

**PENGARUH AIR KELAPA MUDA (*Cocos nucifera* L.) TERHADAP
KADAR *TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA*
Studi Ekperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar
yang DipaparAsap Rokok**

Skripsi

untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:

**Assyfa Qotrunnada
30101800029**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

SKRIPSI

PENGARUH AIR KELAPA MUDA (*Cocos nucifera L.*) TERHADAP
KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA
Studi Eksperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Dipapar
Asap Rokok

Disusun Oleh:

Assyfa Ootrunnada

30101800029

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Pada tanggal 23 Agustus 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Susunan Tim Penguji

Pembimbing I

Dr. Siti Thomas Zulaikah, SKM, M.Kes.

Pembimbing II

Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes.

Anggota Tim Penguji I

dr. Sampurna M.Kes.

Anggota Tim Penguji II

Dr. dr. Suryani Yuliyanti M.Kes.

Semarang, 8 September 2022

Fakultas Kedokteran

Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,



Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp. KE

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Assyfa Qotrunnada

NIM : 30101800029

Dengan ini menyatakan bahwa Skripsi yang berjudul:

**“PENGARUH AIR KELAPA MUDA (*Cocos nucifera* L.) TERHADAP
KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA**

**Studi Ekperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Dipapar
Asap Rokok”**

Adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian besar skripsi orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan aturan yang berlaku.

Semarang, 23 Agustus 2022



Assyfa Qotrunnada

PRAKATA

Assalamu 'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillahirrabbi lalamin, puji syukur kehadiran Allah SWT atas anugerah dan rahmat-Nya, sehingga saya mampu menyelesaikan penulisan Skripsi yang berjudul: **“PENGARUH PEMBERIAN AIR KELAPA MUDA (*Cocos nucifera L.*) TERHADAP KADAR TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA , Studi Ekperimental pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Dipapar Asap Rokok”** ini. Skripsi ini disusun untuk melengkapi persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran di Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Penulisan skripsi ini terselesaikan dengan baik atas perijinan, bimbingan dan bantuan teknis dari berbagai pihak, yang dalam kesempatan ini saya bersama menyampaikan ucapan terimakasih sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH.,M.Hum., selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung (UNISSULA) Semarang.
2. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi Sp.KF, SH., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
3. Dr. Siti Thomas Zulaikhah, SKM. M.Kes dan Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes., selaku dosen pembimbing I dan II atas segala kontribusi keilmuannya dan keluangan waktu serta pikiran dalam membimbing hingga Skripsi ini dapat terselesaikan.
4. dr. Sampurna M.Kes. selaku dosen penguji 1 dan Dr.dr. Suryani Yuliyanti M.Kes selaku dosen penguji 2 yang telah meluangkan waktu untuk memberikan arahan, koreksi serta memberi masukan hingga terselesaikannya Skripsi ini.

5. Seluruh staff kariawan FK Unissula dan staff Rumah Sakit Islam Sultan Agung Semarang yang ikut serta dalam membantu menyelesaikan penulisan skripsi ini.
6. Kedua orang tua, Bapak H. Sugino dan Ibu Sumarmi Ariyanti yang selalu memberikan kasih sayang, doa, nasihat, harapan, serta kesabaran yang luar biasa dalam setiap langkah, yang merupakan anugrah terbesar yang menyertai langkah saya.
7. Adik, Arigna Ikhsanu Hatta yang telah memberikan doa dan dukungan untuk kelancaran penulisan skripsi ini.
8. Teman seperjuangan skripsi Enggar Maulani Saputrie, Rizma dan Indri Dwi Septiani yang telah berjuang dan banyak mensupport saya.
9. Semua pihak yang terlibat secara langsung maupun tidak langsung dalam penelitian ini dan tidak dapat disebutkan satu-persatu.

Hanya panjatan do'a yang saya bisa sampaikan, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan rahmat-Nya atas kesabaran dan ketulusan yang telah diberikan oleh semua pihak. Saya menyadari atas kekurangsempurnaan skripsi ini, dan oleh karena itu saya terbuka atas kritik dan saran yang membangun guna perbaikan skripsi ini. Akhir kata, saya berharap semoga skripsi ini bermanfaat dan dapat memberikan wawasan bagi pembaca dan bagi mahasiswa kedokteran.

Wassalamu'alaikum Wr.Wb

Semarang, 23 Agustus 2022

Assyfa Qotrunnada

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
INTISARI	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan umum	3
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat teoritis	4
1.4.2 Manfaat praktis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>	5
2.1.1. Definisi.....	5
2.1.2. Jalur pensinyalan TNF- α	6
2.1.3. Cara Pengukuran	8
2.2. Asap Rokok	9
2.2.1. Definisi.....	9
2.2.2. Kandungan asap rokok.....	10
2.2.3. Asap rokok dan radikal bebas	11

2.3. Air Kelapa Muda	13
2.3.1 Definisi.....	13
2.3.2 Sejarah asal usul kelapa	14
2.3.3 Morfologi tanaman kelapa	14
2.3.4 Kandungan air kelapa muda dan manfaat kesehatan	15
2.4. Vitamin E.....	16
2.5. Pengaruh Pemberian Air Kelapa Muda Terhadap Kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur <i>Wistar</i> yang Dipapar Asap Rokok	19
2.6. Kerangka Teori.....	22
2.7. Kerangka Konsep	22
2.8. Hipotesis	22
BAB III METODE PENELITIAN.....	23
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	23
3.2 Variabel dan Definisi Operasional.....	23
3.2.1 Variabel.....	23
3.2.2 Definisi Operasional	23
3.3 Populasi dan Sampel.....	24
3.3.1 Populasi.....	24
3.3.2 Sampel.....	25
3.4 Instrumen dan Bahan Penelitian	26
3.4.1 Instrumen penelitian.....	26
3.4.2 Bahan penelitian.....	26
3.5 Cara Penelitian.....	27
3.5.1. Pengajuan <i>Ethical Clearance</i>	27
3.5.2. Penetapan dosis air kelapa muda dan vitamin E	27
3.5.3. Adaptasi hewan coba	27
3.5.4. Menyiapkan kandang tikus beserta tempat pakan dan minum	27
3.5.5. Paparan asap rokok	27
3.5.6. Pemberian perlakuan.....	28
3.5.7. Proses terminasi hewan coba, pengambilan sampel darah... 30	
3.5.8. Cara pemeriksaan kadar TNF- α	31

3.6 Alur Penelitian.....	33
3.7 Tempat dan Waktu Penelitian	33
3.8 Analisis Hasil.....	34
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	35
4.1. Hasil Penelitian.....	35
4.2. Pembahasan	37
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1. Kesimpulan.....	41
5.2. Saran.....	42
DAFTAR PUSTAKA	43



DAFTAR TABEL

- Tabel 4.1. Hasil analisis normalitas sebaran data dan homogenitas varian36
- Tabel 4.2. Hasil analisis perbedaan kadar TNF- α antar dua kelompok37



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Modalitas pensinyalan dan bioaktivitas <i>downstream</i> reseptor TNF- α	7
Gambar 2.2. Respons Inflamasi Seluler dan Kerusakan Oksidatif Akibat Paparasi Asap Rokok.....	12
Gambar 2.3. Bagian-bagian Buah Kelapa.....	15
Gambar 2.4. Kerangka Teori	22
Gambar 2.5. Kerangka Konsep.....	22
Gambar 3.1. Alur penelitian	33
Gambar 4.1. Rerata kadar TNF- α antar kelompok	35

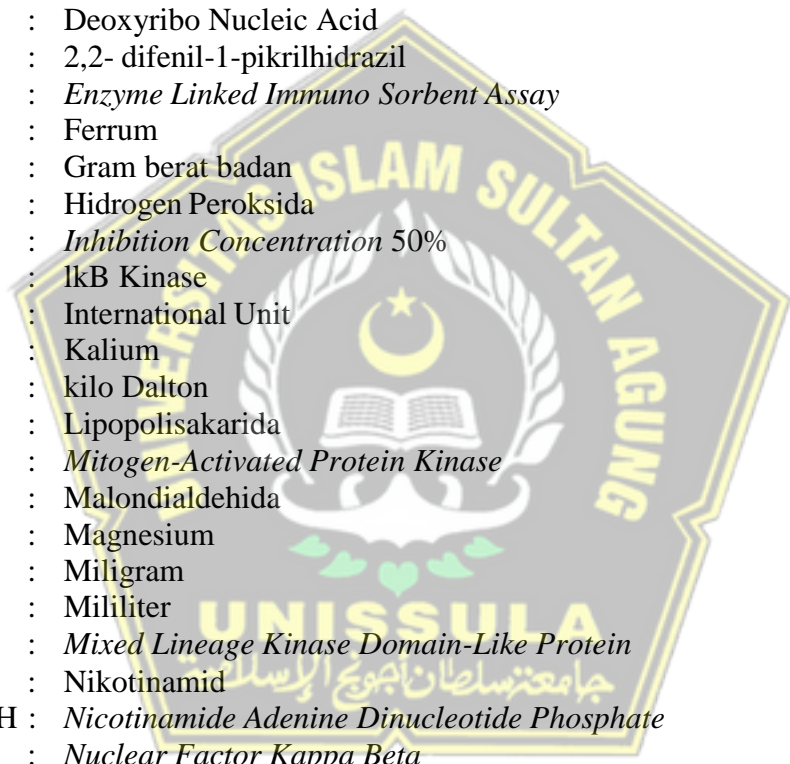


DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Penelitian.....	49
Lampiran 2. Hasil Analisis Data	50
Lampiran 3. Dokumentasi.....	52
Lampiran 4. Surat Keterangan Penelitian	54
Lampiran 5. <i>Ethical Clearance</i>	55
Lampiran 6. Surat Undangan Ujian Hasil Skripsi	56



DAFTAR SINGKATAN



µl	: mikroliter
3R	: <i>Replacement, Reduction, and Refinement</i>
Ca	: Calcium
Cm	: centimeter
CO	: Karbon Monoksida
Cu	: Cuprum
DD	: <i>Death Domain</i>
DF	: <i>Degrees of freedom</i>
DNA	: Deoxyribo Nucleic Acid
DPPH	: 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
Fe	: Ferrum
grBB	: Gram berat badan
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
IC ₅₀	: <i>Inhibition Concentration 50%</i>
IKK	: IκB Kinase
IU	: International Unit
K	: Kalium
kDa	: kilo Dalton
LPS	: Lipopolisakarida
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MDA	: Malondialdehida
Mg	: Magnesium
mg	: Miligram
mL	: Mililiter
MLKL	: <i>Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein</i>
Na	: Nikotinamid
NADPH	: <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor Kappa Beta</i>
NGAL	: <i>Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
nm	: nanometer
NO	: Nitrit Oksida
O ₂	: Oksigen
ONOO ⁻	: <i>Peroxynitrite</i>
P2PTM	: Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Tidak Menular
PG	: Prostaglandin
PUFA	: <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
RIP	: <i>Receptor Interacting Protein</i>
RIPK1	: <i>Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1</i>
RNA	: Reoxyribo Nucleic Acid
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>

Se : Selenium
STZ : Streptozotocin
TBRAS : *Thiobarbituric Acid Reactive Substance*
TF : *Transcription Factor*
TNFR1 : TNF- α receptor 1
TNFR2 : TNF- α receptor 2
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α*
TRADD : *TNF-R1 Associated Death Domain Protein*
TRAF2 : *TNF Receptor Associated Factor 2*
US : *United State*
Zn : Zinc



INTISARI

Merokok menjadi penyebab berbagai penyakit kronis dan gangguan sistem imun melalui perantara inflamasi yang muncul akibat produksi radikal bebas berlebihan oleh berbagai zat toksik dalam asap rokok. Upaya proteksi terhadap inflamasi perlu dilakukan, diantaranya dengan memanfaatkan antioksidan dari air kelapa muda (*Cocos nucifera* L.). *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) adalah marker inflamasi yang terlibat pada patogenesis berbagai penyakit. Tujuan penelitian mengetahui pengaruh pemberian air kelapa muda terhadap kadar TNF- α pada tikus Wistar yang dipapar asap rokok.

Penelitian eksperimen menggunakan *posttest only control group design*. Sampel 24 ekor tikus jantan Wistar yang dibagi empat kelompok. K1: tikus kontrol normal, K2: dipapar asap rokok, K3: dipapar asap rokok dan diberi air kelapa muda 8 mL/200 grBB, K4: dipapar asap rokok dan diberi vitamin E 1,8 IU/200grBB. Paparan asap rokok berasal dari pembakaran tiga batang rokok kretek dalam 2x/hari. air kelapa muda atau vitamin E diberikan melalui sonde lambung dua jam setelahnya. Lama perlakuan 14 hari. Kadar TNF- α diperiksa dari sampel darah menggunakan ELISA reader dan dianalisis dengan uji *one way anova* serta *post hoc LSD*.

Hasil didapatkan rerata kadar TNF- α K2 yang tertinggi ($17,9 \pm 0,26$ pg/ml), K1 yang terendah ($6,1 \pm 0,30$ pg/ml), sedangkan K3: $8,8 \pm 0,43$ pg/ml dan K4: $7,3 \pm 0,32$ pg/ml. Hasil *one way anova* didapatkan $p < 0,001$ dengan uji *post hoc LSD* masing-masing juga didapatkan $p < 0,001$.

Kesimpulan bahwa pemberian air kelapa muda dapat menurunkan kadar TNF- α pada tikus putih jantan galur Wistar yang dipapar asap rokok.

Kata kunci: Kadar TNF- α , Asap rokok, Air kelapa muda

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Merokok menjadi faktor risiko beragam penyakit seperti penyakit paru, hati, jantung, diabetes dan kanker, penyakit mata tertentu, serta gangguan sistem imun (reumatoid arthritis) (U.S. Department of Health and Human Services, 2020). Risiko penyakit-penyakit tersebut akan meningkat jika jumlah perokok juga meningkat, sementara itu jumlah perokok aktif di Indonesia masih sangat tinggi, dengan jumlah perokok sebanyak 307 juta (P2PTM Kemenkes RI, 2018). Peningkatan jumlah perokok di Indonesia justru ditemukan pada anak-anak dan remaja yang pada tahun 2013 adalah sebesar 7,2% menjadi 9,1% di tahun 2018 (Kemenkes RI, 2021). Efek kesehatan terkait merokok perlu dikendalikan diantaranya dengan melakukan proteksi terhadap kemungkinan efek negatifnya melalui pemanfaatan air kelapa muda yang dikenal kaya antioksidan, mengingat jenis-jenis penyakit yang timbul akibat merokok diinisiasi oleh peristiwa inflamasi yang dipicu oleh produksi radikal bebas yang berlebihan (Kumar *et al.*, 2020).

Beragam zat toksin dalam asap rokok dan komponen-komponen sel mikroba lipopolisakarida (LPS) bakteri, serta konstituen-konstituen lainnya berperan dalam induksi inflamasi kronis (Lee *et al.*, 2012). *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) merupakan salah satu sitokin yang berperan penting pada patogenesis berbagai penyakit. TNF- α muncul karena makrofag teraktivasi

oleh zat-zat toksin dalam asap rokok yang menstimuli kemunculan radikal bebas yaitu *reactive oxygen species* (ROS) (Hacievliyagil *et al.*, 2013). Kadar TNF- α yang berlebihan tanpa adanya pengendalian akan mempercepat proses patogenesis penyakit. Inflamasi dan produksi ROS saling berkaitan, sehingga salah satu dari proses tersebut perlu dihambat agar tidak berlanjut pada perkembangan suatu penyakit (Kumar *et al.*, 2020).

Pemberian antioksidan diperlukan untuk mengendalikan kadar TNF- α . Antioksidan tersebut dapat diperoleh dari air kelapa muda (Rukmini *et al.*, 2017), diantaranya vitamin C (Santos *et al.*, 2013), asam amino esensial dan non esensial (Li *et al.*, 2018), fenolik (katekin dan asam salisilat) (Mahayothee *et al.*, 2016), flavonoid (Zulaikhah *et al.*, 2021b), mineral (Fe, Mg, Se, Zn, L-arginine) (Sudiyono *et al.*, 2021). Pada penelitian sebelumnya air kelapa muda terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dari uji 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) didapatkan *inhibition concentration* 50% (IC₅₀) pada dosis 73 μ L dan mampu menurunkan produksi nitrit oksida (NO) serta *thiobarbituric acid reactive substance* (TBRAS) (Santos *et al.*, 2013). Penelitian lain menunjukkan pemberian air kelapa muda 8 mL/200grBB/hari selama 28 hari ke tikus *wistar* yang diinduksi streptozotocin (STZ) dan nikotinamid (NA) untuk membuat model diabetes mellitus tipe 2 dapat menurunkan kadar TNF- α (Zulaikhah *et al.*, 2021b). Pemberian air kelapa muda selama 3 hari pada tikus model nefropati melalui induksi media kontras iodium juga dapat menurunkan kadar TNF- α (Sudiyono *et al.*, 2021). Tikus jantan Sprague Dawley yang diinduksi nikotin

secara subkutan dan diberi air kelapa muda selama 15 hari juga dapat memproteksi epitel germinal (dilihat aktivitas asam dan alkalin fosfatase) dan meningkatkan kadar testosteron (Nair & Rajamohan, 2014).

Efek air kelapa muda pada kadar TNF- α tikus yang dipapar asap rokok belum dijumpai, oleh karena itu perlu diteliti efek pemberian air kelapa muda dalam dosis yang sama dengan penelitian terdahulu (8 mL/200 grBB) dengan durasi perlakuan selama 14 hari. Paparan asap rokok kretek digunakan untuk merepresentasi *second hand smoke*. Penelitian ini juga bermaksud membandingkan efektifitas air kelapa muda dengan vitamin E yang sudah dikenal poten sebagai antioksidan, yang di penelitian terdahulu pada dosis pemberian 1,8 IU/200 grBB selama 14 hari berpengaruh mereduksi kadar TNF- α di tikus wistar dengan mendapat paparan asap rokok (Zulaikhah *et al.*, 2021a).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian air kelapa muda berpengaruh terhadap kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui apakah pemberian air kelapa muda berpengaruh terhadap kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok.

1.3.2 Tujuan khusus

1.3.2.1 Mengetahui rerata kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang tidak dipapar asap rokok (kelompok 1).

1.3.2.1 Mengetahui rerata kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok (kelompok 2).

1.3.2.3 Mengetahui rerata kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok dan diberi air kelapa muda dengan dosis 8 mL/200 grBB/hari (kelompok 3).

1.3.2.4 Mengetahui perbedaan rerata kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok dan diberi vitamin E dosis 1,8 IU/200 grBB/hari (kelompok 4).

1.3.2.5 Menganalisis perbedaan rerata kadar TNF- α antar kelompok perlakuan 1, 2, 3 dan 4.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Menjadi referensi penelitian lebih lanjut mengenai efek air kelapa muda terhadap kadar sitokin proinflamasi pada perokok.

1.4.2 Manfaat praktis

Memberikan edukasi/informasi pada perokok tentang efek merokok pada kadar sitokin proinflamasi yaitu TNF- α , dan usaha pencegahan agar tidak timbul inflamasi secara berlebihan hingga menjadi kronik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Tumor Necrosis Factor- α*

2.1.1. Definisi

Tumor necrosis factor- α adalah sitokin inflamasi pleiotropik dan terutama bersumber dari monosit, makrofag dan sel T (Samsu, 2018). Sitokin ini merupakan protein 17 kDa yang terdiri atas 157 asam amino, protein homotrimer (protein yang terdiri atas tiga unit polipeptida identik) yang juga diproduksi oleh sel-sel *natural killer* (NK) (Atzeni & Sarzi-Puttini, 2013). TNF- α juga disebut sebagai hormon peptida makrofag yang mempunyai dampak sistemik penting, antara lain berefek kaheksia, leukositosis serta anemia. TNF- α juga dapat meningkatkan aktivitas koagulan endotel kapiler yang mempromosikan trombosis mikrovaskuler, nekrosis jaringan, kerusakan sel-sel endotel sehingga menyebabkan kebocoran cairan mikrovaskular yang dapat berpindah masuk ke intraseluler terutama pada otot-otot skeletal dan menurunkan volume plasma (peran pada sepsis) (Rauf & Kusuma, 2021). TNF- α merupakan salah satu faktor terlarut monokin yang diproduksi oleh makrofag dan berperan dalam inflamasi (FK Hewan Unsyiah, 2018). TNF- α memiliki banyak peran metabolisme antara lain pada proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel serta metabolisme lipid juga koagulasi (Nasution, 2016). TNF- α juga menginduksi resistensi insulin, anoreksia, dan kehilangan berat badan serta meningkatkan sistem imun (Agustin *et al.*, 2018).

Tumor necrosis factor- α yang juga disebut sebagai *cachectin* atau *cachexin* juga diproduksi dalam jumlah terbatas oleh sel B, sel endotel dan otot, fibroblas serta osteoklas. TNF- α dalam kondisi terikat membran dan terlarut. TNF- α bertranslokasi ke membran sel dimana enzim pengubah TNF- α melepaskan molekul 26 kDa yang terikat membran ke dalam lingkungan ekstraseluler sebagai protein 17 kDa. Aktivitas enzim ini tidak hanya melepaskan TNF- α dari membran plasma, tetapi juga menghambat reseptor TNF- α dari permukaan, yang bertindak sebagai penghambat aksinya. TNF- α yang terikat membran maupun yang dilepaskan sama-sama aktif, fungsi mereka berbeda tergantung pada lokasinya (Sellati & Sahay, 2014).

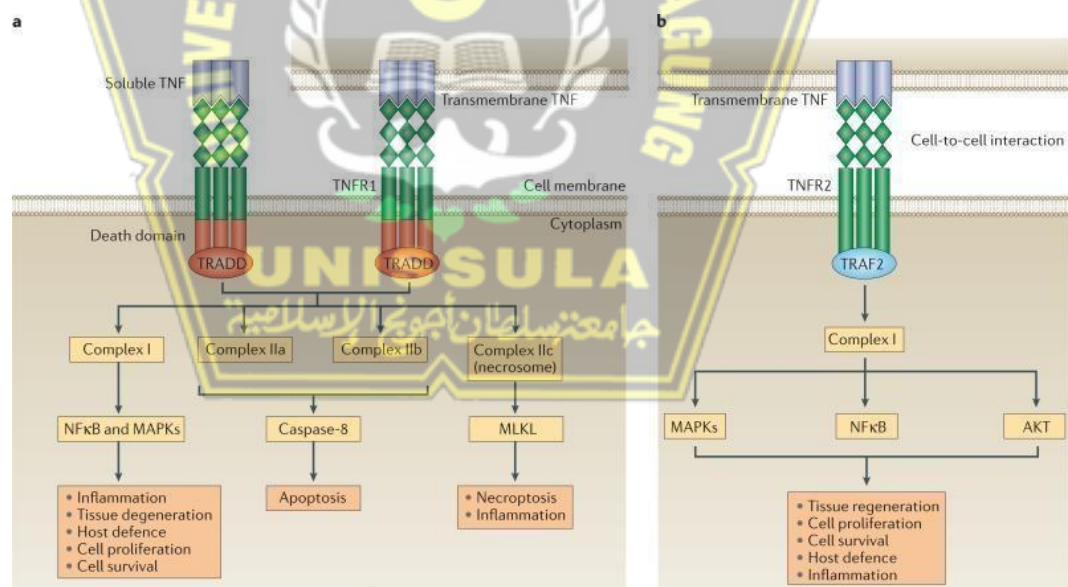
Sel-sel imun yang mengekspresikan TNF- α secara lokal menjadikan TNF- α memiliki efek terapi, namun ketika disekresikan pada sistem sirkulasi akan menyebabkan disregulasi sehingga menimbulkan penyakit diantaranya kanker. TNF- α dianggap sebagai mediator primer inflamasi saat mengaktifasi mediator inflamasi dan protease lain. TNF- α dihasilkan pula oleh sel tumor dan dapat bereaksi menjadi tumor promoter endogen (Aggarwal *et al.*, 2012).

2.1.2. Jalur pensinyalan TNF- α

Mediasi efek TNF- α terjadi melalui 2 (dua) reseptornya yaitu reseptor TNF 1 (TNFR1) dan reseptor TNF 2 (TNFR2). Reseptor yang pertama umum terekspresi di semua jenis sel dan berperan utama dalam mengaktifasi *nuclear factor kappa beta* (NF- κ B), sedangkan reseptor yang kedua hanya

terekspresi pada sel endotel dan sel imun. Bonding antara TNF- α dengan reseptor pertama menginduksi trimerisasi reseptor dan rekrutmen protein adaptor TNF-R1 associated death domain protein (TRADD) yang terikat pada *death domain* (DD) spesifik di domain sitoplasma reseptor tersebut. TRADD merekrut TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) dan mengaktifasi I κ B kinase (IKK) dengan mediasi *receptor interacting protein* (RIP) (Kallioliias & Ivashkiv, 2016). *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIPK1) adalah mediator utama kematian sel dan inflamasi (Mifflin *et al.*, 2020).

Modalitas pensinyalan dan bioaktivitas downstream reseptor TNF ditunjukkan Gambar 2.1.



Sumber: (Kallioliias & Ivashkiv, 2016)

Gambar 2.1. Modalitas pensinyalan dan bioaktivitas *downstream* reseptor TNF- α

Pensinyalan TNFR1 diaktivasi oleh TNF- α transmembran dan terlarut. TNFR1 dengan DD yang dimiliki merekrut TRADD. Pengikatan TNFR1 oleh TNF- α transmembran atau terlarut menyebabkan penyusunan kompleks I yang mengaktivasi NF- κ B dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Pensinyalan kompleks I TNFR1 menginduksi inflamasi, degenerasi jaringan, kelangsungan hidup sel dan proliferasi, serta pengaturan sistem pertahanan imun terhadap patogen. Modalitas pensinyalan lain terkait dengan apoptosis juga dapat diaktivasi oleh TNFR1 yang dimediasi oleh pembentukan kompleks IIa dan IIb (rioptosom), sedangkan kompleks IIc (nekrosom) menginduksi nekroptosis dan inflamasi dengan dimediasi oleh *mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL) (Gambar 2.1a). Reseptor kedua dari TNF- α terutama diaktivasi oleh TNF- α transmembran secara interaksi sel to sel. TNFR2 merekrut TRAF2 melalui domain TRAF, memicu pembentukan kompleks I dan mengaktivasi NF κ B, MAPK serta *downstream* protein kinase B (AKT). TNFR2 terutama memediasi bioaktivitas homeostatik seperti regenerasi jaringan, proliferasi dan kelangsungan hidup sel. Jalur tersebut juga dapat menginisiasi efek inflamasi dan pertahanan host terhadap patogen (Gambar 2.1b) (Kalliolias & Ivashkiv, 2016).

2.1.3. Cara Pengukuran

Pengukuran TNF- α dalam darah tepi merupakan alat yang berguna untuk menilai respon inflamasi pada berbagai macam penyakit. TNF- α stabil dalam serum yang disimpan pada suhu 4⁰C hingga satu minggu setelah

sentrifugasi sampel darah dan perlakuan dengan anti-TNF- α biologis dapat menyebabkan pengukuran negatif palsu (Valaperti *et al.*, 2020).

Pengukuran TNF- α dengan teknik *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) dan flowsitometri telah digunakan dalam berbagai uji klinis (Çetin *et al.*, 2018). Akurasi dan presisi pengukuran sitokin (TNF- α) antar uji dapat bervariasi, meskipun pengujian dilakukan dengan presisi yang baik di laboratorium individu, potensi variabilitas antar laboratorium tetap tinggi karena perbedaan antibodi, standar kalibrasi, reagen deteksi, metode deteksi, dan metode analisis data yang diaplikasikan (Knight *et al.*, 2020).

Prinsip uji ELISA untuk TNF- α dilakukan dengan metode sandwich biotin antibodi ganda yang ditambahkan dalam sumuran (*well*) yang telah dilapisi dengan antibodi monoklonal TNF- α dan selanjutnya diinkubasi. Antibodi berikutnya yang ditambahkan yaitu antibodi TNF- α berlabel biotin agar dapat bereaksi dengan larutan avidin-*Horseradish Peroxidase* (HRP) B untuk membentuk kompleks imun. Enzim yang tidak terikat pasca inkubasi dibersihkan dengan cara dibilas kemudian ditambahkan *substrat solution D*. Larutan yang didapat akan berubah menjadi biru, berubah lagi menjadi kuning akibat efek asam (Kartini, 2018).

2.2. Asap Rokok

2.2.1. Definisi

Asap rokok yaitu asap yang dihasilkan dari pembakaran rokok, baik itu rokok filter ataupun rokok kretek. Asap rokok menjadi sumber radikal bebas eksogen (Klus *et al.*, 2016). Asap rokok dibedakan atas asap *mainstream* dan

sidestream. Asap *mainstream* yaitu semua komponen aerosol dari pembakaran rokok yang masuk ke dalam rongga mulut perokok baik melalui penghisapan secara langsung, maupun dari cerutu atau pipa. Asap *sidestream* yaitu komponen aerosol asap rokok yang dihembuskan antara dua isapan rokok dan masuk dalam peredaran udara sekitar (Ardiana, 2021).

2.2.2. Kandungan asap rokok

Asap *mainstream* mengandung 3-11% karbon monoksida (CO), 15-4% partikel dan 1-9% nikotin, serta 4000 konstituen tambahan dan 400 senyawa lain yang berpotensi karsinogen, toksikan, dan iritan. Hidrokarbon polisiklik, nitrosamin, dan amin aromatik heterosiklik merupakan berbagai ragam senyawa yang terdapat pada asap rokok dan memiliki efek karsinogenik dan menginduksi berbagai kaskade seluler termasuk reaksi perubahan imunologis, mutagenesis, dan metabolik (Ardiana, 2021).

Kompleks hidrokarbon ditemukan pada fase partikel asap rokok. Hidrokarbon tersebut dapat bereaksi dengan NO sehingga terbentuk senyawa radikal berbeda (Ghezzi, 2011). Radikal bebas dalam fase partikel yaitu *semiquinone* yang dapat bereaksi dengan oksigen (O₂) untuk membentuk radikal superoksida dan hidrogen peroksida (H₂O₂) (Lushchak, 2012). Waktu paruh fase partikel lebih lama dibanding fase gas. Ion logam juga terkandung dalam fase partikel, ion tersebut membentuk radikal hidroksil H₂O₂ yang berikutnya menembus membran dan mengakibatkan stres oksidatif (Petersen, 2017). Oksidan ditemukan dalam bentuk O₂ dan NO pada fase gas. Kedua senyawa tersebut kemudian membentuk ONOO- (peroksinitrit).

2.2.3. Asap rokok dan radikal bebas

Asap rokok kretek mengandung radikal bebas sangat tinggi, dimana dalam asap satu kali hisapan terdapat sekitar 1.014 molekul radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh manusia (Dikaningrum, 2013). Paparan asap rokok kretek yang berlebih berpotensi menimbulkan radikal bebas dengan elektron tunggal. Radikal bebas membuat keadaan stabil dengan cara menarik elektron lain sehingga terbentuk radikal baru. Elektron yang ditarik akan menyebabkan kerusakan molekul, sehingga terjadi kerusakan sel, gangguan fungsi sel, bahkan kematian sel. Kerusakan sel akibat radikal bebas dapat mencapai ke tingkat deoxyribo nucleic acid (DNA) (Budiman *et al.*, 2018). Merokok meningkatkan paparan kumulatif *reactive oxygen spesies* (ROS), frekuensi merokok poten menyebabkan pembentukan ROS berlebihan sehingga terjadi stres oksidatif (Khrisna, 2016). Stres oksidatif merupakan keadaan tidak seimbangnya radikal bebas dengan antioksidan. Ketidakseimbangan tersebut terjadi karena ketidakmampuan pertahanan antioksidan menangkal radikal bebas. Stres oksidatif akan mengambil elektron atom dari komponen struktural maupun fungsional sel sehingga terjadi reaksi berantai (Parasmadhan, 2015). Reaksi berantai radikal bebas dengan asam lemak tak jenuh menghasilkan peroksidasi lemak (Kurniawan, 2016).

Organ paru menjadi target utama kerusakan akibat asap rokok (Zhou *et al.*, 2016). Peroksidasi lipid ditimbulkan pada fase gas, meskipun radikal dan oksidan bebas pada fase gas memiliki waktu paruh tetapi mereka dapat

masuk ke dalam aliran darah dan mengakibatkan kerusakan oksidatif makromolekul (Lee *et al.*, 2017). Aldehida jenuh dan tak jenuh juga ditemukan pada fase gas. Kedua jenis aldehida tersebut bisa masuk aliran darah dan memproduksi ROS dan berinteraksi dengan enzim *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH). Jaringan sekitar paru-paru menjadi ikut berisiko mengalami stres oksidatif (Fitria *et al.*, 2013).

Peran asap rokok pada respon inflamasi seluler dan kerusakan oksidatif disajikan Gambar 2.2.



Sumber: (Ardiana, 2021)

Gambar 2.2. Respons Inflamasi Seluler dan Kerusakan Oksidatif Akibat Paparan Asap Rokok

Gambar 2.2 menunjukkan bahwa asap rokok terdiri atas superoksida dan ROS yang sangat tinggi (radikal hidroksil, hidrogen peroksida, dan peroksinitrit). Paparan ROS tersebut menyebabkan kerusakan vaskuler, termasuk struktur PUFA di membran lipid, oksidasi protein, rantai DNA

terputus, oksidasi reoxyribo nucleic acid (RNA), depolarisasi mitokondria, juga apoptosis akibat terjadinya mutasi protein inti, aktivasi sitokrom p53, dan kerusakan DNA itu sendiri. Mekanisme kerusakan DNA ke apoptosis terjadi melalui interferensi RNA pada pemeliharaan transkripsi gen sehingga mengubah kromatin DNA untai ganda dan mempengaruhi pemeliharaan gen yang sebagai akibatnya adalah munculnya lesi DNA persisten, dan perubahan kromatin DNA untai tunggal. Gangguan pemeliharaan gen juga berdampak pada proses transkripsional dimana saling berhubungan dengan perubahan kromatin DNA untai tunggal sebagai penyebab akumulasi mutasi yang berisiko meningkatkan kejadian kanker (Ardiana, 2021). Peroksidasi lipid menginisiasi kondisi patologis yang berasal dari kerusakan dan kematian sel tubuh (Suryadinata, 2018).

2.3. Air Kelapa Muda

2.3.1 Definisi

Air kelapa adalah air/cairan yang terdapat dalam buah kelapa atau juga cairan endosperm kelapa yang di dalamnya mengandung banyak nutrisi seperti vitamin, gula, mineral, protein, asam amino bebas serta faktor-faktor pemacu pertumbuhan (Nair & Rajamohan, 2014). Air kelapa bisa dikonsumsi saat buah kelapa berumur muda (sekitar 8 bulan) (Barlina, 2016) ataupun ketika sudah tua (12 bulan) (Simpala, 2020). Air kelapa berperan sebagai dasar bagi pertumbuhan endosperma, terutama saat masih di tahap inti atau *nuclear phase*. Seiring dengan waktu, fase inti berangsur berubah menjadi

fase seluler atau cellulair phase, dimana endosperma melekat atau menempel pada lapisan kulit tempurung bagian dalam (*coconut rind*) (Winarno, 2014).

2.3.2 Sejarah asal usul kelapa

Tanaman kelapa termasuk mudah tumbuh di wilayah tropis misalnya Indonesia yang disebut sebagai negara penghasil kelapa terbanyak. Tanaman kelapa menurut sejarahnya dikatakan berasal dari Amerika Latin yang berikutnya menyebar ke kawasan Asia dan Pasifik, ada juga yang berpendapat berasal dari Pasifik menyebar ke Asia, Afrika dan Amerika. Berdasarkan jumlah populasinya yang terbanyak adalah di Indonesia, ada juga yang menyatakan bahwa asal sebenarnya dari pohon kelapa adalah Nusantara (Simpala, 2020).

2.3.3 Morfologi tanaman kelapa

Tanaman kelapa umumnya memiliki batang tegak tunggal dengan tinggi mencapai 10-14 meter lebih. Tampilan batang beruas, namun ruas tersebut tidak tampak ketika umur pohon kelapa sudah tua. Tanaman kelapa disebut sebagai tanaman serbaguna, mulai dari batang, buah, daun hingga tempurungnya, semua dapat dimanfaatkan oleh manusia. Kelapa memiliki sebutan yang berbeda-beda, yaitu *coconut* (Inggris), *cocotier* (Perancis), nyiur (Indonesia), serta *kambil/kerambil* (Jawa). Kelapa termasuk dalam famili *Palmacea*, suku aren-arenan (*Areceaceae*), *kingdom plantae*, ordo *Arecales*, genus *cocos*, dan spesies *Cocos nucifera* (Rahmat, 2020).

Tanaman kelapa memiliki bunga majemuk terdiri atas bunga jantan dan betina yang terlindung oleh bractea. Buah kelapa memiliki ukuran diameter 10-20 cm dengan kulit luar berwarna kuning, coklat ataupun hijau. Buah kelapa tersusun atas kulit luar (eksokarp), sabut (mesokarp), tempurung/batok (endokarp), kulit daging (testa), daging buah (endosperm), air kelapa dan lembaga (Rahmat, 2020). Bagian-bagian dari kelapa tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Bagian-bagian Buah Kelapa

2.3.4 Kandungan air kelapa muda dan manfaat kesehatan

Jumlah kalori dan protein yang terkandung dalam 230 mL air kelapa muda adalah sebanyak 46 kalori dan 2 gram, serta kandungan garam sodium serta natriumnya yang relatif sangat tinggi yaitu 252 mg serta serat sebesar 3 gr dan total kandungan lemak 0,5 gr yang 80% diantaranya merupakan lemak jenuh. Air kelapa muda juga mengandung semua kelompok vitamin B (kecuali B6 dan B12), asam folat (6 mcg), vitamin C (5,8 mg), dan mineral (kalsium (Ca) 57,6 mg; besi (Fe) 0,7 mg; magnesium (Mg) 60 mg; kalium

(K) 600 mg; dan zinc (Zn) 0,2 mg) (Winarno, 2014), juga mengandung L-arginine (Nair & Rajamohan, 2014). Beberapa dari kandungan dari air kelapa muda seperti Mg, Ca, vitamin C dan L-arginine memiliki efek memperbaiki toksisitas reproduksi yang disebabkan oleh nikotin (Nair & Rajamohan, 2014).

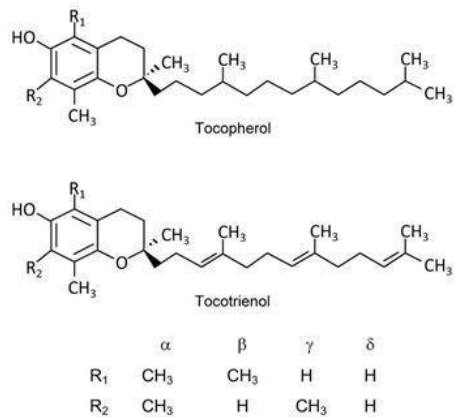
Air kelapa selain mengandung beberapa zat yang telah disebutkan, juga mengandung selenium (Se). Zat-zat seperti Fe, Mg, Zn, L-arginine dan vitamin C dapat meningkatkan status antioksidan endogen sehingga dapat menurunkan kadar TNF- α , *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL) dan malondialdehid (MDA) pada tikus model nefropati (Sudiyono *et al.*, 2021). L-arginine secara signifikan dapat menurunkan radikal bebas dalam tubuh, juga dapat meregenerasi sel β pankreas yang menyebabkan aktivitas enzim yang mengatur metabolisme karbohidrat sehingga kerusakan pankreas dapat kembali normal. Air kelapa juga mengandung polifenol (flavonoid) dan cuprum (Cu) (Zulaikhah *et al.*, 2021b).

2.4. Vitamin E

Vitamin E adalah nutrisi larut lemak yang juga dikenal sebagai tokoferol yang jika dalam kondisi defisiensi dapat berakibat pada gejala-gejala neurologis seperti ataksia dan lemah otot. Vitamin E dapat ditemukan terutama dalam bibit gandum, minyak nabati, kuning telur, dan sayuran berdaun hijau atau dibuat secara sintetis sebagai antioksidan. Vitamin E membantu memproteksi sel dari radikal bebas yang dihasilkan oleh konversi

makanan menjadi energi, paparan asap rokok, sinar ultraviolet matahari, dan polusi udara (National Institute of Health, 2021)

Vitamin E adalah zat larut lemak berasal tubuh yang memiliki struktur molekular tersusun atas cincin kromanol dengan sebuah rantai samping yang terletak pada posisi C2. Vitamin E terdiri atas delapan kelompok senyawa berbeda yaitu α -, β -, γ -, dan δ -tokoferol serta empat tokotrienol yang saling berhubungan (Bruno & Mah, 2014; Niki & Abe, 2019). Keempat tokoferol tersebut memiliki sisi rantai fitil jenuh, sedangkan tokotrienol memiliki sisi rantai isoprenil tak jenuh yang mengandung tiga ikatan ganda pada C3', C7', dan C11'. Sisi rantai ikatan ganda tokotrienol pada rantai C3 dan C7 memiliki konfigurasi *trans*. Bentuk α -, β -, γ -, dan δ - berbeda menurut jumlah dan posisi kelompok metil pada cincin kromanol. Bentuk α -tokoferol dan tokotrienol memiliki tiga kelompok metil pada posisi C5, C7 dan C8 cincin kromanol, sedangkan bentuk β - dan γ -memiliki dua kelompok metil, dan bentuk δ - memiliki satu kelompok metil seperti yang digambarkan pada Gambar 2.4 (Niki & Abe, 2019). α -tokoferol dan γ -tokoferol adalah bentuk vitamin E yang paling banyak dalam makanan dan *in vivo*, namun α -tokoferol yang banyak dibutuhkan karena merupakan satu-satunya bentuk yang dapat merubah defisiensi vitamin E (Bruno & Mah, 2014).



Gambar 2.4. Struktur Kimia Homolog Vitamin E (Niki & Abe, 2019)

Sumber vitamin E berasal dari minyak jagung, minyak zaitun, minyak kelapa, minyak dedak padi, minyak kedelai, minyak bunga matahari, dan minyak bibit gandum. Vitamin E merupakan mikronutrien penting dan telah diterapkan dalam berbagai bidang meliputi kedokteran, farmasetik, kosmetik dan makanan. Vitamin E berperan penting dalam meningkatkan kesehatan dan mencegah atau mengobati berbagai penyakit dan gangguan fisiologis. Dosis rekomendasi vitamin untuk dewasa adalah 15 mg (22,4 IU) untuk dewasa (Niki & Abe, 2019), sedangkan kebutuhan harian α -tokoferol diperkirakan sekitar 12 mg/hari (Atkinson *et al.*, 2013).

Suplementasi vitamin E dapat menurunkan produksi mediator inflamasi NFkB dan TNF- α serta menurunkan produksi kolagen yang terkait dengan inflamasi hepatic. Vitamin E dapat didaur ulang dengan bantuan vitamin C agar terbentuk antioksidan yang bermanfaat, namun karena vitamin C juga poten sebagai prooksidan dan menyebabkan akumulasi besi hepatic, maka

suplementasi vitamin E dan C secara bersamaan tidak direkomendasikan (Webb, 2013).

Suplementasi vitamin E pada penelitian terdahulu dalam dosis 100 dan 200 mg/kgBB pada tikus putih jantan galur *Wistar* yang dipapar cisplastin 5 mg/kg secara intraperitoneal dapat menurunkan kadar protein TNF- α (Shidqy *et al.*, 2020), sedangkan pada penelitian lain pemberian vitamin E topikal dosis 5 mg/ml maupun sistemik dosis 33,5 mg/hari selama 21 hari dapat menurunkan kadar MDA pada lensa mata tikus putih jantan galur *Wistar* yang dipapar asap rokok (Liyanti, 2019). Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa vitamin E dosis 1,8 IU/200 grBB yang diberikan selama 14 hari pada tikus putih jantan galur *Wistar* yang dipapar asap rokok kretek 3 batang/hari dapat meningkatkan kadar GPx (Zulaikhah *et al.*, 2021c). Vitamin E dengan dosis dalam penelitian terdahulu yang dikombinasikan dengan pemberian air kelapa muda terbukti dapat menghambat proses peroksidasi lipid (Zulaikhah *et al.*, 2021c).

2.5. Pengaruh Pemberian Air Kelapa Muda Terhadap Kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang Dipapar Asap Rokok

Hasil pembakaran tembakau atau asap rokok meliputi radikal bebas seperti superoksida, hidrosil radikal, hidrogen peroksida serta peroksinitrit. Senyawa-senyawa tersebut memapar sel-sel endotel dan menyebabkan perubahan makromolekul termasuk struktur PUFA pada membran lipid, oksidasi protein, ruptur rantai DNA, oksidasi RNA, depolarisasi mitokondria, serta apoptosis. Peristiwa-peristiwa tersebut menghasilkan kerusakan sel dan

berdampak pada stres oksidatif. Asap rokok juga menstimulasi respon inflamasi yang berhubungan dengan peningkatan kadar sitokin dalam sistem sirkulasi seperti TNF- α serta interleukin-6 (IL-6) yang ada hubungannya dengan berbagai penyakit akibat rokok atau diperparah oleh rokok (Ardiana, 2021).

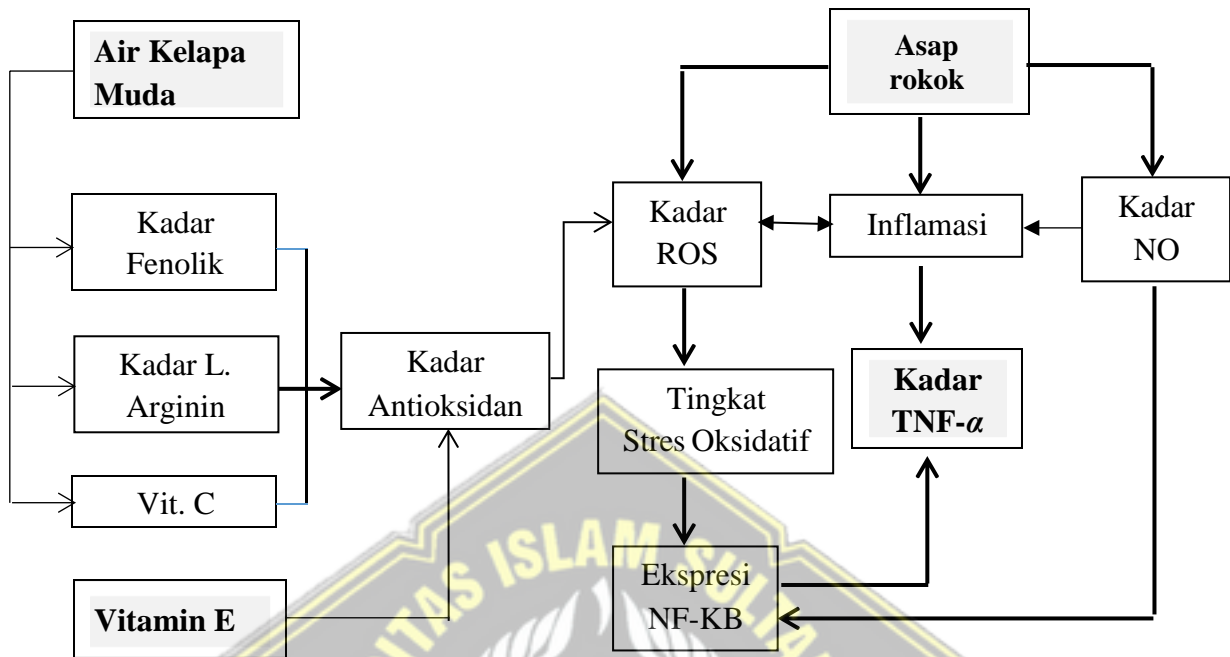
Asap rokok juga dapat mempengaruhi perkembangan dan fungsi sel-sel imunitas bawaan dan adaptif. Pada imunitas bawaan, asap rokok dengan berbagai senyawa radikal bebasnya mengganggu makrofag, sel-sel NK, dan sel-sel dendritik. Makrofag dan sel NK merupakan penghasil TNF- α , sehingga perubahan terhadap makrofag dan sel NK akan mempengaruhi kadar TNF- α . Paparan asap rokok disebut meningkatkan respon sel NK. Mekanisme molekuler paparan asap rokok terhadap sel-sel imun menurut penelitian sebelumnya terjadi dengan cara menginisiasi jalur pensinyalan MAPK, sehingga meregulasi aktivasi *transcription factor* (TF) dan memengaruhi kapasitas pengikatan DNA lebih dari 20 TF, termasuk NF κ B. Perubahan fungsional TF berkontribusi pada perubahan transkripsi gen target mereka, termasuk sitokin inflamasi dan kemokin. Aktivasi NF κ B oleh stres oksidatif berperan penting pada inflamasi (Qiu *et al.*, 2017).

Air kelapa muda yang dikenal memiliki berbagai senyawa antioksidan memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai penangkal radikal bebas (ROS) pada perokok, karena flavonoid memiliki efek antiinflamasi dengan cara menghambat sintesis prostaglandin (PG) (Zulaikhah *et al.*, 2021b). Zat-zat seperti Fe, Mg, Se, Zn, L-arginine dan vitamin C dalam air kelapa muda juga

dapat meningkatkan status antioksidan endogen sehingga dapat menurunkan kadar TNF- α (Sudiyono *et al.*, 2021).



2.6. Kerangka Teori



Gambar 2.5. Kerangka Teori

2.7. Kerangka Konsep



Gambar 2.6. Kerangka Konsep

2.8. Hipotesis

Pemberian air kelapa muda berpengaruh terhadap kadar TNF- α pada tikus putih jantan galur *Wistar* yang dipapar asap rokok.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *posttest control group design*.

3.2 Variabel dan Definisi Operasional

3.2.1 Variabel

3.2.1.1 Variabel Bebas

Pemberian air kelapa muda

3.2.1.2 Variabel Terikat

Kadar TNF- α

3.2.1.3 Variabel Prakondisi

Paparan asap rokok

3.2.2 Definisi Operasional

3.2.2.1 Pemberian Air Kelapa Muda

Air yang terdapat pada buah kelapa hijau (lapisan endosperma berwarna hijau). Air kelapa muda yang digunakan berasal dari buah kelapa usia 5-6 bulan yang didapatkan dari daerah Jogja dan sekitarnya. Air kelapa muda diberikan secara sonde oral selama 14 hari dengan dosis 8 mL/200 grBB/hari.

Skala: ordinal

3.2.2.2 Kadar TNF- α

Kadar TNF- α adalah kadar sitokin proinflamasi TNF- α Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok, diukur dari sampel plasma menggunakan metode ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) dan dinyatakan dalam satuan pg/ml.

Skala: rasio

3.2.2.3 Paparan Asap Rokok

Paparan asap rokok pada penelitian ini merupakan variabel prakondisi yaitu upaya yang dilakukan agar tikus uji terkena/menghirup asap hasil pembakaran 3 batang rokok kretek per hari selama 14 hari. Paparan asap rokok dilakukan dengan cara menempatkan tikus dalam *smoking chamber* (Wahid *et al.*, 2019)

Skala: nominal

3.3 Populasi dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi penelitian ini tikus putih jantan galur *Wistar* yang dipelihara di Laboratorium Hewan Coba PAU Universitas Gadjah Mada Yogyakarta,

3.3.2 Sampel

Sampel penelitian yaitu Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang memenuhi kriteria berikut:

1. Kriteria inklusi sebagai berikut:

- a) Umur : 6-8 minggu
- b) Berat badan : 150-200 gram

2. Kriteria eksklusi sebagai berikut:

- a) Tikus sakit atau mati saat adaptasi.
- b) Tikus sakit atau mati saat penelitian.
- c) Tikus pernah digunakan untuk eksperimen lain.

Besar sampel minimal untuk binatang coba dihitung dengan rumus (Arifin & Zahiruddin, 2017):

$$n = DF/k + 1$$

n = jumlah sampel

DF = *degrees of freedom* (untuk uji beda >2 kelompok tidak

berpasangan, nilai DF yang direkomendasikan adalah 10 – 20)

k = jumlah kelompok uji (4 kelompok)

sehingga besar sampel penelitian ini adalah:

$$\text{Minimal} = 10/4 + 1 = 3,5 \sim 4$$

$$\text{Maksimal} = 20/4 + 1 = 6$$

Jumlah kelompok penelitian ini sebanyak 4 kelompok, dan berlandaskan pada prinsip 3R (*Replacement, Reduction, and Refinement*) peneliti menggunakan sebanyak 6 ekor untuk tiap

kelompok, sehingga total digunakan 24 ekor tikus putih jantan galur *Wistar*.

3.4 Instrumen dan Bahan Penelitian

3.4.1 Instrumen penelitian

1. Kandang tikus ukuran 35 x 27 x 12 cm
2. *Smoking chamber*
3. Mikropipet dan tip
4. ELISA reader
5. *Plate sealer*
6. Botol pencuci atau *automated microplate washer*
7. *Timer*
8. *Polypropylene vials*

3.4.2 Bahan penelitian

1. Tikus putih jantan galur *Wistar*
2. Air kelapa muda
3. Kapsul vitamin E
4. *Aquadest*
5. *Deionized water*
6. Antibodi pendeteksi TNF- α manusia
7. Avidin-HRP B
8. *Stop solution*
9. *Substrat solution D*
10. Ketamine

11. Xylazine

3.5 Cara Penelitian

3.5.1. Pengajuan *Ethical Clearance*

Ethical clearance penelitian diajukan kepada FK Unissula Semarang.

3.5.2. Penetapan dosis air kelapa muda dan vitamin E

Dosis air kelapa muda dan vitamin E yang digunakan yaitu 8 mL/200 grBB/hari dan 1,8 IU/200 grBB/hari vitamin E (Zulaikhah *et al.*, 2021).

3.5.3. Adaptasi hewan coba

Tikus diadaptasi dalam 1 minggu terlebih dahulu dengan lingkungan yang baru agar terbiasa dan tidak mengalami stress yang dapat berdampak pada hasil penelitian.

3.5.4. Menyiapkan kandang tikus beserta tempat pakan dan minum

Kandang yang digunakan untuk tikus dengan ukuran 35 x 27 x 12 cm. Kandang dilengkapi dengan tempat pakan dan botol air minum berkapasitas 265 ml, diberi alas sekam padi dan diberi penutup kawat kasa.

3.5.5. Paparan asap rokok

Jumlah rokok kretek yang digunakan merujuk pada penelitian terdahulu yaitu sebanyak 3 batang/hari selama 14 hari (Aditya *et al.*, 2014; Wahid *et al.*, 2019). Pada penelitian Adytia *et al.* (2014) kelompok tikus yang dipapar asap rokok memiliki kadar MDA

sebesar 13,7 ppm jauh lebih tinggi dibandingkan dengan kadar MDA pada tikus normal (0,09 ppm). Pada penelitian Wahid *et al.* (2019) diperoleh peningkatan kadar MDA organ paru hingga 4 kali lipat (0,214 ppm) dibandingkan dengan kadar MDA paru pada tikus normal yaitu 0,036 ppm (Wahid *et al.*, 2019).

Cara pemaparan dilakukan dengan memindahkan tikus dalam smoking chamber sesuai pembagian kelompok. *Smoking chamber* adalah kotak pengasapan dengan sekat jeruji untuk memisahkan tikus dengan ujung rokok yang dibakar. Tikus yang dimasukkan ke dalam *smoking chamber* dapat terpapar asap rokok secara langsung. Paparan asap rokok diberikan dalam berulang kali hembusan asap menggunakan tabung injeksi sampai rokok terbakar habis (Aditya *et al.*, 2014; Wahid *et al.*, 2019). Jumlah rokok yang dibakar dalam satu hari sebanyak 3 batang dibagi dalam dua waktu pembakaran masing sebanyak 1,5 batang dilakukan pada jam 08.00 dan 14.00. Cara pemaparan asap rokok dilakukan dengan menempatkan tikus pada smoking chamber yang dilengkapi dengan dua lubang, dimana yang pertama berfungsi sebagai jalan pengeluaran hasil pemaparan asap rokok kretek, sedangkan lubang kedua untuk memasukkan rokok kretek yang telah dinyalakan. Hembusan rokok kretek dibuat dari alat *smoking pump* sampai rokok mati.

3.5.6. Pemberian perlakuan

1. Kelompok kontrol normal (K1): kelompok tikus yang hanya diberi pakan standar *ad libitum* + aquadest.
2. Kelompok kontrol negatif (K2): kelompok tikus yang diberi pakan standar *ad libitum* + aquadest dan dipapar asap rokok kretek selama 14 hari.
3. Kelompok perlakuan (K3): kelompok tikus yang diberi pakan standar *ad libitum* + aquadest dan dipapar asap rokok kretek ditambah diberi air kelapa muda 8 mL/200 grBB selama 14 hari.
4. Kelompok kontrol positif (K4): kelompok tikus yang diberi pakan standar *ad libitum* + aquadest dan dipapar asap rokok kretek ditambah diberi vitamin E dosis 1,8 IU/200grBB/hari selama 14 hari.

Pemberian air kelapa muda dilakukan dengan cara menarik kulit kuduk tikus dengan tangan kiri dengan posisi kulit tersebut terjepit oleh ibu jari dan telunjuk, dan diperkuat dengan jepitan pangkal ibu jari dengan jari lainnya pada kulit punggung tikus, kemudian ekor dikait dengan kelingking tangan kiri. Sonde yang telah diisi air kelapa muda kemudian dimasukkan secara hati-hati hingga sampai ke lambung, setelah sonde dipastikan sudah masuk dalam lambung air kelapa muda kemudian dipompakan keluar. Volume air kelapa muda yang dimasukkan ke dalam lambung adalah 4 mL/200 grBB dalam satu kali pemberian di pagi hari dan diulang pada siang hari pada dosis yang sama (Prodi DIK, 2019). Pemberian

air kelapa muda dilakukan pada 2 jam setelah paparan asap rokok (Rusmini *et al.*, 2019). Vitamin E yang digunakan vitamin E acetate (δ - α -tokoferol asetat) dengan merek Natur E® produk dari Darya Varia Laboratoria berbentuk kapsul lunak, dimana tiap kapsul mengandung 100 IU δ - α -tokoferol (1 IU = 0,67 mg α -tokoferol (Liyanti, 2019). Vitamin E diambil dalam bentuk liquid dan diberikan secara sonde oral selama 14 hari dengan dosis 1,8 IU/200 grBB/hari dengan cara yang serupa dengan pemberian air kelapa muda dalam dosis terbagi 8 mL/200 grBB tiap kali pemberian..

3.5.7. Proses terminasi hewan coba, pengambilan sampel darah

3.5.7.1 Setelah akhir pemberian perlakuan, tikus dipuaskan selama 12 jam kemudian dilakukan pengambilan sampel darah menggunakan tabung mikrohematokrit steril, ependorf penampung darah dan kapas steril. Pengambilan sampel darah dilakukan dalam kondisi tikus dianestesi terlebih dahulu dengan 1 mL ketamin dosis 70-100 mg/kgBB dan 0,75 mL xylazine dosis 2 mg/kgBB yang disuntikkan di salah satu kaki belakang/paha tikus. Tikus kemudian dibiarkan selama \pm 5-10 menit agar efek obat bius (anestesi) bekerja, baru kemudian dilanjutkan pengambilan darah dengan cara menusukkan tabung mikrohematokrit pada daerah sinus orbitalis (kantus medial) hingga menembus kulit luar sampai terdengar bunyi klik, kemudian tikus

dimiringkan sehingga darah mulai menetes dari tabung mikrohematokrit dan darah ditampung dalam ependorf. Darah yang ditampung dalam ependorf sebanyak 2cc. Tabung mikrohematokrit selanjutnya dicabut setelah darah yang diperlukan mencukupi. Sisa darah pada daerah sinus orbitalis kemudian dibersihkan dengan kapas steril (B2P2VRP, 2015).

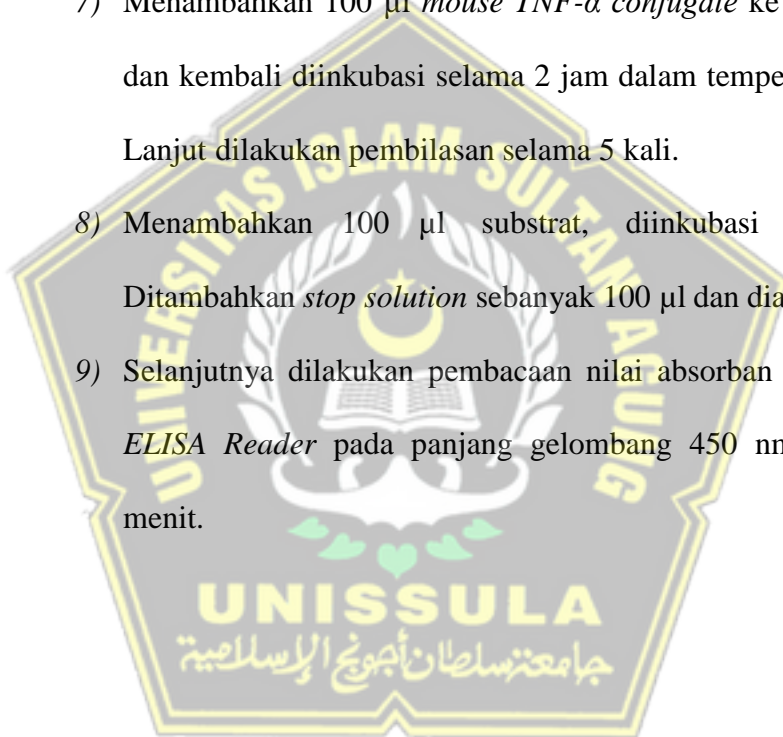
3.5.7.2 Sampel darah ditempatkan dalam tabung *venoject* yang telah diisi EDTA kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit sehingga didapat dua lapisan yaitu bagian atas adalah plasma sedangkan bagian bawah yaitu eritrosit. Pemeriksaan TNF- α dilakukan pada bagian plasma.

3.5.8. Cara pemeriksaan kadar TNF- α

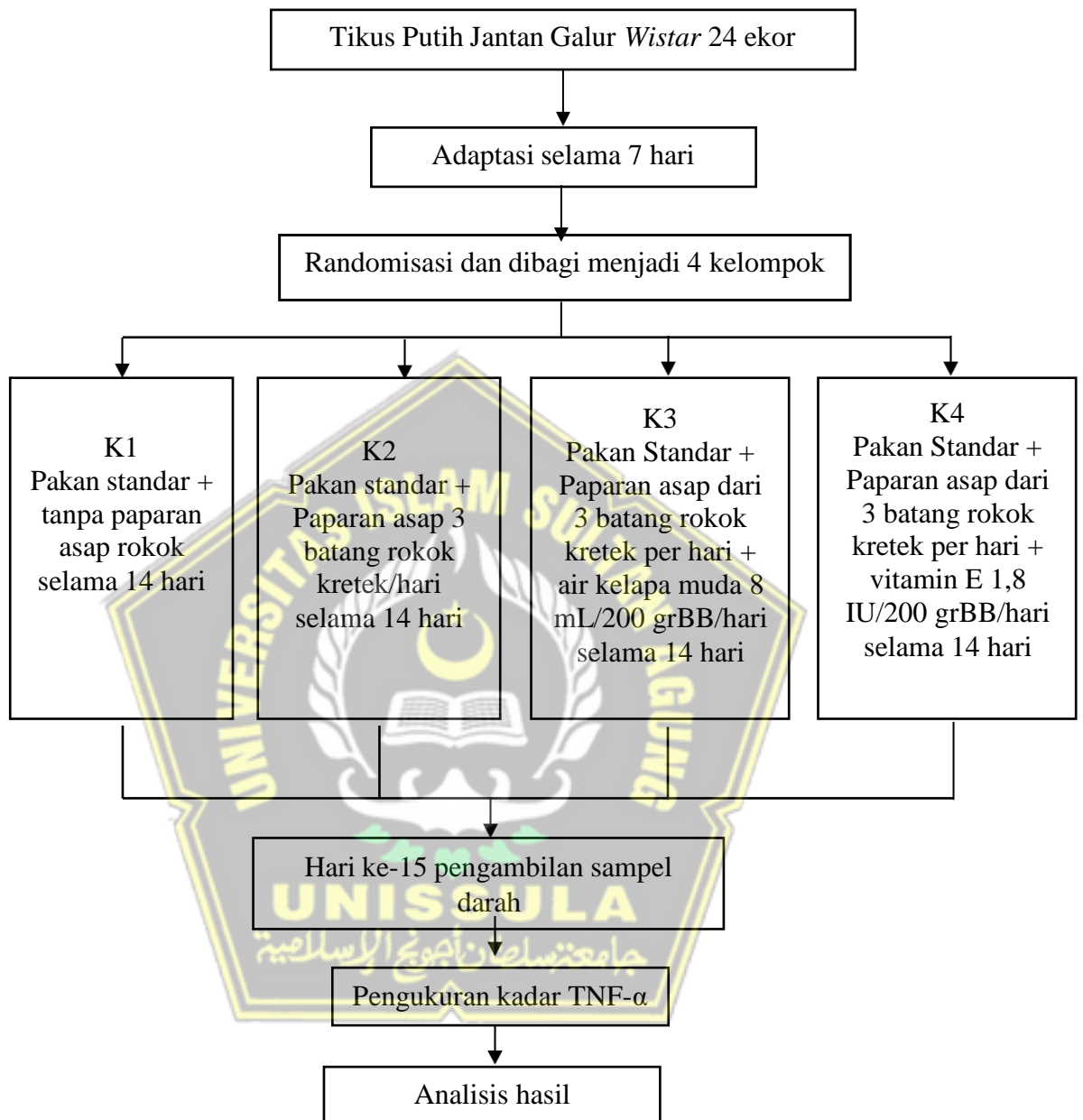
Tahap-tahap pemeriksaan kadar TNF- α dilakukan menurut penelitian sebelumnya (Yuliyani, 2013), yaitu:

- 1) Menyiapkan reagen, sampel plasma, dan standard *dilution* serta sumuran/*microplate*.
- 2) Melakukan preparasi standard pada *mouse TNF- α kit* dengan cara menambahkan 1 ml air yang telah dideionisasi, dilanjutkan dengan melakukan sentrifugasi selama 5 menit.
- 3) Preparasi serupa juga dilakukan pada larutan kontrol *mouse TNF- α kit*.

- 4) Membuat berbagai larutan standar dan memasukkan 50 μ l larutan uji ke semua sumuran, ditambahkan dengan 50 μ l standard, kontrol dan sampel pada tiap sumuran dan menginkubasi selama 2 jam dalam temperatur ruangan.
- 5) Menyiapkan *wash buffer* sebanyak satu kali
- 6) Melakukan pembilasan sebanyak 5 kali pasca proses inkubasi
- 7) Menambahkan 100 μ l *mouse TNF- α conjugate* ke tiap sumuran, dan kembali diinkubasi selama 2 jam dalam temperatur ruangan. Lanjut dilakukan pembilasan selama 5 kali.
- 8) Menambahkan 100 μ l substrat, diinkubasi 30 menit. Ditambahkan *stop solution* sebanyak 100 μ l dan diaduk.
- 9) Selanjutnya dilakukan pembacaan nilai absorban menggunakan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 450 nm selama 30 menit.



3.6 Alur Penelitian



Gambar 3.1. Alur penelitian

3.7 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium PAU Universitas Gadjah

Mada Yogyakarta pada bulan Maret 2022.

3.8 Analisis Hasil

Data kadar TNF- α merupakan data dengan skala variable rasio. Analisis yang pertama kali dilakukan adalah uji normalitas dengan uji *Shapiro wilks* dan homogenitas dengan *levene test*. Hasil analisis didapatkan distribusi data normal dan homogen sehingga kadar TNF- α antar kelompok dianalisis lebih lanjut dengan uji *One Way Anova* dan uji *Post Hoc LSD* dengan keputusan menerima signifikansi perbedaan pada $\alpha \leq 5\%$. Pengolahan analisis data dilakukan dengan software *SPSS for Windows* versi 22.0.

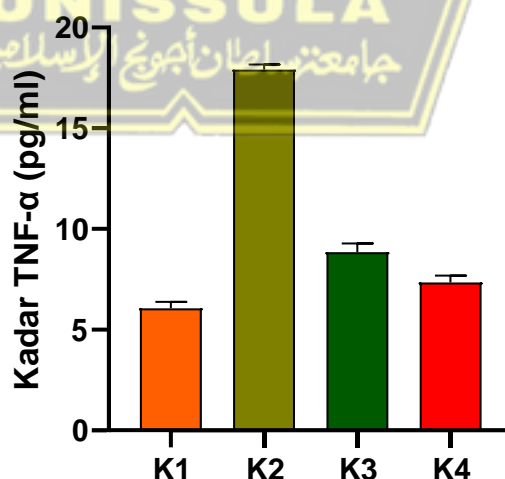


BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada 24 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar* yang dipapar asap rokok. Paparan asap rokok diberikan selama 14 hari dari pembakaran 3 batang rokok terbagi dalam 2 (dua) kali pemaparan. Dua jam setelah paparan asap rokok tikus diberi air kelapa muda dalam dosis 4 mL/200 grBB atau vitamin E dalam dosis 0,9 IU/200 grBB per satu kali pemberian. Hasil akhir yang didapatkan adalah kadar TNF- α dari 4 (empat) kelompok uji: K1 adalah kelompok tikus normal, K2-K4 kelompok tikus yang dipapar asap rokok. K3 adalah kelompok tikus yang diberi air kelapa muda, sedangkan K4 adalah kelompok tikus yang diberi vitamin E. Kadar TNF- α diperiksa dengan ELISA *reader* dan didapatkan rerata kadar TNF- α per kelompok sebagai berikut:



Kelompok Uji

Gambar 4.1. Rerata kadar TNF- α antar kelompok

Tampak pada Gambar 4.1 bahwa kelompok K2 memiliki rerata kadar TNF- α tertinggi ($17,9 \pm 0,26$ pg/ml), sedangkan kelompok K1 memiliki rerata kadar TNF- α terendah ($6,1 \pm 0,30$ pg/ml). Rerata kadar TNF- α di kelompok K3 ($8,8 \pm 0,43$ pg/ml) dan K4 ($7,3 \pm 0,32$ pg/ml) lebih rendah daripada di K2, namun lebih tinggi daripada di kelompok K1.

Kadar TNF- α tersebut berikutnya dianalisis sebaran data serta homogenitas variannya untuk menentukan jenis alat analisis yang dapat digunakan untuk menguji ada tidaknya perbedaan kadar TNF- α antar kelompok. Normalitas sebaran data dianalisis dengan uji Shapiro Wilk sedangkan homogenitas varian data dianalisis dengan uji Levene. Hasil analisis tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil analisis normalitas sebaran data dan homogenitas varian

Kelompok	<i>p-value</i>		
	<i>Shapiro Wilk</i>	<i>Levene</i>	<i>One way anova</i>
K1	0,737		
K2	0,825	0,903	0,000
K3	0,825		
K4	0,987		

Hasil uji Shapiro Wilk didapatkan nilai p di atas 0,05 untuk tiap-tiap kelompok, artinya sebaran data kadar TNF- α di kelompok K1 sampai dengan K4 semuanya normal. Hasil uji Levene juga didapatkan nilai p di atas 0,05 yang artinya homogenitas varian kadar TNF- α di keempat kelompok adalah homogen. Sebaran data yang normal dan varian data yang homogen menjadi syarat uji beda parametrik, sehingga perbedaan kadar TNF- α antar keempat kelompok diuji dengan *one way anova* dan didapatkan nilai p sebesar 0,000

($p < 0,05$) yang artinya terdapat perbedaan kadar TNF- α diantara keempat kelompok. Hasil uji *one way anova* dilakukan analisis lebih lanjut dengan uji *post hoc* LSD untuk melihat perbedaan kadar TNF- α antar dua kelompok. Hasil uji *post hoc* tampak pada Tabel 4.2 berikut:

Tabel 4.2. Hasil analisis perbedaan kadar TNF- α antar dua kelompok

Kelompok	Rerata perbedaan	P
K1 >> K2	-11,8	0,000
K1 >> K3	-2,8	0,000
K1 >> K4	-1,3	0,000
K2 >> K3	9,1	0,000
K2 >> K4	10,6	0,000
K3 >> K4	1,5	0,000

Perbedaan kadar TNF- α antar dua kelompok semuanya bermakna ($p < 0,05$). Kadar TNF- α kelompok K2, K3, dan K4 secara bermakna lebih tinggi daripada K1 dengan selisih masing-masing sebesar 11,8 pg/ml; 2,8 pg/ml; dan 1,3 pg/ml. Kadar TNF- α pada K3 dan K4 secara bermakna lebih rendah daripada di K2 dengan selisih masing-masing sebesar 9,1 pg/ml dan 10,6 pg/ml. Kadar TNF- α di kelompok K4 secara bermakna lebih rendah daripada di K3 dengan selisih sebesar 1,5 pg/ml.

4.2. Pembahasan

Kadar TNF- α pada kelompok tikus yang dipapar asap rokok lebih tinggi dibandingkan dengan kadar TNF- α pada kelompok tikus yang tidak dipapar asap rokok. Kadar TNF- α yang lebih tinggi tersebut disebabkan karena kandungan NO dari asap rokok yang menjadi penyebab terjadinya inflamasi (Ardiana, 2021). Penyebab peningkatan kadar TNF- α juga dapat disebabkan

radikal bebas dari asap rokok mengakibatkan teraktivasinya makrofag di saluran pernapasan dan menginduksi sekresi sitokin proinflamasi TNF- α melalui jalur ERK1/2 (Puspita, 2020; Kusumastuty *et al.*, 2015).

Pemberian air kelapa muda berpotensi menurunkan tingkat inflamasi akibat paparan asap rokok. Hal tersebut terlihat dari kadar TNF- α pada kelompok K3 yang secara bermakna lebih rendah daripada kadar TNF- α di kelompok K2. Penurunan kadar TNF- α disebabkan oleh kandungan zat-zat antioksidan dalam air kelapa muda seperti vitamin C, asam amino esensial dan non esensial, fenolik, flavonoid, dan mineral. Aktivitas antioksidan dari air kelapa muda sudah ditunjukkan dalam penelitian (Santos *et al.*, 2013) dengan IC₅₀ pada dosis 73 μ L dan dapat menurunkan produksi NO dan kadar MDA. Penurunan kadar TNF- α pada kelompok K3, dapat terjadi karena mekanisme tersebut. Air kelapa muda dengan aktivitas antioksidan yang dimiliki menurunkan kadar TNF- α melalui penurunan kadar NO dan MDA.

Nitrit oksida merupakan radikal bebas yang dihasilkan oleh makrofag yang diaktivasi oleh asap rokok. Pembentukan NO dimediasi oleh proses inflamasi melalui pelepasan sitokin proinflamasi salah satunya TNF- α , sehingga kadar NO yang tinggi dapat merepresentasi kadar TNF- α yang juga tinggi. Pada sebuah penelitian disebutkan bahwa perokok memiliki kadar NO lebih tinggi daripada bukan perokok (Karolina *et al.*, 2019). NO menurunkan kadar antioksidan endogen dan berperan besar dalam menghasilkan ROS, sehingga penurunan produksi NO akan menurunkan produksi ROS dan menghambat proses stres oksidatif yang dapat berlanjut pada peroksidasi

lipid yang salah satu markernya yaitu MDA (Febrina *et al.*, 2016). Pemberian antioksidan eksogen dari air kelapa muda dapat menggantikan antioksidan endogen yang berkurang sehingga produksi ROS dan peroksidasi lipid dapat dihambat (Sudiyono *et al.*, 2021; Zulaikhah *et al.*, 2021c). Peroksidasi lipid merepresentasi tingginya produksi radikal bebas dalam tubuh yang dapat memediasi proses inflamasi diantaranya melalui pelepasan TNF- α (Suryadinata, 2018).

Penurunan kadar TNF- α juga ditunjukkan oleh kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan diberi vitamin E dosis 1,8 IU/200grBB. Vitamin E pada kelompok tikus ini juga bertindak sebagai antioksidan. Vitamin E merupakan antioksidan nonenzimatik yang memiliki aksi memblok reaksi berantai dari radikal bebas melalui pendonoran atom H pada radikal peroksil (LOO*) menjadi radikal tokoferoksil (α -tokoferol-O*) yang relatif stabil dan inaktif untuk menginisiasi peroksidasi lipid sehingga reaksi-reaksi radikal berikutnya terhenti (Nimse & Pal, 2015). Produksi radikal bebas yang terhambat dengan demikian akan menghambat proses inflamasi sehingga kadar TNF- α menurun. Pada penelitian sebelumnya juga disebutkan bahwa vitamin E merupakan antioksidan poten yang efikasinya sudah teruji dalam menurunkan kadar TNF- α pada tikus yang dipapar asap rokok (Puspita, 2020).

Perbandingan efektifitas penurunan kadar TNF- α antara air kelapa muda dan vitamin E memperlihatkan bahwa aktivitas antioksidan vitamin E lebih superior daripada air kelapa muda (kadar TNF- α di kelompok K4 lebih rendah daripada di K3). Hasil tersebut disebabkan karena perbedaan daya

antioksidan antara vitamin E dan air kelapa muda. Vitamin E adalah antioksidan kuat dengan aktivitas antioksidan pada IC_{50} dalam dosis 21,8 $\mu\text{g/mL}$ (Lung & Destiani, 2018), sedangkan aktivitas antioksidan air kelapa muda pada IC_{50} terdapat pada dosis 73 μL (Santos *et al.*, 2013). Pada penelitian terdahulu juga didapatkan hasil bahwa efek pemberian air kelapa dalam menurunkan kadar $\text{TNF-}\alpha$ lebih rendah daripada efek pemberian vitamin E pada tikus Wistar yang dipapar asap rokok (Zulaikhah *et al.*, 2021a).

Kadar $\text{TNF-}\alpha$ pada kelompok tikus yang dipapar asap rokok dan diberi air kelapa muda ataupun vitamin E secara bermakna masih lebih tinggi daripada kadar $\text{TNF-}\alpha$ di kelompok tikus normal, menandakan bahwa dosis air kelapa muda dan vitamin E yang digunakan untuk menurunkan kadar $\text{TNF-}\alpha$ pada tikus yang dipapar asap rokok masih belum optimal. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat diambil makna bahwa paparan asap rokok dapat memicu proses inflamasi, dan proses tersebut dapat diredam melalui konsumsi air kelapa muda atau vitamin E.

Penelitian ini telah dilakukan dan diusahakan sesuai dengan standar ilmiah, namun masih terdapat keterbatasan diantaranya: dosis air kelapa ataupun vitamin E yang digunakan tidak bervariasi sehingga tidak diketahui dosis berapa yang optimal dalam meredam proses inflamasi akibat paparan asap rokok. Keterbatasan lainnya hanya menggunakan air kelapa muda dari salah satu jenis saja, sehingga tidak diketahui jenis kelapa mana yang paling bagus aktivitas antioksidannya.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

- 5.1.1. Terdapat pengaruh pemberian air kelapa muda terhadap kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok.
- 5.1.2. Rerata kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang tidak dipapar asap rokok adalah sebesar $6,1 \pm 0,30$ pg/ml.
- 5.1.3. Rerata kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok adalah sebesar $17,9 \pm 0,26$ pg/ml.
- 5.1.4. Rerata kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok dan diberi air kelapa muda dengan dosis 8 mL/200 grBB/hari adalah sebesar $8,8 \pm 0,43$ pg/ml.
- 5.1.5. Rerata kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok dan diberi vitamin E dosis 1,8IU/200 grBB/hari adalah sebesar $7,3 \pm 0,32$ pg/ml.
- 5.1.6. Rerata kadar TNF- α antara kelompok tikus yang tidak dipapar asap rokok dengan kelompok tikus yang dipapar asap rokok, ataupun antara tikus yang dipapar asap rokok dan diberi air kelapa muda atau vitamin E semuanya bermakna.

5.2. Saran

- 5.2.1 Meneliti pengaruh berbagai dosis pemberian air kelapa muda terhadap kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok.
- 5.2.2 Meneliti pengaruh pemberian air kelapa muda dari berbagai jenis terhadap kadar TNF- α pada Tikus Putih Jantan Galur *Wistar* yang dipapar asap rokok



DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, B.B., Gupta, S.C. & Kim, J.H. 2012. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119(3): 651–665.
- Agustin, I., Mayashinta, D.K., Sudjari & Indra, M.R. 2018. *Mengenal Toxoplasma gondii, Obesitas dan Sindrom Metabolik*. Malang: UB Press.
- Ardiana, M. 2021. *Telaah Ilmiah dan Patologi Paparan Asap Rokok Terhadap Penyakit Jantung*. Malang: Airlangga University Press.
- Arifin, W.N. & Zahiruddin, W.M. 2017. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 24(5): 101–105.
- Atkinson, J., Manor, D. & Parker, R. 2013. Vitamin E. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. New York: Elsevier, hal.545–50. Tersedia di <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786302002231>.
- Atzeni, F. & Sarzi-Puttini, P. 2013. Tumor Necrosis Factor. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, Second. Elsevier, hal.229–31.
- B2P2VRP 2015. *Pedoman Pengumpulan Data Reservoir (Tikus) di Lapangan: Riset Khusus Vektor dan Reservoir Penyakit*. Cetakan Pe ed. Jakarta: Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. Tersedia di <http://www.b2p2vrp.litbang.kemkes.go.id/publikasi/download/61>.
- Barlina, R. 2016. Potensi Buah Kelapa Muda Untuk Kesehatan dan Pengolahannya. *Perspektif*, 3(2): 46–60.
- Bruno, R.S. & Mah, E. 2014. *Vitamin E. Reference Module in Biomedical Sciences*. Ohio: Elsevier.
- Budiman, H.M., Berawi, K.N., Bustomi, E.C., Kedokteran, F., Lampung, U., Fisiologi, B., Kedokteran, F., Lampung, U., Ilmu, B., Komuitas, K., Kedokteran, F. & Lampung, U. 2018. Mekanisme Rokok dalam Meningkatkan Risiko Penyakit Alzheimer Smoking Mechanism in Increasing Risk of Alzheimer ' s Disease. 7: 234–240.
- Çetin, I., Çetin, A., Şen, A., Cimen, L., Çimen, B., Savas, G., Oztürk, A. & Koker, M.Y. 2018. Comparison of ELISA and flow cytometry for measurement of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . *Turkish Journal of Biochemistry*, 43(5): 540–548.
- Dikaningrum, Y. 2013. *Pengaruh Pemberian Sari Tomat Terhadap Perubahan Kadar MDA Pada Hewan Uji Yang Di Induksi Asap Rokok*. Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Febrina, L., Helmi, H. & Rijai, L. 2016. Profil Kadar Malondialdehida, Glukosa

- Dan Kolesterol Pada Tikus Putih Yang Terpapar Asap Rokok. *Journal Of Tropical Pharmacy And Chemistry*, 3(4): 277–282.
- Fitria, F., Triandhini, R.R., Mangimbulude, J.C., Karwur, F.F., Triandini, R., C.Mangimbulude, J. & Karwur, F.F. 2013. Merokok dan Oksidasi DNA. *Sains Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 5(2): 113–120.
- FK Hewan Unsyiah 2018. *Buku Ajar Patologi*. Banda Aceh: Syiah Kuala University Press.
- Ghezzi, P. 2011. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *International Journal of General Medicine*, 4: 105–113.
- Hacievliyagil, S.S., Mutlu, L.C. & Temel, I. 2013. Airway Inflammatory Markers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients and Healthy Smokers. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 16(1): 76–81.
- Kallioliass, G.D. & Ivashkiv, L.B. 2016. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*, 12(1): 49–62.
- Karolina, M.E., Darmawan, A. & Aurora, W.I.D. 2019. Perbandingan Kadar Nitric Oxide Pada Perokok Dan Bukan Perokok. *JAMBI MEDICAL JOURNAL “Jurnal Kedokteran dan Kesehatan,”* 7(1): 96–101.
- Kartini, D.S. 2018. *Analisis Kadar Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Cairan Bilasan Bronkus Pada Pasien Kanker Paru. PPDS-1 (SP.1) Ilmu Patologi Klinik FK Unhas, Universitas Hasanuddin.*
- Kemenkes RI 2021. *Peringati Hari Tanpa Tembakau Sedunia, Kemenkes Targetkan 5 Juta Masyarakat Berhenti Merokok*. Kemkes.go.id. Tersedia di <https://www.kemkes.go.id/article/view/21060100002/peringati-hari-tanpa-tembakau-sedunia-kemenkes-targetkan-5-juta-masyarakat-berhenti-merokok.html>.
- Khrisna, M.B. 2016. Perbedaan Kadar Malondialdehidida Pada Subyek Bukan Perokok, Perokok Ringan Dan Sedang-Berat. *Diponegoro Medical Journal (Jurnal Kedokteran Diponegoro)*, 5(4): 1235–1242.
- Klus, H., Boenke-Nimphius, B. & Müller, L. 2016. Cigarette mainstream smoke: The evolution of methods and devices for generation, exposure and collection. *Beitrag zur Tabakforschung International/ Contributions to Tobacco Research*, 27(4): 137–274.
- Knight, V., Long, T., Meng, Q.H., Linden, M.A. & Rhoads, D.D. 2020. Variability in the laboratory measurement of cytokines: A longitudinal summary of a college of American pathologists proficiency testing survey. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 144(10): 1230–1233.
- Kumar, V., Abbas, A.K. & Aster, J.C. 2020. *Buku Ajar Patologi Robbins - E-Book*. 10 ed. Singapore: Elsevier.
- Kurniawan, R. 2016. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Jahe Merah (Zingiber officinale var. Rubrum) Terhadap Kadar MDA Darah Tikus Setelah*

Terpapar Asap Rokok. Universitas Diponegoro Semarang.

- Kusumastuty, I., Adi, P., Budhi Harti, L. & Ari Nugroho, F. 2015. Pengaruh Pemberian Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* Lam) terhadap Kadar TNF-A, Il-6 dan Nf-Kb pada Tikus yang Dipapar Asap Rokok. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 28(3): 228–232.
- Lee, J., Taneja, V. & Vassallo, R. 2012. Cigarette Smoking and Inflammation: Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of Dental Research*, 91(2):142–149.
- Lee, K.H., Jeong, J., Koo, Y.J., Jang, A.H., Lee, C.H. & Yoo, C.G. 2017. Exogenous neutrophil elastase enters bronchial epithelial cells and suppresses cigarette smoke extract-induced heme oxygenase-1 by cleaving sirtuin 1. *Journal of Biological Chemistry*, 292(28): 11970–11979.
- Li, Y., Zheng, Y., Zhang, Y., Xu, J. & Gao, G. 2018. Antioxidant activity of coconut (*Cocos nucifera* L.) protein fractions. *Molecules*, 23(3): 1–11.
- Liyanti, R. 2019. *Pengaruh Pemberian Vitamin E Topikal Dan Sistemik Terhadap Kadar Malondialdehyde Lensa Tikus Percobaan Yang Diberi Paparan Asap Rokok*. Universitas Andalas. Tersedia di <http://scholar.unand.ac.id/54195/>.
- Lung, J.K.S. & Destiani, D.P. 2018. Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin A, C, E dengan Metode DPPH. *Farmaka*, 15(1): 53–62.
- Lushchak, V.I. 2012. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012: 1–26.
- Mahayothee, B., Koomyart, I., Khuwjitjaru, P., Nagle, M. & Müller, J. 2016. Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, and Medium Chain Fatty Acids Profiles of Coconut Water and Meat at Different Maturity Stages Phenolic Compounds, Antioxidant Activity, and Medium Chain Fatty Acids Profiles of Coconut Water and Meat at Differe. *International Journal of Food Properties*, 19(9): 2041–2051. Tersedia di <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2015.1099042>.
- Mifflin, L., Ofengeim, D. & Yuan, J. 2020. Receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1) as a therapeutic target. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(8):553–571. Tersedia di <http://dx.doi.org/10.1038/s41573-020-0071-y>.
- Nair, S.V.G. & Rajamohan, T. 2014. The Role of Coconut Water on Nicotine-Induced Reproductive Dysfunction in Experimental Male Rat Model. *Food and Nutrition Sciences*, 05(12): 1121–1130.
- Nasution, A.I. 2016. *Biomolekuler (untuk Ilmu Kedokteran Dasar)*. Banda Aceh: Syah Kuala University Press.
- National Institute of Health 2021. *Vitamin E*. ods.od.nih.gov. Tersedia di <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-Consumer/> [Accessed 31 Januari 2022].
- Niki, E. & Abe, K. 2019. Vitamin E: Structure, Properties and Functions. E. Niki,

- ed., *Vitamin E, Chemistry and Nutritional Benefits*. Tokyo: Royal Society of Chemistry, hal.2–3.
- Nimse, S.B. & Pal, D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35): 27986–28006. Tersedia di <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA13315C>.
- P2PTM Kemenkes RI 2018. *WHO: Rokok Tetap Jadi Sebab Utama Kematian dan Penyakit*. Tersedia di <http://p2ptm.kemkes.go.id/kegiatan-p2ptm/pusat-/who-rokok-tetap-jadi-sebab-utama-kematian-dan-penyakit>.
- Parasmadhan, R. 2015. *Pengaruh Ekstrak Tape Ubi Ungu (Ipomoea Batatas L.) Terhadap Aktivitas Antioksidan Total Darah Tikus Setelah Aktivitas Fisik Maksimal*. Universitas Diponegoro Semarang.
- Petersen, R.C. 2017. *Pathology Treatment*. 4(2): 240–283.
- Prodi DIK 2019. *Modul Praktikum Penanganan Hewan Coba*. Denpasar: FK Universitas Udayana. Tersedia di <https://www.s3ilmukedokteranunud.org/wp-content/uploads/2020/12/MODUL-PRAKTIKUM-Penanganan-Hewan-Coba.pdf>.
- Puspita, T.Y. 2020. *Pengaruh pemberian ekstrak daun kemangi (Ocimum citriodorum) terhadap kadar TNF- α tikus setelah paparan asap rokok*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Tersedia di <http://etheses.uin-malang.ac.id/18824/>.
- Qiu, F., Liang, C.L., Liu, H., Zeng, Y.Q., Hou, S., Huang, S., Lai, X. & Dai, Z. 2017. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget*, 8(1): 268–284.
- Rahmat, M. 2020. *Tanaman Penghasil Bahan Bakar*. Semarang: ALPRIN.
- Rauf, M. & Kusuma, M.I. 2021. *Bedah Emergensi Bidang Digestif*. Yogyakarta: Bintang Pustaka Madani.
- Rukmini, J., Rohini, C., Sireesha, L., Ritu, S. & GK, U. 2017. Antibacterial Efficacy of Tender Coconut Water (*Cocos nucifera* L) on *Streptococcus mutans*: An In-Vitro Study. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 8(5): 71–81.
- Rusmini, H., Fitriani, D., Hermawan, D. & Emilda, D.A. 2019. *Pengaruh Vitamin D3 Terhadap Kadar Hemoglobin Tikus Wistar yang Dipapar Asap Rokok*. *ARTERI : Jurnal Ilmu Kesehatan*, .
- Samsu, N. 2018. *Patogenesis Penyakit Ginjal Diabetik*. Malang: UB Press.
- Santos, J.L.A., Bispo, V.S., Filho, A.B.C., Pinto, I.F.D., Dantas, L.S., Vasconcelos, D.F., Abreu, F.F., Melo, D.A., Matos, I.A., Freitas, F.P., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G. & Matos, H.R. 2013. Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of coconut water (*Cocos nucifera* L.) and caffeic acid in cell culture. *Anais da Academia Brasileira de*

Ciencias, 85(4): 1235–1246.

- Sellati, T.J. & Sahay, B. 2014. Cells of Innate Immunity: Mechanisms of Activation. *Pathobiology of Human Disease, A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*. Elsevier, hal.258–74.
- Shidqy, E.M., Soebadi, D.M. & Hakim, L. 2020. Efek Pemberian Vitamin E (α -Tokoferol) Terhadap Kadar TNF α Serum pada Tikus Putih Strain Wistar yang Terpapar Cisplatin. *Indonesian Journal of Urology*, 27(2): 205–210.
- Simpala, M.M. 2020. *Dahsyatnya VCO, Gempur Covid-19 dan Penyakit Lainnya*. Yogyakarta: Lily Publisher.
- Sudiyono, Hadisaputro, S., Suwondo, A. & Santoso, G. 2021. Green Coconut Water Against The Risk of Contrast Induced Nephropathy. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*, 14(4): 1837–1840.
- Suryadinata, R.V. 2018. Pengaruh Radikal Bebas Terhadap Proses Inflamasi pada Penyakit Paru Obstruktif Kronis (PPOK). *Amerta Nutrition*, 2(4): 317.
- U.S. Department of Health and Human Services 2020. *The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General*. cdc.gov. Tersedia di https://www.cdc.gov/tobacco/basic_information/health_effects/index.htm.
- Valaperti, A., Li, Z., Vonow-Eisenring, M. & Probst-Muller, E. 2020. Diagnostic methods for the measurement of human TNF-alpha in clinical laboratory. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 179(113010).
- Wahid, R.S., Kabo, P. & Djabir, Y.Y. 2019. Efek Pemberian Vitamin A terhadap Perubahan Peroksidasi Lipid Paru pada Tikus yang Terpapar Asap Rokok Akut. *Celebes Health Journal*, 1(2): 2685–1970. Tersedia di <http://journal.ildikti9.id/CPHJ/indexDOI:https://doi.org/>.
- Webb, C.B. 2013. Antioxidant Drugs. *Canine and Feline Gastroenterology*. Elsevier, hal.477–80.
- Winarno, F.G. 2014. *Kelapa Pohon Kehidupan*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Yuliyani, Y. 2013. Tingginya Kadar Tumor Necrosis Factor-A (Tnf-A) Plasma Pada Mencit Bunting Yang Terinfeksi Plasmodium Berghei Berhubungan Kuat Dengan Kadar Hemoglobin Yang Rendah Tetapi Tidak Berhubungan Dengan Berat Badan Janin Rendah. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Media Husada*, 2(1): 51–64.
- Zhou, G., Xiao, W., Xu, C., Hu, Y., Wu, X., Huang, F., Lu, X., Shi, C. & Wu, X. 2016. Chemical constituents of tobacco smoke induce the production of interleukin-8 in human bronchial epithelium, 16HBE cells. *Tobacco Induced Diseases*, 14(1): 1–9.
- Zulaikhah, S.T., Sampurna, Wibowo, J.W., Aini, H.F.N. & Pratama, A.A. 2021a. Tender Coconut Water Can Inhibit Inflammation Caused by Cigarette

Smoke. *Journal of Hunan University (Natural Sciences)* , 48(12): 28–35.

Zulaikhah, S.T., Wahyuwibowo, J., Suharto, M.N., Enggartiasto, B.H., Ortanto, M.I.R. & Pratama, A.A. 2021b. Effect of Tender Coconut Water (TCW) on TNF- α , IL-1 and IL-6 in Streptozotocin (STZ) and Nicotinamid (NA) Induced Diabetic Rats. *Pharmacognosy Journal*, 13(2): 500–505.

Zulaikhah, S.T., Wibowo, J.W. & Wibowo, M.S.B. 2021c. Pengaruh Air Kelapa Muda Terhadap Kadar Antioksidan Endogen Akibat Paparan Asap Rokok Pada Tikus Jantan Galur Wistar. *Jurnal Penelitian Kesehatan Suara Forikes*, 12(6): 290–293. Tersedia di <https://forikes-ejournal.com/ojs-2.4.6/index.php/SF/article/view/1284>.

