) *Neuron Nitric Oxide* (nNOS atau NOS-1) yang ditemukan pada sel saraf berperan sebagai neuromodulator atau neuromediator,²⁷ 2) *Endothelial Nitric Oxide* (eNOS atau NOS-3) yang ditemukan pada sel endotel pembuluh darah berfungsi mempertahankan tekanan pembuluh darah tetap rendah dan mencegah perlengketan leukosit serta platelet ke dinding pembuluh darah.^{27,28,29} dan 3) *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS atau NOS-2) yang ditemukan pada makrofag. Makrofag banyak terdapat pada rongga peritoneum sehingga isolasi makrofag dilakukan dengan kultur dari supernatan cairan peritoneum. Stimulasi makrofag oleh IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , dan *Lipopolysaccharide* (LPS) akan memacu transkripsi gen yang menyebabkan peningkatan kadar *Nitric Oxide Synthase* (NOS). Sekresi NO akan meningkat mengikuti peningkatan NOS^{5,30,31}. Adanya rangsangan inflamasi akan menghasilkan NO seribu kali lebih banyak. Inflamasi yang terjadi karena paparan asap rokok diperantarai oleh TNF- α dan IL-8 yang diproduksi dan mengaktifkan makrofag. Kelebihan jumlah NO akan diubah menjadi bentuk peroksinitrit (ONOO⁻) yang mempunyai efek sitotoksik.²⁷ Penelitian yang dilakukan oleh *International Agency for Research on Cancer* (IARC) pada hewan percobaan, terutama tikus memberikan hasil bahwa asap rokok menimbulkan efek biologis yaitu adanya peningkatan aktivasi enzim antioksidan, peningkatan ekspresi oksida nitrat sintase dan berbagai protein kinase kolagenase.⁴³

Uji ANOVA didapatkan $p < 0.05$ maka didapatkan perbedaan yang signifikan kadar NO antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Selanjutnya melalui Post Hoc Test didapatkan perbedaan yang signifikan kadar NO antara kelompok kontrol dengan kelompok 2 dan kelompok 3 ($p < 0.05$). Sebaliknya tidak terdapat perbedaan yang signifikan kadar NO antara kelompok kontrol dengan kelompok 1 ($p > 0.05$). Pada uji Post Hoc juga didapatkan perbedaan yang signifikan antara kelompok 1 dengan kelompok 2 dan kelompok 3. Namun berbeda halnya antara kelompok 2 dan kelompok 3 yang tidak didapatkan perbedaan yang signifikan. Perbedaan kadar NO antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 1 tidak signifikan karena dosis jus noni yang diberikan terlalu sedikit sehingga tidak dapat mengatasi inflamasi dan menetralkan NO yang terbentuk. Antara kelompok 2 dan kelompok 3 tidak terdapat perbedaan signifikan karena dosis optimum pada penelitian ini untuk mendapat perbedaan kadar NO adalah 2 ml. Penambahan dosis jus noni yang diberikan tidak memberikan perbedaan yang signifikan. Hal ini didukung oleh uji farmakokinetik untuk mengetahui frekuensi konsumsi dan dosis harian dari jus noni. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa frekuensi konsumsi jus noni lebih penting daripada jumlah yang diminum.¹¹ Perbedaan yang tidak signifikan antara beberapa kelompok dimungkinkan karena rentang dosis yang diberikan terlalu kecil sehingga tidak didapatkan perbedaan yang signifikan.

Kadar NO yang berbeda pada kelompok yang diberi jus noni didukung oleh hasil penelitian di USA tahun 2002 menyatakan bahwa antioksidan dalam jus noni

dapat melindungi individu dari asap rokok dengan *scavenging* oksigen bebas radikal peroksida lipid dan *quenching*. Hasil ini menunjukkan bahwa jus noni dapat melindungi individu dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh asap tembakau.¹¹ Antioksidan yang terkandung dalam buah noni antara lain asam askorbat, beta karoten, alkaloid, terpenoid, beta sitosterol, karoten, dan polifenol seperti flavonoid, flavon glikosida, rutinosa.¹³ Hasil penelitian membuktikan bahwa jus noni sangat potensial untuk menghambat radikal bebas. Aktivitas antioksidan TNJ dibandingkan dengan tiga jenis antioksidan, yaitu; vitamin C, bubuk biji anggur dan piknogenol, yang diukur dengan menggunakan aktivitas penghambatan superoxide anion radicals (SAR), adalah 2,80x lebih kuat dari vitamin C, 1,40x lebih besar dari piknogenol, dan 1,10x lebih besar dari biji anggur.¹³ Salah satu penelitian yang dilakukan oleh Palu et al membuktikan bahwa secara in vivo pemberian *Tahitian Noni Juice* (TNJ) melalui *oral ad libitum* selama 16 hari dapat menekan produksi IL-4 yang berperan dalam respon alergi dan inflamasi pada saluran pernafasan, tetapi meningkatkan produksi IFN- γ yang berperan dalam mengaktifkan makrofag, sehingga membuktikan bahwa TNJ dapat memodulasi sistem kekebalan tubuh.¹² Menurut penelitian, aktifitas imunologi dari ekstrak alkohol dari buah noni/mengkudu yang sudah dilaporkan adalah penghambatan TNF- α yang merupakan promotor tumor endogen dan berperan dalam reaksi inflamasi. *Polisakarida* yang dihasilkan dari jus buah noni dapat menginhibisi pelepasan sitokin seperti TNF- α ¹³ Melalui mekanisme inilah kadar NO pada kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol karena

jus noni mampu menghambat reaksi inflamasi. Reaksi inflamasi dapat meningkatkan produksi NO. Produksi NO yang lebih rendah pada kelompok perlakuan menunjukkan pengaruh jus noni terhadap proses inflamasi yang terjadi akibat paparan asap rokok. Selain itu kandungan antioksidan dalam jus noni mampu menetralkan NO yang merupakan senyawa radikal bebas sehingga pada kelompok perlakuan didapatkan kadar NO yang lebih rendah daripada kelompok kontrol. Hasil penelitian ini sesuai hipotesis dimana ada pengaruh pemberian jus noni terhadap produksi NO makrofag peritoneum pada tikus Wistar yang diberi paparan asap rokok. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Antara kelompok yang diberi jus noni juga menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Penelitian ini memiliki keterbatasan pada pemberian dosis dan frekuensi jus noni yang kurang bervariasi, mengakibatkan tidak dapat menganalisis penambahan dosis yang dapat diberikan untuk mendapatkan perbedaan yang signifikan kadar NO. Penelitian ini juga tidak dapat memberikan kisaran dosis jus noni yang dibutuhkan untuk menurunkan kadar NO secara signifikan. Frekuensi dalam memberikan jus noni yang dapat memberikan perbedaan kadar NO yang signifikan juga tidak diketahui secara pasti.

BAB VII

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

1. Terdapat pengaruh pemberian jus noni terhadap produksi NO makrofag peritoneum pada tikus wistar yang diberi paparan asap rokok.
2. Penelitian ini didapatkan perbedaan kadar NO makrofag peritoneum yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 2 dan kelompok perlakuan 3. Antara Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan 1 tidak terdapat perbedaan kadar NO makrofag peritoneum yang signifikan.
3. Perbedaan kadar NO makrofag peritoneum yang signifikan didapatkan antara kelompok perlakuan 1 dan kelompok perlakuan 2 dan 3. Antara kelompok perlakuan 2 dan 3 tidak didapatkan perbedaan kadar NO makrofag peritoneum yang signifikan.

7.2 Saran

1. Penelitian dengan desain serupa terhadap potensi jus noni dalam mempengaruhi NO makrofag peritoneum dapat dilakukan dengan dosis dan frekuensi yang lebih bervariasi.
2. Perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut akan potensi buah noni yang lain bagi kesehatan manusia terutama dalam bidang imunologi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gondodiputro S. Bahaya tembakau dan bentuk-bentuk sediaan tembakau. Bagian Ilmu Kesehatan Masyarakat Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran. Bandung. 2007;1-2, 9-112
2. Muhammad I. Efek Antioksidan Vitamin C Terhadap Tikus (*Rattus norvegicus*L) Jantan Akibat Pemaparan Asap Rokok [dissertation]. Bandung; 2009
3. Rima A, Suradi, Eddy S, dan Faisal Y. Korelasi Antara Jumlah Makrofag, Neutrofil Dan Kadar Enzim Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 Pada Cairan Kurasan Bronkial Perokok. Surakarta. J Respir Ind .2007;27(3):3
4. Dietrich M, Gladys B, Edward PN, Mark H, Maret GT, Carroll EC, dan Lester P. Smoking and exposure to environmental tobacco smoke decrease some plasma antioxidants and increase tocopherol in vivo after adjustment for dietary antioxidant intakes. Am J Clin Nutr .USA. 2003;77:160–6.
5. Herman AG. SIRS dan Sepsis (Imunologi, Diagnosis dan Penatalaksanaan). Sebelas Maret University Press. Edisi pertama. Solo.2006.
6. Vincent JL, Zhang J, Szabo C, Preiser JC. Effect of Nitric Oxide in Septic Shock. Am J Respir Crit Care Med. 2000;16(1):1781-85.
7. Purboyo A. Efek Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu *Psidijium (guajava L.)* pada Kelinci yang dibebani glukosa [dissertation]. Surakarta; 2009
8. Büyükbas S, Kürsat U, Elif D, Kemal B, Oxidative Stress and Antioxidant Status in Bronchoalveolar Lavage Fluid, Plasma and Erythrocyte of Critically Mixed Ill With Respiratory Failure. Turkey. Eur J Gen Med. 2008;5(3):140-146
9. Suhartono E, Fachir H, Setiawan B. Rokok sebagai sumber radikal bebas dalam Kapita selekta biokimia : Stres oksidatif dasar & penyakit. Banjarmasin: Pustaka Banua. 2007; 117-8
10. Kurniawan A. Aktivitas Antioksidan dan Potensi Hayati dari Kombinasi Ekstrak Empat Jenis Tanaman Obat. Bogor :IPB; 2011
11. Wang MY, West BJ, Jensen J, Diane N, Su C, Palu AK et al. *Morinda*

citrifolia (Noni): A literature review and recent advances in Noni research
Acta Pharmacol. USA. 2002;1127-1141

12. 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. *J Ethnopharmacol.* 2008;115(3):502-6

13. Wang M.Y dan C. Su. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (noni). *Ann.NY Acad. Sci.* 2001;(952): 161-168

14. Adnyana IK, Yulinah E, Soemardji A, Kumolasasi E, Iwo MI, Iskendarso J, et al. Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L). ITB. 2004

15. Wang MY, Lutfiyya MN, Hoper VW, Anderson G, Su C, West BJ. Antioxidant activity of noni juice in heavy smokers. *Chem Cent J.* 2009; 3:

16. Palu AK, Santiago RA, West BJ, Kaluhiokalani N, Jensen J. The Effects of *Morinda citrifolia* L.(Noni) on High Blood Pressure. *ACSS.* 2008;(9):93

17. Wang MY, Peng L, Lutfiyya MN, Henley E, Hoper VW, Anderson G. *Morinda citrifolia*(Noni) fruit juice lowers cancer risk in current smokers by reducing *Malondialdehyde* (MDA)-DNA adducts. *ACCR Annual Meeting.* Los Angeles. 2007; April 14-18

18. Palu AK, Seifulla RD, West BMJ. *orinda citrifolia* L.(noni) improves athlete endurance: Its mechanisms of action. *J Med Plants Research.*2008;2(7):154-158

19. Yueniwati Y, Ali M. Pengaruh paparan asap rokok kretek terhadap peroksidasi lemak dan sistem proteksi superoksida dismutase hepar tikus wistar. *J Ked YARSI.* 2004; 12(1):85-92.

20. Anggraini H. Pengaruh pemberian jus mengkudu (*Morinda citrifolia* L) terhadap *nitric oxide* (NO) dan *reactive oxygen intermediate* (ROI) Makrofag tikus yang terpapar asap rokok. UNDIP.2011

21. Harjanto. Pemulihan stress oksidatif pada latihan olahraga. *J Ked YARSI.*2004;12(3):81-87

22. Suyatna FD. Patobiologi radikal bebas. Simposium peranan radikal bebas dan antioksidan pada sejumlah penyakit. Jakarta. 2001

23. Halliwell B , Gutteridge .Oxygen is a toxic gas an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species.In: Free radical in biology and medicine. New York: Oxford University Press inc. 1999;1-35
24. Yusuf A M , Widodo JP, Doddy MS [internet]. Hubungan radikal bebas dan antioksidan dengan kerusakan ginjal pada obstruksi akut; eksperimen pada hewan coba.Indonesia[updated 2010 Agt 12; c ited 2011 Feb 1]. Available from: <http://www.urologi.or.id>
25. Mayes PA . Structure & Function of The Lipid-Soluble Vitamins. Dalam: Murray KM, Granner DX, Mayes PA, Rodwell VW. Harpers Biochemistry 23rd ed. Conne cticut: Appleton & Lange, 1993; 5925
26. James F [internet]. Prescription for Nutritional He aling By Phyllis. New York [updated 2010 Jan 18; cited 2011 Mar 13].Available from: <http://www.medikaholistik.com/>. 18010
27. Oca MM, Torres SH, Sanctis D, Mata A, Hernandez N, Talamo C. Skeletal muscle inflamma tion and nitric oxide in pa tients with COPD. Eur Respir J 2005;(26) :390-7
28. Devlin TM . Biochemistry with Clinical Correlation, th5ed. Canada: Wiley-Liss; 2002; 407-88.
29. Ishimura Y, Shimada H, Suematsu M, editors. Oxygen homeostasis and its dyna mics. Tokyo, Japan: Springer-Verlag. 1998; 289-92.
30. Garrel C, Fontecave M. Nitric Oxide : chemistry and biology. Switzerland: Birkha use r Verlag Base l. 1995; 22-8.
31. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunologyth. e d6. Toronto; Mosby Elsevier Science Limited. 2001; 1-13
32. Dash P . Nitric Oxide. Basic Me dical Scienc es. London : St.George 's, University of London [updated 2009 Jul 26; cited 2011 Jan 25] available from : <http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash> .
33. Baratawidjaja KG. Imunologi Dasar edisi 7. Jakarta: Balai Pe nerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2006
34. Rokok [internet] Indonesia : Wikipedia Rokok [updated 2010 Nov 14;

cited 2011 Jan 13]. Available from <http://id.wikipedia.org/wiki/rokok>

35. Yoshida T dan Tudor RM. Pathobiology of Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland PhysRev.2007;87:1047-1082

36. Van der vielt A. Nitrogen Oxides a nd cigare tte smoke-induced injury. California. USA. 1998

37. Repine J, Bast A, Lankhorst I. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Am J Respire Crit Care Me d.1997;156:341-57

38. Sitepoe M.1997.Usa ha Mencegah Bahaya Merokok. Jakarta : Gramedia.1997; 21-5

39. Ada Apa Dengan Rokok [internet].Indonesia:ppdparsi c 2003[updated 2003 Sep 24;cited 2011 Jan 13]. Available from [http:// www.re dbondowoso.or.id](http://www.re dbondowoso.or.id).

40. Widodo E, Priosoeryanto BP, Estuningsih S, Agungpriyono DR, Utji R. Effect of clove cigarette exposure on white ra t: special emphasis on the histopathology of re spiratory tract. Med J of Indonesia .2007;16(4):212-18

41. Rusiawati Y. Pengaruh Merokok terhadap Kesehatan. Puslit Penyakit Tidak Menular dan Dept. of Sc ience and Environment Australia. Jakarta.Cermin Dunia Kedokteran .1990;62:30-32

42. Sugiura H dan Ichinose M. Nitrative stress in inflammatory lung diseases. Third Depa rtment of Internal Medicine:Wa kayama Medical University School of Medicine. 2010

43. International Agency for Resea rch on Cancer (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. WHO. 2002;83

44. Wa ha MG dan Wijayanti L. Sehat de ngan Mengkudu. Jakarta: MSF Group. 2000

45. Mengkudu [internet] Indone sia : Wikipedia Mengkudu [updated 2010 Okt 14; cited 2011 Jan 13]. Available from <http://id.wikipedia.org/wiki/mengkudu>

46. Bangun AP dan Sarwono B. Khasiat dan Manfaat Mengkudu. Jakarta: Agro Media Pustaka ; 2004; 6-24

47. Selenium [interne t] Indonesia: UNSRI [updated 2010 Agt 23; cited 2011

Des 30]. Available from <http://digilib.unsri.ac.id/download/selenium.pdf>.

48. World Health Organization. Research Guidelines for Evaluation The Safety and Efficacy of Herbal Medicines. Manila. 1993; 33-44

49. Scientific Committee on Food on Tahitian Noni Juice [internet] Belgium:SCF [updated 2002 Dec 11;cited 2012 Jan 16]. Available from http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html

50. Bazzano LA, He J, Muntner P, Vupputuri S, Whelton PK. Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. *Ann Intern Med* 2003; 138: 891-97

51. Ismail A. Pengaruh *Gynura procumbens* (Lour.) Merritt terhadap Produksi Nitric Oxide Makrofag dari Mencit C3H yang Diinokulasi Sel Adenocarcinoma mammae [dissertation]. Indonesia: Fakultas kedokteran Universitas Diponegoro; 2003

52. Revianti S. Pengaruh Radikal Bebas pada Rokok terhadap Timbulnya Kelainan di Rongga Mulut. *Denta J Ked Gigi FKGUHT*. Surabaya. 2007;1(2)

53. Lewis JG. Isolation of Alveolar Macrophages, Peritoneal Macrophages, and Kupffer cells. In: *Methods in Immunotoxicology*. Vol 2. Editor: Burleson GR, Dean JH, Munson AE. New York. A John Wiley Liss & sons Inc Publ. 1995;15-26

54. Dietert RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Sung Y. Production of Reactive Nitrogen Intermediates by Macrophages. In: *Methods in Immunotoxicology*. Volume 2. editor : Burleson GR, Dean JH, Munson AE. A John Wiley Liss & sons Inc Publ. New York. 1995; 99-1117

LAMPIRAN 1

Prosedur Isolasi Makrofag Peritoneal Mencit⁵³

Untuk mendapatkan $1-3 \times 10^6$ sel/ml

Alat :

1. Gunting dan pinset
2. Semprit 10 ml steril dengan jarum ukuran 18 atau 20 gauge
3. Tabung sentrifus 50 ml steril
4. Pipet Pasteur steril
5. Tabung berlapis silikon
6. Hemacytometer
7. Laminar flow hood
8. Refrigerated centrifuge

Bahan/reagen :

1. Sodium pentobarbitol, 50 mg/ml
2. Ethanol, 70% (v/v)
3. Free Hank's balanced salt solution (CMF-HBSS), mengandung Ca^{2+} dan Mg^{2+} (GIBCO)
4. Asam acetat 3 % (v/v) + crystal violet 1 mg/100 ml
5. Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (GIBCO)
6. Fetal Bovine Serum, FBS
7. Glutamin (GIBCO)
8. Penicillin-Sterptomycin (GIBCO)

Prosedur :

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi cervix atau inhalasi dengan sodium pentobarbitol atau CO₂, dibaringkan telentang dan seluruh permukaan ventral disiram ethanol 70%
2. Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen. Robek kulit menggunakan 2 pinset ke arah kepala dan ekor mencit, sehingga kulit terkelupas, dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan ethanol 70% untuk menyingkirkan bulu-bulu yang rontok.
3. Injeksikan 2-3 ml CMF-HBSS dalam rongga peritoneum menggunakan semprit 10ml dg jarum No 18 atau 20 (lebih baik pakai No 26). Injeksi dilakukan di bagian perut bawah dimana lemak berada di sekitar kandung kemih. Lokasi ini dipilih karena setelah penyuntikan jarum akan ditarik dan abdomen/peritoneum dipijat, lemak akan melekat pd lubang jarum sehingga cairan tdk keluar selama pemijatan. , peritoneum dipijat pelan kemudian disemprot lagi dengan ethanol 70%.
4. Injeksikan 7-8 ml HBSS. Sedot kembali cairan dalam rongga peritoneum sampai habis dengan (dg jarum 18 / 20 ujung jarum menghadap ke atas/ventral), bila masih ada sisa cairan dihisap menggunakan pipet Pasteur steril. Masukkan cairan ke dalam tabung sentrifuse steril.
5. Cairan disentrifus 800 xg pada suhu 20° C selama 5 menit. Bila cairan terkontaminasi darah, maka cuci sel-sel tersebut 2 x menggunakan CMF-HBSS.
6. Tambahkan medium komplit yang terdiri dari RPMI 1640 mengandung penicilin ((50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml), glutamine (20 mM) dan 10% FBS
7. Hitung sel-sel dengan Hemacytometer setelah dilarutkan dalam 3% asam acetat untuk melisisikan sel darah merah.
8. Kultur sel dalam medium komplit dengan kepadatan 5×10^5 sel/ml selama 2 jam dalam CO₂ inkubator pada suhu 37°C

9. Cuci sel-sel tersebut dengan HBSS sebanyak 3 kali, kemudian tambahkan 1 ml medium komplit untuk selanjutnya dikultur dalam CO₂ inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

LAMPIRAN 2

Prosedur Pengukuran Produksi NO Makrofag (Metode Griess menurut Green et al dan Ding et al⁵⁴)

Bahan :

Reagen

- a. Reagen 1 : N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride = NED (Sigma): 0,1g dilarutkan dalam 100 ml distilled water
- b. Reagen 2 : Sulfanilamide (Sigma): 1 g dilarutkan dalam 100 ml 5% phosphoric acid
- c. Nitrit standard : Larutkan 69 mg NaNO₂ dalam 500 ml Distilled water (2 mM stock), kemudian buat pengenceran bertingkat dari 0 – 200 µM dengan cara melarutkan larutan stok menggunakan medium yg dipakai untuk kultur makrofag.

2. Supernatan Kultur Makrofag peritoneal

Cara Kerja :

Menggunakan *microplate* 96 wells dengan dasar rata, memasukkan 100 ul reagen Griess (*reagen chromogenic*) dalam tiap sumuran.

- 1) Memasukkan 100 ul supernatan kultur makrofag peritoneal yang akan dites dan nitrit standard ke dalam sumuran (*duplo*), menggunakan medium kontrol sebagai blanko.
- 2) Menunggu 5 menit pada suhu kamar untuk perubahan warna dan stabilisasi.
- 3) Mengukur absorbansinya pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader* (*ELISA reader*).
- 4) Membuat kurva standard menggunakan analisis regresi linier sederhana dari pembacaan nitrit standard, kemudian menghitung konsentrasi nitrit dalam sampel berdasarkan kurva standard atau formula regresi.

Cara membuat reagen *chromogenic* dan standard nitrit, sebagai berikut :

- a. Reagen1: N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride = NED (Sigma): 0,1 gram dilarutkan dalam 100 ml air suling.
- b. Reagen 2: Sulfanilamide (Sigma): 1 gram dilarutkan dalam 100 ml HCl 4 N.

Reagen 1 dan reagen 2 harus disimpan dalam almari pendingin dalam botol gelap dan dapat digunakan dalam 6 minggu atau selama tidak berubah warna menjadi lebih gelap.

Reagen *Chromogenic* (Reagen Griess) : mencampur dengan volume sama banyak antara reagen 1 dan reagen 2 setiap akan digunakan. Reagen ini siap digunakan dalam 1 jam setelah pencampuran.

c. Standard Nitrit : Melarutkan 69 mg NaNO_2 dalam 500 ml air suling (2mM stok), kemudian dibuat pengenceran bertingkat dari 0 – 200 uM dengan cara melarutkan larutan stok menggunakan medium yang dipakai untuk kultur makrofag.

LAMPIRAN 3

Kadar NO

Kelompok	Tikus ke-	Kadar NO (mM/L)
K	1	184.60
K	2	173.15
K	3	175.65
K	4	170.50
K	5	180.05
P1	1	181.60
P1	2	182.20
P1	3	187.35
P1	4	177.20
P1	5	175.85
P2	1	171.85
P2	2	171.90
P2	3	175.20
P2	4	158.05
P2	5	166.40
P3	1	152.80
P3	2	164.15
P3	3	166.55
P3	4	164.15
P3	5	161.95

LAMPIRAN 4

Output SPSS

Uji ANOVA

ANOVA

Kadar NO					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1068.526	3	356.175	11.299	.000
Within Groups	504.375	16	31.523		
Total	1572.901	19			

Descriptives

Kadar NO								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	5	1.7679E2	5.60663	2.50736	169.8285	183.7515	170.50	184.60
Kelompok 1	5	1.8084E2	4.55404	2.03663	175.1854	186.4946	175.85	187.35
Kelompok 2	5	1.6868E2	6.72910	3.00934	160.3247	177.0353	158.05	175.20
Kelompok 3	5	1.6192E2	5.35159	2.39330	155.2751	168.5649	152.80	166.55
Total	20	1.7206E2	9.09859	2.03451	167.7992	176.3158	152.80	187.35

Test of Homogeneity of Variances

Kadar NO

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.335	3	16	.801

Tests of Normality

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar NO	Kontrol	.181	5	.200 [*]	.969	5	.867
	Kelompok 1	.188	5	.200 [*]	.944	5	.696
	Kelompok 2	.281	5	.200 [*]	.894	5	.378
	Kelompok 3	.302	5	.153	.816	5	.109

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Uji Post Hoc

Multiple Comparisons

Kadar NO

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Kelompok 1	-4.05000	3.55097	.271	-11.5777	3.4777
	Kelompok 2	8.11000 [*]	3.55097	.036	.5823	15.6377
	Kelompok 3	14.87000 [*]	3.55097	.001	7.3423	22.3977
Kelompok 1	Kontrol	4.05000	3.55097	.271	-3.4777	11.5777
	Kelompok 2	12.16000 [*]	3.55097	.003	4.6323	19.6877
	Kelompok 3	18.92000 [*]	3.55097	.000	11.3923	26.4477
Kelompok 2	Kontrol	-8.11000 [*]	3.55097	.036	-15.6377	-.5823
	Kelompok 1	-12.16000 [*]	3.55097	.003	-19.6877	-4.6323
	Kelompok 3	6.76000	3.55097	.075	-.7677	14.2877
Kelompok 3	Kontrol	-14.87000 [*]	3.55097	.001	-22.3977	-7.3423
	Kelompok 1	-18.92000 [*]	3.55097	.000	-26.4477	-11.3923
	Kelompok 2	-6.76000	3.55097	.075	-14.2877	.7677

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 5

Ethical Clearance



**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO
DAN RSUP dr KARIADI SEMARANG**

Sekretariat : Kantor Dekanat FK Undip Lt.3
Jl. Dr. Soetomo 18. Semarang
Telp.024-8311523/Fax. 024-8446905



ETHICAL CLEARANCE No.041 /EC/FK/RSDK/2011

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP.
Dr. Kariadi Semarang, setelah membaca dan menelaah USULAN Penelitian
dengan judul :

**PENGARUH PEMBERIAN JUS MENGKUDU (MORINDA CITRIFOLIA L)
TERHADAP NITRIC OXIDE (NO) DAN REACTIVE OXYGEN INTERMEDIATE (ROI)
MAKROFAG TIKUS YANG TERPAPAR ASAP ROKOK**

Peneliti Utama : Herlisa Anggraini, S.KM
Pembimbing : dr. Neni Susilaningsih, M.Si
dr. Pudjadi, SU
Penelitian : Dilaksanakan di Laboratorium CEBIOR FK Undip
Semarang.

Setuju untuk dilaksanakan, dengan memperhatikan prinsip-prinsip yang
dinyatakan dalam Deklarasi Helsinki 1975, dan Pedoman Nasional Etik Penelitian
Kesehatan (PNEPK) Departemen Kesehatan RI 2004

Pada laporan akhir peneliti harus melampirkan cara pemeliharaan & dekapitasi
hewan coba.

Semarang, 13 April 2011

Komisaris Etik Penelitian Kesehatan
Fakultas Kedokteran Undip/RS. Dr. Kariadi
Ketua

Fakultas Kedokteran Undip
Dekan

dr. Endang Ambarwati, Sp.RM
NIP. 19560806 198503 2 001


Prof. Dr. dr. Ijahjono, Sp PA(K),FIAC
NIP.19450514 197308 1 001

LAMPIRAN 6

Foto Penelitian



Hewan coba dalam kandang



Persiapan proses pengasapan rokok



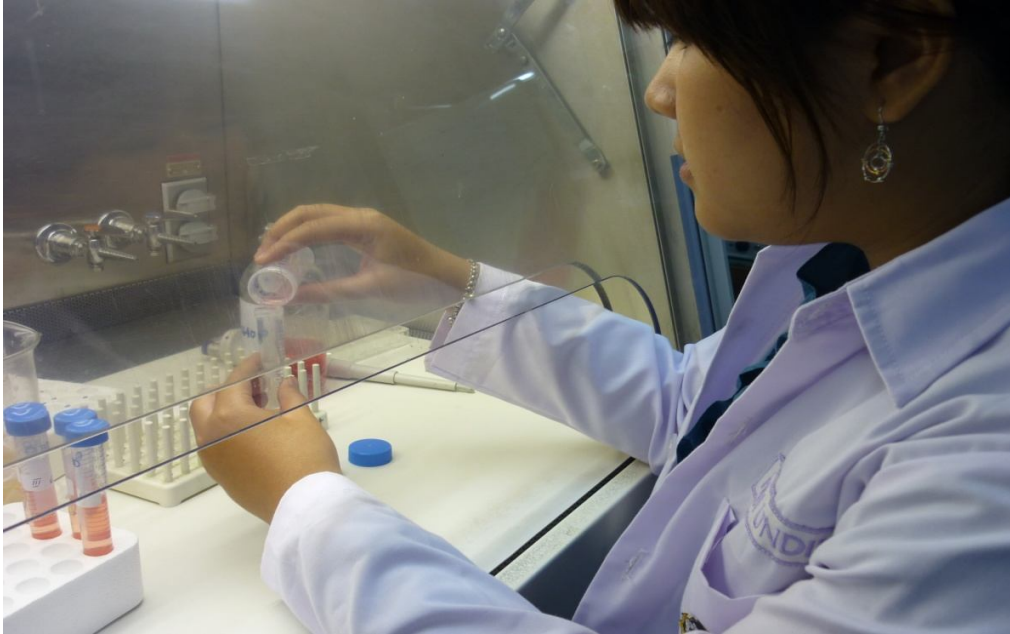
Proses pengasapan rokok



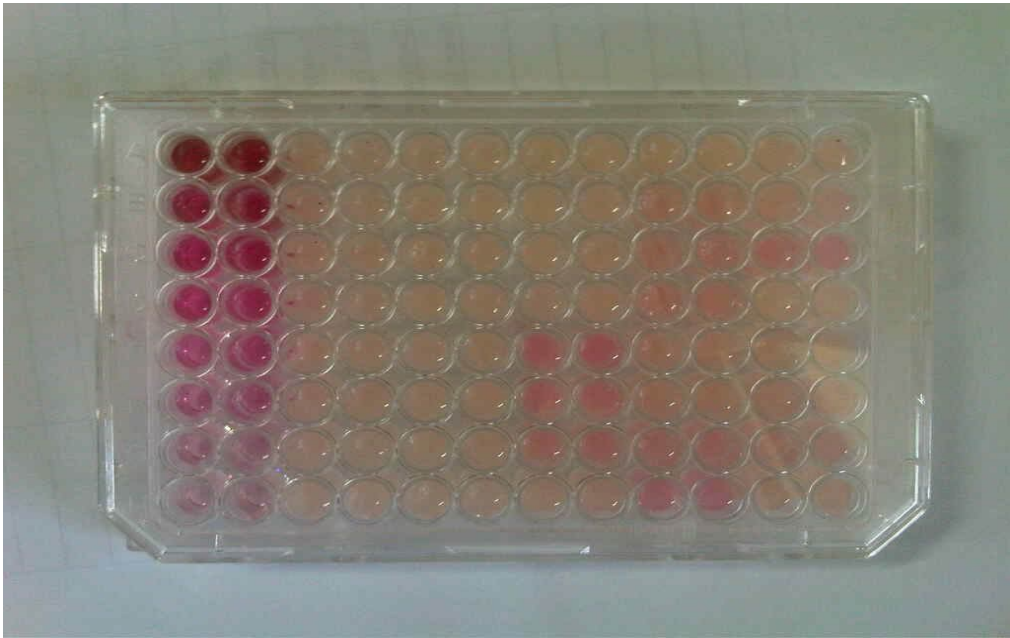
Proses pemberian jus mengkudu



Pengambilan Cairan Peritoneum



Isolasi Makrofag Peritoneum di Laboratorium Cebior



NO pada Microplate Alas Datar