

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

Novitasari Soesilo¹, Ahmad Ismail², Neni Susilaningsih²

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 bermakna 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 bermakna ($p=0.003$ dan $p=0.000$). Tetapi antara kelompok perlakuan 2 dan 3 tidak terdapat perbedaan bermakna ($p=0.075$).

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

¹Mahasiswa program pendidikan S-1 kedokteran umum FK Undip

²Staf pengajar Bagian Histologi FK Undip, Jl. Dr. Sutomo No. 18 Semarang

THE EFFECT OF NONI JUICE IN GRADING DOSAGE ON THE FORMING OF NITRIC OXIDE (NO) PERITONEUM MACROPHAGE ON WISTAR MICE WHICH EXPOSED BY CIGARETTE SMOKE

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 smokes 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.

Keywords: Cigarette, free radical,Nitric Oxide, *Morinda citrifolia* L,antioxidant,macrophage

PENDAHULUAN

Rokok dikonsumsi luas setelah diproduksi pada awal abad ke 20. 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.¹Rokok merupakan salah satu polutan berupa gas yang mengandung berbagai bahan kimia antara lain nikotin, karbon monoksida, tar dan eugenol untuk rokok kretek.²Asap rokok mengandung molekul radikal bebas sebanyak 10^{16} molekul radikal bebas per satu hisapan, berbagai bahan kimia, tar, asbestos, H_2O_2 dan lainnya.³Kandungan radikal bebas inilah yang memainkan peranan dalam kerusakan jaringan dan memacu pengeluaran mediator inflamasi. Peningkatan mediator inflamasi juga akan meningkatkan ekspresi *Nitric Oxide*(NO) dalam jumlah besar melalui aktivasi iNOS di dalam makrofag. 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^{4,5}. 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.⁵

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.⁶ Salah satu tumbuhan yang dapat berfungsi sebagai antioksidan adalah *Morinda citrifolia* Latau yang dikenal dengan nama Noni atau Noni karena mengandung banyak zat antioksidan. 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 di USA tahun 2002 menyatakan bahwa antioksidan dalam *Tahitian Noni Juice* (TNJ) dapat melindungi individu dari asap rokok dengan *scavenging* oksigen bebas

dan radikal peroksidalipid dan *quenching*. Hasilnya menunjukkan bahwa TNJ dapat melindungi individu dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh asap tembakau.⁷ Hasil penelitian di New York tahun 2001 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.⁸

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh jus Noni yang mengandung berbagai zat antioksidan terhadap produksi *Nitric Oxide* makrofag peritoneum. Manfaat penelitian ini untuk memberikan bukti ilmiah peran dan manfaat jus Noni sebagai minuman yang memiliki efek dalam mengatasi inflamasi terutama akibat oleh paparan asap rokok.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *the post test only-control group*, yang menggunakan hewan coba sebagai obyek penelitian. Tempat pemeliharaan dan intervensi hewan coba (tikus Wistar jantan=20 ekor) 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 dilakukan bulan Maret-Mei 2011. Jumlah sampel 5 ekor per kelompok yang diambil secara acak.⁹ Sampel dibagi dalam 4 kelompok yaitu kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Perlakuan berupa pemberian jus Noni pada tikus Wistar yang diberi paparan asap rokok. Parameter pengukuran variabel berupa produksi NO (*Nitric Oxide*) makrofag peritoneum. 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 perlakuan 1 (P1) sejumlah 1 ml/hari; kelompok perlakuan 2 (P2) sejumlah 2 ml/hari; kelompok perlakuan 3 (P3) sejumlah 4 ml / hari dalam dosis terbagi 2

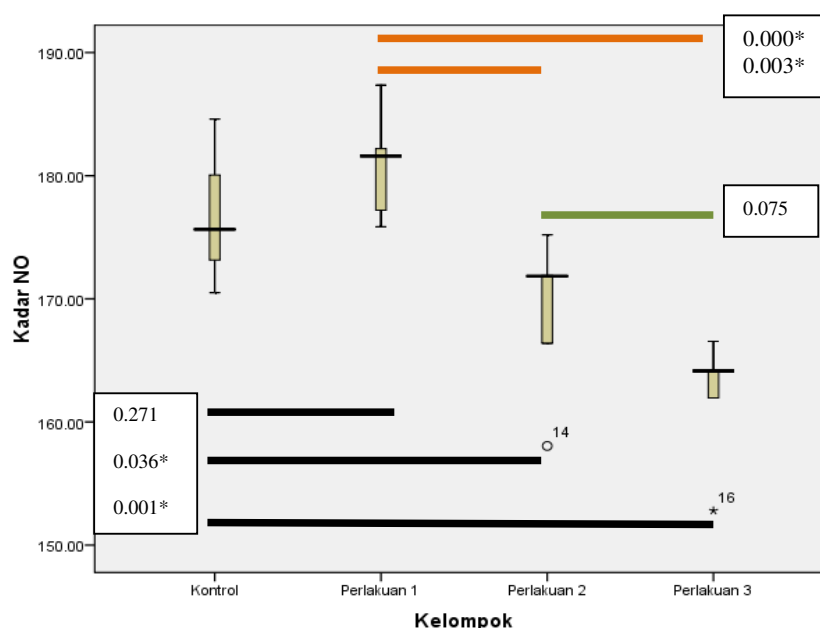
sehubungan pemaparan asap rokok yang dilakukan sebanyak 2 kali. Perhitungan dosis berdasar faktor konversi untuk tikus Wistar 0.018. TNJ mengandung 89% buah Noni¹⁰. Jus Noni merupakan variabel bebas. Skala : Rasio. Produksi NO makrofag peritoneum adalah jumlah NO yang terdapat dalam supernatan kultur makrofag *peritoneum* dengan metode Lewis¹¹ (terlampir) yang diukur dengan Metode Griess¹² (terlampir) dan dibaca absorbansinya menggunakan *automated microplate reader* (*Elisa reader*) pada panjang gelombang 550 nm. Kadar NO makrofag ini merupakan variabel tergantung. Skala : Rasio. Asap rokok adalah asap rokok kretek tanpa filter yang dipaparkan dengan dosis 2 batang dalam sehari, pada jam 09.00 wib dan jam 15.00 wib selama 30 hari pada semua kelompok. Berdasar penelitian sebelumnya yang menunjukkan marker inflamasi pada perokok berat (>10 batang per hari). Dosis rokok yang diberikan berdasar faktor konversi. Pemberian asap rokok menggunakan spuit agar asap rokok dapat dipaparkan secara optimal.¹³ Pemeriksaan variabel produksi NO makrofag peritoneum pada hari ke 31 dilakukan oleh peneliti dan analis yang berpengalaman dari Laboratorium Cebior Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. Data yang diperoleh dilakukan *editing*, *coding*, dan *entry* dalam *file* komputer. Setelah dilakukan *clearing*, data dianalisis secara statistik dengan bantuan program SPSS versi 16. 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*. Nilai signifikansi dalam penelitian dengan hasil analisis $p < 0.05$.

HASIL PENELITIAN

Dari sampel 20 ekor tikus Wistar jantan didapatkan kadar NO dengan ELISA reader. Analisis deskriptif menampilkan nilai rerata dan simpang baku dari variabel tergantung produksi NO makrofag peritoneum, hasil ditampilkan dalam Box-Plot.

Tabel 1. 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



*menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan uji post Hoc $p < 0.05$

Grafik 1. Grafik Box-Plot Kadar NO Makrofag Peritoneum dan Uji post Hoc

Dari uji normalitas Shapiro Wilks didapatkan distribusi kadar NO normal ($p > 0.05$). Uji ANOVA didapatkan $p = 0.000$ maka didapatkan perbedaan kadar NO antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Hasil ini signifikan secara statistik dan diperlukan uji beda lanjutan menggunakan uji Post Hoc.

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.¹⁴ 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.¹⁵ Radikal bebas memainkan peranan yang besar terjadinya kerusakan saluran napas. Kerusakan napas inilah yang menimbulkan proses inflamasi. Inflamasi dapat terjadi karena pelepasan berbagai mediator yang berasal dari jaringan rusak, sel mast, leukosit dan komplemen.¹⁶ Mediator inflamasi yang pengeluarannya dipengaruhi oleh asap rokok adalah TNF α , IL 8 dan yang mengaktifkan dan diproduksi oleh makrofag.^{4,5} Adanya mediator inflamasi inilah yang memacu pembentukan NO melalui pengaktifan iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) oleh makrofag sebagai lini pertama respon inflamasi.^{17,18} Dalam proses inflamasi kadar NO dapat meningkat bahkan sampai seribu kali lipat dari normal.¹⁹ Dalam penelitian kadar NO yang diukur karena mencerminkan reaksi inflamasi karena paparan rokok. Kadar NO relative lebih stabil dan lebih mudah untuk diperiksa kadarnya.^{4,5}

Uji ANOVA didapatkan $p < 0.05$ maka didapatkan perbedaan kadar NO antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Selanjutnya melalui Post Hoc Test didapatkan perbedaan kadar NO antara kelompok kontrol dengan kelompok 2 dan kelompok 3 secara statistik ($p < 0.05$). Sebaliknya tidak terdapat perbedaan kadar NO antara kelompok kontrol dengan kelompok 1 secara statistik ($p > 0.05$). Pada uji Post Hoc juga didapatkan perbedaan antara kelompok 1 dengan kelompok 2 dan kelompok 3. Namun berbeda halnya antara kelompok 2 dan kelompok 3 yang tidak didapatkan perbedaan yang bermakna. Pada kelompok perlakuan 1 dosis jus Noni yang diberikan adalah 1 ml, sudah melebihi dosis ambang batas aktivitas antioksidan pada kelompok yang terpapar asap rokok sesuai konversi dosis. Namun pada penelitian ini belum menghasilkan hasil yang 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 bermakna karena dosis optimum untuk mendapat perbedaan kadar NO adalah 2 ml. Penambahan dosis jus Noni yang diberikan tidak memberikan perbedaan yang signifikan. Uji farmakokinetik

untuk mengetahui frekuensi konsumsi dan dosis harian dari jus Noni telah dilakukan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa frekuensi konsumsi jus Noni lebih penting daripada jumlah yang diminum.²⁰

Penelitian ini didapatkan adanya perbedaan kadar NO antara kelompok kontrol dan perlakuan. Hal ini dapat dijelaskan dengan efek antioksidan dari jus Noni dapat mempengaruhi produksi NO makrofag peritoneum yang terpapar asap rokok dimana asap rokok dapat memicu produksi yang berlebihan dari NO yang diproduksi oleh iNOS. Kandungan antioksidan dalam jus Noni meliputi asam askorbat, beta karoten, alkaloid, terpenoid, beta sitosterol, karoten, dan polifenol seperti flavonoid, flavon glikosida, rutinosa²¹ Menurut penelitian terdahulu, aktifitas imunologi dari ekstrak alkohol dari buah Noni/Noni 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 menghambat pelepasan sitokin seperti TNF- α .¹⁰ TNF- α merupakan mediator inflamasi yang dapat memacu pembentukan NO lebih banyak oleh makrofag pada kondisi inflamasi. 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.

SIMPULAN dan SARAN:

Hasil penelitian ini didapatkan pengaruh pemberian jus Noni terhadap produksi NO makrofag peritoneum pada tikus Wistar yang diberi paparan asap rokok. Untuk penelitian lebih lanjut dapat dilakukan penelitian dengan desain serupa terhadap potensi jus Noni dalam mempengaruhi NO makrofag peritoneum dapat dilakukan dengan dosis dan frekuensi yang lebih bervariasi dan perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut akan potensi buah Noni yang lain bagi kesehatan manusia.

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. Kurniawan A. Aktivitas Antioksidan dan Potensi Hayati dari Kombinasi Ekstrak Empat Jenis Tanaman Obat. Bogor :IPB; 2011
4. Van der vielt A. Nitrogen Oxides and cigarette smoke-induced injury. California. USA. 1998
5. Hermawan AG. SIRS dan Sepsis (Imunologi,Diagnosis Penatalaksanaan).Sebelas Maret University Press. Edisi pertama. Solo.2006.
6. Purboyo A. Efek Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) pada Kelinci yang dibebani glukosa[dissertation].Surakarta;2009
7. 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
8. Wang M.Y dan C. Su. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). Ann.NY Acad. Sci. 2001;(952): 161–168
9. World Health Organization. Research Guidelines for Evaluation The Safety and Efficiency of Herbal Medicines. Manila. 1993; 33-44
10. Scientific Committee on Food on Tahitian Noni Juice [internet]Belgia:SCF[updated 2002 Dec 11;cited 2012 Jan 16]. Available from http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html
11. 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 Wilye Liss & sons Inc Publ.1995;15-26

12. Dietert RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Sung Y. Production of Reactive Nitrogen Intermediates by Macrophages. In: Methodes in Immunotoxicology. Volume 2. editor : Burleson GR, Dean JH, Munson AE. A John Wilye Liss & sons Inc Publ. New York. 1995; 99-1117
13. 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
14. Ismail A.Pengaruh *Gynura procumbens (Lour.) merr* terhadap Produksi Nitric Oxide Makrofag dari Mencit C3H yang Diinokulasi Sel Adeno carcinoma mammae [dissertation]. Indonesia: Fakultas kedokteran Universitas Diponegoro; 2003
15. Revianti S. Pengaruh Radikal Bebas pada Rokok terhadap Timbulnya Kelainan di Rongga Mulut.Denta J Ked Gigi FKG-UHT.Surabaya.2007;1(2)
16. Büyükbaş S, Kürşat 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
17. Garrel C, Fontecave M. Nitric oxide : chemistry and biology. Switzerland: Birkhauser Verlag Basel. 1995; 22-8.
18. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. 6th ed. Toronto; Mosby Elsevier Science Limited. 2001; 1-13
19. Devlin TM . Biochemistry with Clinical Correlation, 5thed. Canada: Wiley-Liss; 2002; 407-88.
20. 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
21. Adnyana IK, Yulinah E, Soemardji A, Kumolasasi E, Iwo MI, Iskendarso J, et al. Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanol Buah Noni (*Morinda citrifolia* L). ITB. 2004