

**MODULASI LIMPOPOESIS PADA MENCIT BALB/c.  
PASCA PAPARAN ASAP ROKOK KRETEK  
MENGUNAKAN *DIVINE FILTER***

**SKRIPSI**

oleh :  
**FRANCISCA XAVERIA ESTI RAHAYU**  
**0810910041-91**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2012**

**MODULASI LIMPOPOESIS PADA MENCIT BALB/c.  
PASCA PAPARAN ASAP ROKOK KRETEK  
MENGUNAKAN *DIVINE FILTER***

**SKRIPSI**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

**oleh :**

**FRANCISCA XAVERIA ESTI RAHAYU**

**0810910041-91**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2012**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**MODULASI LIMPOPOESIS PADA MENCIT BALB/c.  
PASCA PAPARAN ASAP ROKOK KRETEK  
MENGUNAKAN *DIVINE FILTER***

oleh :

**FRANCISCA XAVERIA ESTI RAHAYU  
0810910041-91**

**Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
Pada Tanggal 10 Juli 2012  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**Muhaimin Rifa'i, S.Si. Ph.D.Med.Sc.  
NIP. 19680626 199702 1 001**

**Prof.Dr. Aulanni'am, drh. DES.  
NIP. 19600903 198802 2 001**

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Widodo, S.Si. PhD.Med.Sc  
NIP. 19730811 200003 1 002**

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Francisca Xaveria Esti Rahayu  
NIM : 0810910041-91  
Jurusan : Biologi  
Penulis Skripsi Berjudul : Modulasi Limpopoesis pada Mencit  
Balb/c. Pasca Paparan Asap Rokok Kretek Menggunakan *Divine  
Filter*

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam Skripsi ini. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi
2. Apabila di kemudian hari ternyata Skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan segala kesadaran

Malang, 3 Juli 2012  
Yang menyatakan,

Francisca Xaveria Esti Rahayu  
0810910041-91

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

**Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.**



**MODULASI LIMPOPOESIS PADA MENCIT BALB/c. PASCA  
PAPARAN ASAP ROKOK KRETEK MENGGUNAKAN *DIVINE***

***FILTER***

F.X.Esti Rahayu<sup>1</sup>, Muhaimin Rifa'i<sup>1</sup>, Aulanni'am<sup>2</sup>  
Jurusan Biologi<sup>1</sup>, Jurusan Kimia<sup>2</sup>, Fakultas Matematika dan Ilmu  
Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

**ABSTRAK**

Merokok merupakan kebiasaan manusia sejak jaman dahulu. Bahkan bagi sebagian orang, rokok sudah menjadi kebutuhan hidup yang tidak dapat ditinggalkan. Berdasarkan penelitian menyebutkan bahwa terdapat banyak komponen berbahaya dalam rokok. Sumitro et al. menemukan suatu terobosan baru yang bermanfaat bagi perokok. Penemuan ini menggunakan pendekatan nanoteknologi yang sedang berkembang pesat dan penemuan ini dinamakan *Divine Filter*. Rokok menggunakan *Divine Filter* ini sudah digunakan sebagai sarana penyembuhan penyakit, tetapi belum diketahui pengaruhnya terhadap modulasi jumlah sel B dan sel T. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh paparan asap *Divine Kretek* terhadap modulasi limfopoiesis pada mencit BALB/c. Hasil yang diperoleh adalah perlakuan pengasapan menggunakan *Divine Kretek* dapat menurunkan sel T CD4<sup>+</sup> dan sel T CD8<sup>+</sup> pada spleen dan timus dan sel B pada Sumsum tulang. Tetapi meningkatkan jumlah sel B pada spleen. Profil Limfosit pada perlakuan paparan asap *Divine Kretek* dapat dikelompokkan, bahwa filter B dan DF memiliki profil limfosit yang hampir mirip dengan kontrol (tanpa perlakuan apapun). Sedangkan rokok berfilter DE memiliki profil limfosit yang hampir sama dengan rokok berfilter biasa.

Kata kunci: *Divine Kretek* , limfopoiesis, spleen, sumsum tulang, timus

# LYMPHOPOESIS MODULATION ON MICE BALB/c. SMOKED EXPOSURE OF KRETEK WITH *DIVINE FILTER*

F.X.Esti Rahayu<sup>1</sup>., Muhaimin Rifa'i<sup>1</sup>, Aulanni'am<sup>2</sup>  
Biology Department<sup>1</sup>, Chemistry Department<sup>2</sup>, Faculty of  
Sciences, Brawijaya University, Malang

## ABSTRACT

Smoking is a habit of humans since antiquity. Even for some people, smoking rooms have become necessities of life that cannot be abandoned. Based on research mentioned that there are a lot of harmful components in cigarette. Sumitro et al. discovered a new breakthrough is beneficial for smokers. This discovery using nanotechnology approach is rapidly growing and invention was called the *Divine Filter*. Divine has been used clove cigarettes as a means of healing disease, but have not been known to affect the modulation amount of B cells and T cells. This research aims to determine the influence of exposure to smoke clove cigarettes against modulation limpopoesis Divine on mice BALB/c. The results obtained are fogging treatment using Divine Kretek can lower the CD4 T cells and CD8 T cells in the thymus and spleen and B cells in the bone marrow. But increasing numbers of B cells in the spleen. Profile of Lymphocyte in treatment of exposure to smoke clove cigarettes can be grouped, Divine that filter B profile have accumulations of lymphocytes and DF that is almost similar to controls (without any treatment). While cigarette with DE filter lymphocytes have a profile similar to the cigarette with usual filter.

Key word: *Bone marrow*, *Divine Kretek* , limpopoesis, spleen, thymus

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur atas berkat dan rahmat Tuhan Yang Maha Esa sehingga skripsi yang berjudul “**Modulasi Limpopoesis pada mencit BALB/c. Pasca Paparan Asap Rokok Kretek Menggunakan Divine Filter** ” ini dapat terselesaikan. Selama penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak yang telah memberikan saran, kritik dan dorongan semangat sehingga tiada ucapan yang lebih berarti kecuali kata terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Sutiman Bambang Sumitro, MS. Atas ilmu, motivasi dan kesempatan berpartisipasi dalam penelitian ini. Selain itu juga terima kasih banyak atas masukan, saran, dan kritik yang membangun untuk perbaikan penulisan skripsi ini.
2. Bapak Muhaimin Rifa'i, Ph.D,Med.Sc dan Ibu Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES. selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan bimbingan, nasehat, saran dan pengarahan dengan penuh kesabaran serta meluangkan waktunya untuk penyelesaian skripsi ini.
3. Bapak Widodo ,Ph.D, Med.Sc selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan masukan, saran dan kritikan yang membangun untuk perbaikan penulisan skripsi ini.
4. Ketua Program Studi Biologi dan para dosen di jurusan Biologi Fakultas MIPA, atas ilmu yang selalu bapak dan ibu berikan selama saya menempuh pendidikan di Universitas Brawijaya ini.
5. Kepala laboratorium Fisiologi Hewan beserta stafnya dan Kepala Bagian Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran atas fasilitas yang diberikan selama penelitian skripsi.
6. Keluarga yang sangat penulis sayangi: Mama, Papa, Eyangti, Uti, Kung serta semua anggota keluarga atas doa, motivasi , perhatian dan bantuan baik materiil dan spiritual.
7. Mbak Ulil, mbak Icha, mbak Dewi, Lili, Lilik dan Soni atas persahabatan yang terjalin serta motivasi, dukungan dan bantuannya dalam penyelesaian skripsi ini.
8. Teman-teman TK, SD, SMP, SMA dan teman-teman Biologi Angkatan 2008 atas persaudaraan yang terjalin. Semoga persaudaraan ini takkan pernah mati.

9. Sahabatku Vincentia dan Tria atas canda tawa, semangat dan motivasi dalam hidup.

10. Sahabatku Desi, Annie, Afi, Nining, Bintan, Vina, dkk. atas motivasi dan bantuannya dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu perbaikan dan saran yang membangun sangat diharapkan demi perbaikan di masa yang akan datang. Akhir kata semoga skripsi ini bermanfaat dan dapat memberikan sumbangan ilmu pengetahuan yang berguna.

Malang, 3 Juli 2012.

Penulis.



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI</b> .....	ii
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI</b> .....	iv
<b>ABSTRAK</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> ..	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR ISTILAH</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiv
 <b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan.....	3
1.4. Manfaat.....	4
 <b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
1.1. Rokok Kretek dengan <i>Devine Filter</i> .....	5
1.2. Efek Rokok Terhadap Sistem Imun.....	6
1.3. Penanda Molekul Permukaan.....	7
1.4. Teknik Dasar untuk Mempelajari Sistem Imun.....	8
1.5. Kerangka Berpikir.....	11
1.6. Kerangka Operasional .....	12
1.7. Hipotesis .....	14
 <b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.2. Deskripsi Hewan Coba dan Kelompok Perlakuan.....	15
3.3. Prosedur Kerja Penelitian.....	16
3.3.1. Perlakuan.....	16
3.2.2. Sectio Hewan Coba dan Preparasi Flowcytometri....	16
3.2.3. Analisis Flowcytometri.....	17
3.2.4. Analisis Data.....	17
3.2.4. Diagram Kerja.....	18

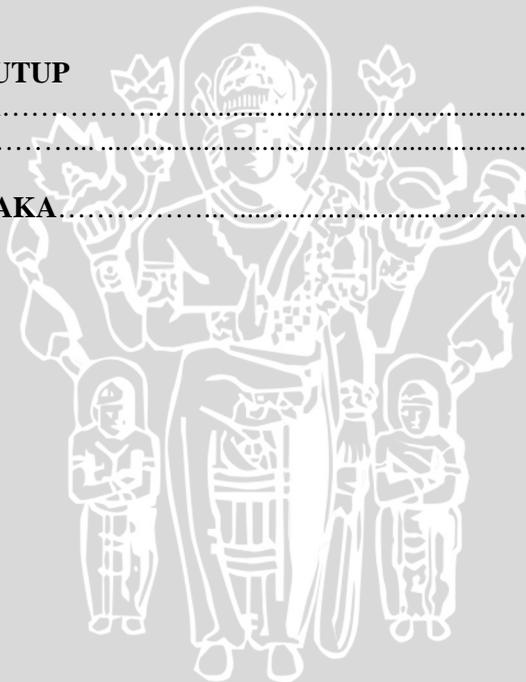
## **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1. Profil Kuantitas Sel T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> dan CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> pada Organ Timus.....	19
4.2. Profil Kuantitas Sel T CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> dan CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> pada Organ Limpa (Spleen).....	24
4.3. Profil Kuantitas Sel T CD4 <sup>+</sup> , CD62L <sup>+</sup> dan CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> pada Organ Limpa (Spleen).....	28
4.4. Profil Kuantitas Sel T CD8 <sup>+</sup> , CD62L <sup>+</sup> dan CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> pada Organ Limpa (Spleen).....	32
4.5. Profil Kuantitas Sel B B220 <sup>+</sup> pada Organ Sumsum Tulang ( <i>Bone marrow</i> ).....	35
4.6. Profil Kuantitas Sel B B220 <sup>+</sup> pada Organ Limpa (Spleen)..	39

## **BAB V PENUTUP**

5.1. Kesimpulan.....	42
5.2. Saran.....	42

<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	43
-----------------------------	----



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Skema Sederhana Sistem pada Flowcytometry .....	9
Gambar 2.2	Pengikatan spesifik dari Florochome yang terlabeli antibodi pada <i>cell surface antigens</i> .....	10
Gambar 2.3	Skema Kerangka Berpikir Penelitian .....	12
Gambar 2.3	Skema Kerangka Operasional Penelitian .....	13
Gambar 3.1	Diagram Kerja Penelitian .....	19
Gambar 4.1	Profil sel CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> dan CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> pada Organ Timus .....	20
Gambar 4.2	Profil sel CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> dan CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> pada Organ Limpa.....	25
Gambar 4.3	Profil sel CD4 <sup>+</sup> , CD62L <sup>+</sup> dan CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> pada Organ Limpa .....	28
Gambar 4.4	Profil sel CD8 <sup>+</sup> , CD62L <sup>+</sup> dan CD8 <sup>+</sup> CD62L pada Organ Limpa .....	32
Gambar 4.5	Grafik Jumlah sel yang mengekspresikan CD8 <sup>+</sup> dan CD62L <sup>+</sup> pada organ Limpa .....	33
Gambar 4.6	Histogram Profil sel B220 <sup>+</sup> pada organ Sumsum tulang .....	36
Gambar 4.7	Grafik Jumlah sel yang mengekspresikan B220 <sup>+</sup> pada organ Sumsum tulang .....	37
Gambar 4.8	Histogram Profil sel B220 <sup>+</sup> pada organ Limpa ..	39

## DAFTAR ISTILAH

- FITC** : Flourescein isothiocyanate
- IL** : Interleukin
- L-Selectin** : Leucocyte-Selectine (adhesion molecule)
- MHC** : Mayor Histocompatibility complex
- PE** : Pycoerythrin
- PBS** : Phosphat Buffer Saline
- BALB/C** : Galur mencit yang digunakan dalam penelitian ini
- B220** : Merupakan antibodi yang mengekspresikan semua sel hematopoetic yang berkembang ke arah sel B, sel T( naïf) dan monosit
- CD4** : Molekul permukaan sel penanda (Cluster of deferentiation 4) yang berkaitan dengan MHC II
- CD8** : Molekul permukaan sel penanda (Cluster of deferentiation 8) yang berkaitan dengan molekul MHC I
- Antibodi** : Suatu molekul glikoprotein yang disebut juga immunoglobulin (Ig) yang memiliki spesifitas dan afinitas yang tinggi dan diproduksi oleh sel plasma. Antibodi akan memediasi fungsi efektor seperti netralisasi antigen, aktifitas komplemen, dan menginisiasi destruksi mikrobia oleh leukosit
- Flowcytometry** : Suatu metode analisis fenotip suatu populasi sel dengan flowcytometer yang dapat mendeteksi label flouresence yang telah dilabelkan pada suatu suspensi sel yang mengekspresikan molekul tertentu dimana flouresence tersebut terlabel.
- Inflamasi** : Suatu reaksi kompleks pada jaringan terhadap trauma atau infeksi , ditandai oleh infiltrasi atau akumulasi leukosit, sel imun lainnya ke dalam jaringan dan protein plasma pada situs infeksi. Meskipun berfungsi perbaikan jaringan dan eliminasi antigen serta fungsi protektif, inflamasi dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan penyakit.

Interleukin : Suatu jenis Sitokin yang diproduksi oleh leukosit dan bekerja pada leukosit yang berbeda dari hasil uji anova

Sitokin : Protein yang diproduksi oleh berbagai jenis sel yang memediasi inflamasi, respon imun dan menginduksi hematopoiesis. Senyawa ini juga merupakan mediator penting dalam komunikasi sel-sel pada sistem imun.



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Dokumentasi Perlakuan Pengasapan.....	46
Lampiran 2. Data Berat Badan Mencit.....	47
Lampiran 3. Lampiran 3. Data Hasil One-way ANOVA Jumlah Sel Terekspresi pada Organ Timus. Limpa dan Sumsum Tulang pada Mencit BALB/c.....	48



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pada zaman modern ini, rokok bukanlah suatu benda asing lagi. Merokok merupakan kebiasaan manusia sejak jaman dahulu. Bahkan bagi sebagian orang, rokok sudah menjadi kebutuhan hidup yang tidak dapat ditinggalkan. Dewasa ini merokok disebut sebagai “Tobacco Depedency” atau ketergantungan pada tembakau. Ketergantungan pada tembakau didefinisikan sebagai perilaku penggunaan tembakau yang menetap, biasanya lebih dari ½ bungkus rokok per hari, dengan tambahan adanya distress yang disebabkan oleh kebutuhan akan tembakau secara berulang-ulang (Wijaya,2011).

*WHO Global Youth Tobacco Survey* (2000) menyebutkan bahwa 30% penduduk Indonesia adalah perokok. Jika dilihat dari jenis kelaminnya WHO mencatat 60% laki-laki dan 5% wanita Indonesia adalah perokok aktif. Penyakit-penyakit yang diakibatkan oleh rokok kini membunuh 1 dari 10 orang dewasa. Setiap 8 detik, terdapat seorang individu yang mati akibat penggunaan rokok. Prevalensi merokok semakin meningkat kira-kira 3,4% pertahun di negara-negara yang sedang berkembang (*WHO Global Youth Tobacco Survey*, 2000).

Pada tahun 2000, terjadi sekitar 4,8 juta kasus kematian prematur di seluruh dunia yang diakibatkan oleh kebiasaan merokok. Angka rata-rata itu diambil dari sedikitnya 3,9 juta sampai 5,9 juta kasus kematian akibat rokok. Dari 4,8 juta kematian itu, 2,4 juta kematian terjadi di negara-negara yang sedang berkembang dan 2,4 juta lainnya di sejumlah negara industri maju. Penyakit-penyakit kardiovaskuler tercatat sebagai penyebab 1,7 juta kasus kematian itu, 970.000 kasus penyempitan pernafasan akut, dan 850.000 lainnya karena kanker paru-paru (*WHO Global Youth Tobacco Survey*, 2000).

Rokok mengandung komponen kimia yang bahaya dan rokok menyebabkan radikal bebas karena pembakaran yang tidak sempurna

(Sumitro, 2009). Zat-zat yang berbahaya dalam rokok adalah karbon monoksida, nikotin dan merkuri. Komponen tersebut bersifat toksik karena dapat membentuk radikal bebas yang merupakan penyebab kerusakan sel. Komponen tersebut bersifat toksik karena dapat membentuk radikal bebas yang merupakan penyebab kerusakan sel. Menurut Marianti (2009) bahwa radikal bebas adalah produk yang terbentuk dari berbagai reaksi kimia dalam tubuh (misalnya metabolisme sel dan respirasi) dan juga dalam lingkungan yang terpolusi oleh asap rokok, asap kendaraan, bahan pencemar dan radiasi. Oksidan (radikal bebas) adalah molekul dimana elektron yang terletak pada lintasan paling luar tidak mempunyai pasangan. *Superokside* merupakan radikal bebas yang paling banyak terbentuk dalam tubuh. *Superokside* dapat dirubah menjadi hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida kemudian diubah menjadi radikal hidroksil. Radikal hidroksil inilah yang dapat menyebabkan peroksidasi lipid pada membrane sel, sehingga terjadi kerusakan sel.

Menurut penelitian dari Smith (2004) menyebutkan bahwa paparan rokok dalam level kronis akan memicu reaksi inflamasi berulang pada beberapa organ termasuk paru-paru. Reaksi inflamasi berulang tersebut dapat menyebabkan perubahan pada saluran nafas dan dapat mengakselerasi penurunan fungsi paru. Inflamasi dapat terjadi akibat respon imun yang berlebihan karena adanya antigen. Respon imun adaptif ditunjukkan dengan terbentuknya sel-sel limfosit (limfopoesis). Inflamasi ditandai dengan infiltrasi limfosit T, neutrofil dan makrofag pada dinding saluran nafas. Disamping itu terjadi juga pergeseran akan keseimbangan limfosit  $T\ CD4^+/CD8^+$ , dimana limfosit T sitotoksik ( $CD8^+$ ) akan menginfiltrasi saluran nafas sentral dan perifer.

Adanya fenomena bahwa asap rokok merupakan sumber oksidan penyebab stress oksidatif yang bersifat destruktif bagi jaringan dan dapat dihambat dengan adanya antioksidan (Tsuji, *et al.*, 2006). Hal inilah yang mendorong Sumitro *et al.* menemukan suatu terobosan baru yang bermanfaat bagi perokok. Penemuan ini menggunakan pendekatan nanoteknologi yang sedang berkembang pesat dan penemuan ini dinamakan *Divine Filter*. Inflamasi yang terjadi akibat paparan asap

rokok merupakan manifestasi dari aktivitas ROS dan komponen tembakau. *Divine Filter* ini mengandung senyawa asam amino yang dapat menginduksi partikel asap rokok untuk membentuk suatu blok nanostruktur. Blok nanostruktur tersebut berfungsi sebagai penangkal merkuri dan mampu menangkap Hg serta radikal bebas dalam tubuh (Sumitro,2009). Asap yang dihasilkan mampu menghasilkan nanopartikel dan bermanfaat bagi proses anabolisme biologis. Untuk itu, diperlukan studi lanjut untuk mengetahui potensi *Divine Kretek* dalam memodulasi sistem antioksidan dan imunitas sehingga diperoleh sistem pertahanan tubuh yang ideal. Penelitian ini akan difokuskan pada modulasi limpopoesis sel T dan sel B pasca paparan asap dari *Divine Kretek*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Mengacu pada latar belakang di atas, maka masalah yang dapat dikaji pada penelitian ini adalah :

1. Bagaimana modulasi jumlah sel T pada mencit BALB/c. akibat paparan asap dari rokok kretek menggunakan *Divine Filter*?
2. Bagaimana modulasi jumlah sel B pada mencit BALB/c. akibat paparan asap dari rokok kretek menggunakan *Divine Filter*?

## 1.3 Tujuan

Mengacu pada rumusan masalah di atas, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui modulasi jumlah sel T pada mencit BALB/c. akibat paparan asap dari rokok kretek menggunakan *Divine Filter*.
2. Untuk mengetahui modulasi jumlah sel B pada mencit BALB/c. akibat paparan asap dari rokok kretek menggunakan *Divine Filter*.

#### 1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah memperoleh informasi ilmiah terkait sistem imun untuk pertimbangan penelitian berikutnya dan pengembangan produk ini terkait potensi yang ditimbulkan.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Rokok Kretek dengan *Divine Filter*

*Divine Filter* merupakan hasil pemanfaatan ilmu nanoteknologi dalam pengurangan radikal bebas yang diakibatkan oleh asap rokok. Dalam asap rokok terdapat lebih dari 4000 jenis zat berbahaya, tapi zat-zat itu akan berbahaya jika mengenai tubuh dalam bentuk partikel-partikel individu. Zat yang berbahaya dalam asap rokok adalah merkuri radikal bebas. Radikal bebas inilah yang akan menyerang bagian-bagian tubuh, menyebabkan berbagai efek buruk rokok, bahkan menyebabkan kanker. Sumitro (2009) mengungkapkan bahwa penemuan ini menggunakan pendekatan nanobiologi yaitu dimana partikel-partikel asap rokok dibuat menjadi lebih kecil sehingga partikel asap lebih kompak.

Asap rokok mengandung komponen kimiawi yang jenisnya dapat mencapai puluhan ribu komponen. Komponen-komponen kimia yang terdapat dalam asap rokok terbukti membentuk partikulasi antara 1 sampai 10.000 nanometer (nm) (Lidia et al., 1996, Wayne et al., 2005, ning et al., 2006). Partikel-partikel ini terbentuk dari gabungan senyawa-senyawa organik dalam asap. Senyawa-senyawa tersebut memiliki potensi gaya magnetic dan elektromagnetik, dengan demikian komponen-komponen kimia yang bersifat aromatic di ujung batang rokok yang bersuhu 400-600°C dapat membentuk partikel (polimer). Secara individu komponen-komponen asap tersebut dapat menjadi berbahaya. Komponen tersebut jika dalam bentuk partikulasi akan menjadi tidak berbahaya lagi. Pembentukan polimer gabungan secara teoritis akan membentuk sifat gabungan yang berbeda dengan sifat masing-masing komponen (Albert et al., 1996).

Manfaat struktur nano tembakau pada rokok kretek menggunakan *Divine Filter* adalah karakteristik dari molekulnya yang memiliki interaksi intra spin-spin pada gugus HO-Phenanthrenedietyl yang

terkonjugasi pada struktur nano *Divine Kretek*. Struktur molekul ini memiliki densitas elektron yang tinggi dan sangat dinamis. Nanostruktur pada *Divine Filter* ini berfungsi sebagai molekul pemblokir yang stabil dan menjadi *transducer* Hg pada nikotin. Blok-blok molekul tersebut dapat menghilangkan toksisitas Hg. Penambahan *scavagers* atau senyawa aromatik mengakibatkan pembakaran merkuri (Hg) yang sempurna, sehingga asap rokok yang dihasilkan tidak berbahaya (Zahar, 2007).

*Divine Filter* mengandung aromatik yang dapat mengubah partikel asap rokok menjadi berukuran lebih kecil. Perubahan struktur tersebut, akan mengubah karakter dari partikel asap rokok. Karakter partikel nano pada asap rokok kretek menggunakan *Divine Filter* adalah (Divine Cigarette, 2010) :

1. Memiliki kecepatan hisap lebih tinggi
2. Berwarna biru translucent
3. Tidak berbau

Perubahan inilah yang membuat asap rokok yang masuk ke dalam tubuh menjadi tidak berbahaya lagi (Sumitro,2009).

Berikut adalah komponen dalam *Divine Filter*: (Sumitro,2009)

- Filter B: 1g/l Phenyl Alanine (larutan 1)  
0,4g/l Triptopan + 2g/l manitol (larutan 2)
- Filter DE: 1 g/l Acetosal + 1g/l Phenyl Alanine (larutan 1)  
1 g/l Metionine + 2 g Manitol (larutan 2)
- Filter DF: 1 g/l Acetosal + 1g/l Phenyl Alanine (larutan 1)  
1 g/l EDTA + 2g/l Manitol (larutan 2)

## 2.2 Efek Rokok Terhadap Sistem Imun

Rokok juga dapat mengakibatkan melemahnya sistem imun. Rongga mulut sangat mudah terpapar efek yang merugikan akibat merokok. Terjadinya perubahan dalam rongga mulut adalah disebabkan oleh mulut merupakan tempat awal terjadinya penyerapan zat-zat hasil pembakaran rokok. Temperatur rokok pada bibir adalah 30°C, sedangkan ujung rokok yang terbakar bersuhu 900°C (Fitzpatrick, 2000).

Asap panas yang berhembus secara terus-menerus ke dalam rongga mulut merupakan rangsangan panas yang menyebabkan perubahan aliran darah dan mengurangi pengeluaran saliva. Akibatnya, rongga mulut menjadi kering dan hal ini mewujudkan suasana anaerob sehingga memberikan lingkungan yang sesuai untuk tumbuhnya bakteri anaerob dalam plak. Secara otomatis, perokok berisiko lebih besar untuk mendapat infeksi bakteri penyebab penyakit jaringan pendukung gigi dibanding mereka yang bukan perokok (Hyde,2000).

Pada perokok, terdapat penurunan zat kekebalan tubuh yang terdapat di dalam saliva yang berguna untuk menetralkan bakteri dalam rongga mulut dan akhirnya menyebabkan gangguan fungsi-fungsi sel-sel pertahanan tubuh. Sel pertahanan tubuh tidak dapat mendekati dan memfagosit bakteri-bakteri yang menyerang tubuh sehingga sel pertahanan tubuh tidak peka lagi terhadap perubahan di sekitarnya maupun terhadap infeksi (Primates, et al, 2001).

Setiap orang dapat terpapar dengan berbagai macam jenis partikel yang terinhalasi selama hidupnya. Partikel-partikel tersebut merupakan penyebab iritasi yang berlebihan pada saluran pernapasan. Setiap partikel, bergantung pada ukuran dan komposisinya dapat memberikan kontribusi yang berbeda, dan dengan hasil akhirnya tergantung kepada jumlah dari partikel yang terinhalasi oleh individu tersebut (Lee, et.al, 2007).

### **2.3 Penanda Molekul Permukaan**

Penanda molekul permukaan merupakan marker yang bertujuan untuk mengidentifikasi terjadinya proliferasi dan diferensiasi sel hematopoietic progenitor ke arah pembentukan limfosit (*Lymphopoiesis*) dan eritrosit (*erythropoiesis*). Ekspresi dari proliferasi dan diferensiasi sel, pada limfosit maupun eritrosit, digunakan penanda permukaan yang disebut CD (*Cluster of differentiation*). Hal ini dijelaskan oleh Baratawidjaja (2006), misalnya CD4/CD8 dipergunakan sebagai marker untuk membedakan subset sel T CD4+ dan CD8+. CD4/CD62L dipergunakan sebagai marker untuk memori sel T CD4+, Sel B, monosit dan sel NK. Antigen B220 adalah marker

permukaan dalam populasi limfosit yang berbeda. Sel marker ini termasuk kelompok glikoprotein T200 (Baratawidjaja, 2000) Sementara T200 didapatkan secara dominan pada sel T dengan berat molekul antara 170000 dan 180 000. Marker B220 diekspresikan sebagian besar oleh sel B dengan berat molekul 220 000 (Baratawidjaja, 2006).

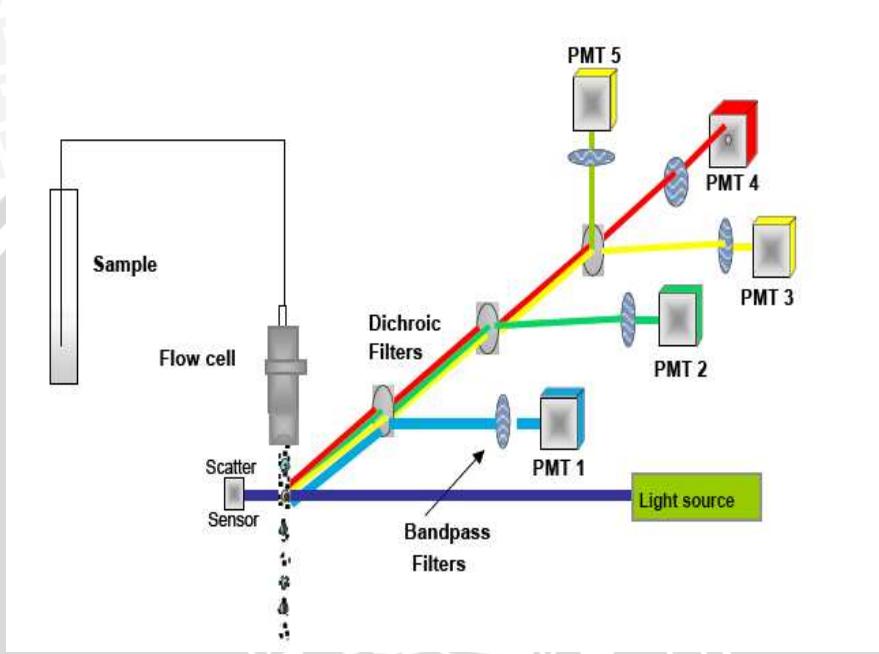
## 2.4 Teknik Dasar Mempelajari Sistem Imun

Sistem imun dapat menjadi parameter yang diukur untuk mengetahui efek toksisitas suatu bahan bagi tubuh. Banyak teknik untuk mempelajari sistem imun, antara lain ELISA, kultur sel limfosit, Flowcytometry, dan sebagainya. Teknik mempelajari sistem imun yang digunakan dalam penelitian ini adalah Flowcytometry (Ochatt, 2006).

Flowcytometry adalah teknologi yang secara bersamaan mengukur dan kemudian menganalisa beberapa karakteristik partikel fisik tunggal, biasanya sel yang mengalir dalam cairan melalui seberkas cahaya. Sifat-sifat yang diukur termasuk ukuran relatif partikel, rincian relatif atau kerumitan internal, dan intensitas relatif fluoresens. Karakteristik ini ditentukan menggunakan sebuah sistem elektronik optik penggabungan yang mencatat berapa sel atau partikel yang menyebar dan memancarkan cahaya laser fluoresens. Dalam flowcytometer, partikel dibawa untuk menghadang laser dalam aliran fluida. Ukuran partikel atau sel yang cocok untuk analisis adalah 0,2 - 150 mikrometer (Robinson,2006).

Sel-sel sebelum dianalisis harus dipisahkan dari jaringan padat. Bagian dari aliran cairan yang didalamnya terdapat partikel-partikel disebut inti sampel. Ketika partikel dilewati laser, maka akan menghamburkan cahaya laser. Setiap molekul fluoresens dipresentasikan oleh partikel yang berpendar. Sebaran cahaya fluoresens dikumpulkan oleh lensa pada suatu posisi yang tepat. Sebuah kombinasi dari berkas *splitter* dan *filter* mengarahkan sebaran sinar fluoresens pada detektor yang tepat. Detektor tersebut menghasilkan sinyal elektronik yang sebanding dengan sinyal optik yang mengenainya. Daftar data didapat dari masing-masing partikel. Karakteristik atau parameter dari setiap peristiwa didasarkan pada

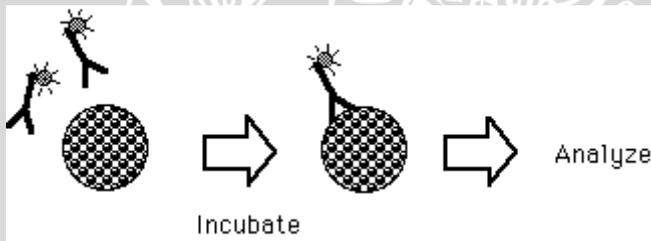
penyebaran cahaya dan properti floresens. Data dikumpulkan dan disimpan di komputer. Data ini dapat dianalisis untuk memberikan informasi tentang subpopulasi dalam sampel (Murphy,2006).



**Gambar 2.1** Skema Sederhana Sistem pada Flowcytometry (Murphy,2006)

Senyawa floresensi menyerap energi cahaya atas serangkaian panjang gelombang yang spesifik untuk untuk senyawa itu. Penyerapan cahaya ini menyebabkan elektron senyawa floresensi dibesarkan untuk tingkat energi yang lebih tinggi. Elektron cepat meluruh yang memancarkan energi yang berlebih sebagai foton. Transisi ini energi yang disebut floresensi. Kisaran di mana suatu senyawa yang bisa menjadi fluorezen tereksitasi yang disebut penyerapan yang lebar . Energi lebih banyak dikonsumsi pada penyerapan transisi daripada emisi transisi floresen, emisi panjang gelombang lebih panjang daripada penyerapan. Rentang panjang gelombang yang dipancarkan untuk senyawa tertentu disebut spektrum emisi. Ion laser argon umumnya

digunakan dalam flowcytometry karena cahaya 488-nm yang mengeksitasi lebih dari satu fluorochrome. Salah satu fluorochromes ini adalah fluorescein isothiocyanate (FITC). Dalam spektrum penyerapan FITC , jalur 488-nm adalah penyerapan FITC maksimum. Eksitasi dengan panjang gelombang ini akan menghasilkan emisi FITC yang tinggi. Jika fluorochrome tereksitasi oleh panjang-gelombang lain dalam spektrum penyerapan, cahaya emisi dari spektrum yang sama akan terjadi, tetapi itu tidak akan intensitas yang sama. Pewarna floresen terkonjugasi pada antibodi monoklonal, dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis sel tertentu yang didasarkan pada penanda antigenik individu yang ada di permukaan sel. Populasi dalam sebuah sel, fluorochrome yang berbeda dapat digunakan untuk membedakan subpopulasi yang terpisah. Pewarnaan subpopulasi pola yang sama, yang dikombinasikan dengan SSC dan FSC data yang ada , yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi sel yang ada pada sampel dan ,menghitung prosentase relatifnya (Watson, 2004).



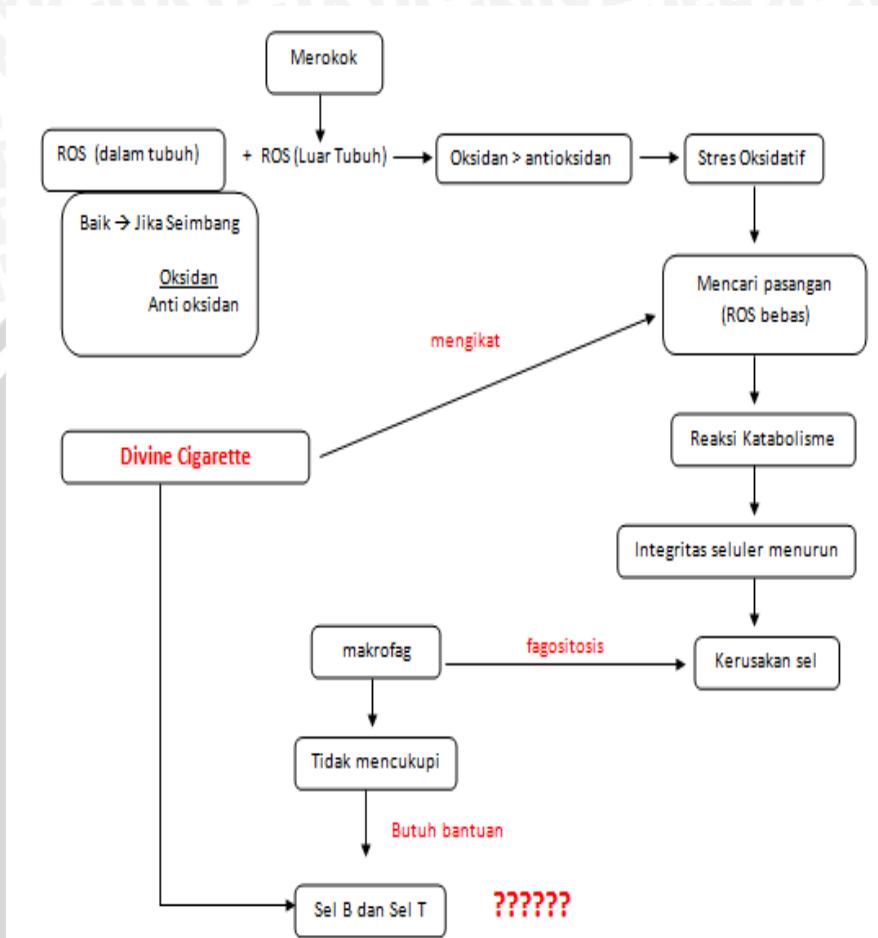
**Gambar 2.2** Pengikatan spesifik dari Florochrome yang terlabeli antibodi pada *cell surface antigens* (Watson, 2004).

## 2.5 Kerangka Berpikir

Pada dasarnya di dalam tubuh telah terdapat radikal bebas dari hasil metabolisme tubuh. Tubuh akan mengalami homeostasis saat prosentase jumlah oksidan dan antioksidan dalam tubuh itu seimbang. Merokok dapat menambah prosentase radikal bebas dalam tubuh, sehingga jumlah oksidan jauh lebih tinggi dibandingkan antioksidan. Hal ini menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif itu terjadi karena elektron bebas tidak memiliki pasangan, sehingga elektron bergerak bebas dalam tubuh dan menyebabkan terjadinya reaksi katabolisme. Berikutnya integritas seluler menurun sehingga mengakibatkan kerusakan sel. Akibat dari kerusakan sel tersebut, maka makrofag melakukan fagositosis. Jika makrofag yang melakukan fagositosis tidak mencukupi, maka perlu bantuan dari sel B dan sel T.

Rokok kretek menggunakan *Divine Filter* ini memiliki struktur nanoblok yang dapat menangkap elektron bebas dalam tubuh sehingga tidak dapat bergerak bebas lagi. Berikutnya reaksi katabolisme tidak terjadi. Sehingga penurunan integritas seluler dan kerusakan sel dapat dihambat. Maka dari itu penelitian ini ingin melihat modulasi dari sel B dan sel T yang terjadi pasca paparan asap *Divine Kretek*. Untuk memudahkan pemahaman tentang kerangka berpikir dari penelitian ini dapat dilihat pada gambar skema di bawah ini.





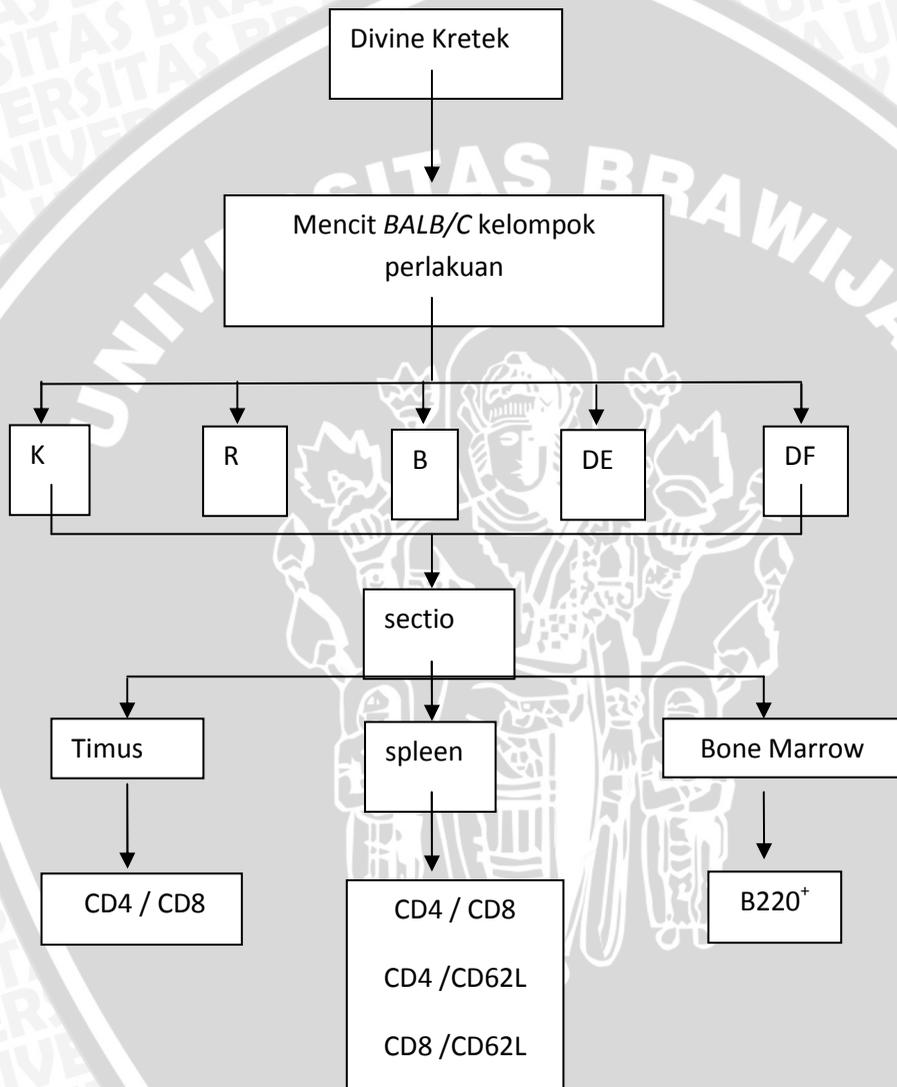
**Gambar 2.3** Skema Kerangka Berpikir Penelitian

## 2.5 Kerangka Operasional

Untuk pemecahan masalah dalam penelitian ini maka dibuat kerangka operasional dalam dua tahap penelitian. Tahap pertama dari penelitian ini adalah pengasapan menggunakan rokok berfilter pada mencit *BALB/C* dengan variasi rokok yang berbeda (Rokok kretek filter biasa, filter B, filter DE dan filter DF) selama 3 hari.

Pada tahap kedua adalah pemeriksaan pengaruh pengasapan terhadap perkembangan sel limfosit pada organ Timus, spleen dan bone marrow. Pada organ Timus perkembangan sel limfosit dengan

mengetahui prosentase dan jumlah sel yang mengekspresikan D4/CD8, Spleen : CD4/CD8, CD4/CD62L, CD8/CD462L dan B220+. sedangkan pada Bone marrow : B220+.



**Gambar 2.4** Skema Kerangka Operasional Penelitian

## 2.6 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan uraian yang telah dijelaskan di atas, maka dapat diajukan hipotesis dalam penelitian ini adalah paparan asap rokok kretek berfilter biasa dan menggunakan *Divine Filter* berpengaruh pada modulasi jumlah sel limfosit T dan B pada mencit jantan galur BALB/c.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2011 – April 2012 bertempat di Laboratorium Fisiologi Hewan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan analisis flowcytometri dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 3.2 Deskripsi Hewan Coba dan Kelompok Perlakuan

Penelitian ini menggunakan hewan coba yaitu mencit (*Mus musculus*) yang telah diajukan kelaikan etik dari KEP Universitas Brawijaya dengan kriteria galur BALB/c, pathogen free, jantan, umur 8 minggu, dengan keadaan sehat (bergerak aktif dan bulu tidak rontok). Mencit dipelihara pada bak plastik dalam *Animal Chamber*. Mencit diberi pakan BR-21 dan minum air mineral aqua secara *ad libitum*.

Penelitian ini menggunakan 25 ekor mencit yang dibagi dalam 5 kelompok. Lima kelompok perlakuan tersebut adalah:

1. Kelompok mencit yang tidak diberi perlakuan apapun sebagai kontrol negatif.
2. Kelompok mencit yang diberi pengasapan menggunakan rokok kretek komersial lokal Indonesia sebagai kontrol positif.
3. Kelompok mencit yang diberi pengasapan menggunakan rokok kretek komersial lokal Indonesia yang filternya telah diganti dengan *Divine* filter B.
4. Kelompok mencit yang diberi pengasapan menggunakan rokok kretek komersial lokal Indonesia yang filternya telah diganti dengan *Divine* filter DE.
5. Kelompok mencit yang diberi pengasapan menggunakan rokok kretek komersial lokal Indonesia yang filternya telah diganti dengan *Divine* filter DF.

### **3.3 Prosedur Kerja Penelitian**

#### **3.3.1 Perlakuan**

Paparan dilakukan selama 3 hari, sebanyak 2 kali sehari (pagi dan sore) dengan ketentuan pada masing-masing paparan terdiri dari 2 batang rokok selama 30 menit dan interval udara segar selama 5 menit (Wan, et.al., 2010). Paparan ini dilakukan pada *smoking chamber* (40x30x35cm) dengan *smoking pump*. Sebelum digunakan, rokok terlebih dahulu dijemur pada sinar matahari selama 10-15 menit (Sumitro, 2009).

#### **3.3.2 Sectio Hewan Coba dan Preparasi Flowcytometri**

Hewan coba dibunuh dengan dislokasi leher, kemudian dilakukan *sectio*. Spleen dan tymus diambil dan dihancurkan dalam *petri disk* berisi PBS menggunakan ujung spuit dengan cara memencet dan memutar searah jarum jam. Setelah itu disaring ke tabung sentrifuse 15ml menggunakan BD Cell strainer (100 $\mu$ m). Sedangkan untuk preparasi bone marrow, bagian femur mencit diambil dan dibersihkan dari jaringan lainnya. Kemudian tulang femur dipotong pada kedua ujungnya. Setelah itu diaspirasi menggunakan spuit 1ml berisi PBS. Cairan yang didapat kemudian disaring ke tabung sentrifuse 15 ml menggunakan BD Cell strainer (100 $\mu$ m). Semua cairan yang didapat dari preparasi spleen, tymus dan bone marrow disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit dengan suhu 15<sup>0</sup>C. Supernatan yang didapat dibuang dan pellet diresuspensi dengan PBS 1000 $\mu$ l. Pellet dipipetting dan diletakkan dalam microtube baru yang telah berisi 500 $\mu$ l PBS. Setelah itu, homogenat disentrifugasi 1500 rpm selama 3 menit, suhu 15<sup>0</sup>C. Supernatan yang di dapat dibuang dan pellet ditampung sehingga didapatkan sel-sel limfosit.

Pelet hasil dari preparasi organ limfoid kemudian diinkubasi dengan antibodi (1:500) selama 15 menit. Inkubasi ini dilakukan dalam ice box. Antibodi yang digunakan adalah antibodi BD Bioscience<sup>TM</sup> anti mouse CD4, anti mouse CD8, anti-mouse CD62L dan anti mouse B220.

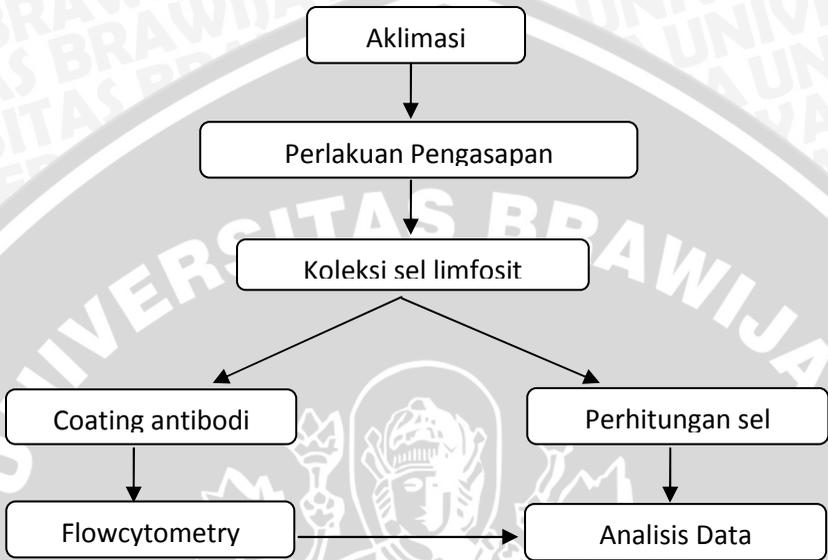
### 3.3.3 Analisis Flowcytometri

Langkah awal sebelum melakukan analisis dengan flowcytometer adalah dengan mengkoneksikan antara komputer dan flowcytometer. Pengaturan program pada komputer diatur sesuai parameter yang diinginkan, meliputi pengaturan instrument (Detector, Treshold, Compensation) menentukan *gated area* (R1) limfosit pada plot histogram, banyaknya jumlah sel yang akan dianalisis (Acquisition and storage : 10.000 of G1=R1), label antibodi yang digunakan dan kekuatan eksitasi laser serta nama sampel. Dilakukan setting plot pada *acquiring mode*, diatur parameter yang diinginkan pada sumbu X dan sumbu Y dan *gating area* (G1=R1). Dilakukan dua kali priming terlebih dahulu dengan flowcytometer dalam kondisi Low-Run. Setelah instrumen siap, sel yang telah di staining dengan antibodi ditambah 400  $\mu$ l PBS steril, kemudian di pipetting untuk menghomogenkan dan dimasukkan dalam kuvet Flow Cytometer menggunakan mikropipet. Kuvet dipasang pada nozzle BD FACS Calibur<sup>TM</sup> Flowcytometer dan ditekan panel "*acquire*" pada kotak Acquisition control. Hasil dari perhitungan dengan flowcytometer selanjutnya diolah menggunakan software BD CellQuest Pro<sup>TM</sup> dan dipresentasikan dalam bentuk histogram ataupun dot plot.

### 3.3.4 Analisis Data

Analisis data menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan uji ANOVA (selang kepercayaan 95%). Nilai p yang digunakan adalah 0.05, dimana hasil <0.05 dianggap signifikan. Apabila terdapat beda nyata, maka dilanjutkan dengan uji Turkey HSD. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS 17.0 for Windows.

### 3.3.5 Diagram Kerja



**Gambar 3.1** Diagram Kerja Penelitian

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

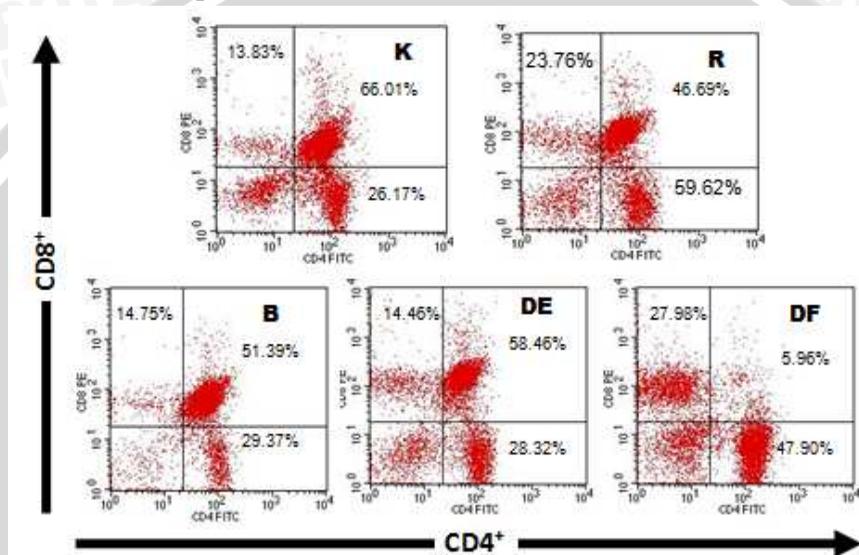
#### 4.1 Profil Kuantitas Sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> pada Organ Timus

Timus mengontrol sel T spesifik ke dalam sirkulasi dengan adanya seleksi positif dan negatif. Seleksi negatif perkembangan sel T dengan reseptor yang bersifat autoreaktif akan mengalami apoptosis, karena sel tersebut akan berpotensi sebagai sel yang membahayakan. Sedangkan, seleksi positif meliputi restriksi *major histocompatibility complex* (MHC), dimana klon yang dipertahankan adalah sel T yang dapat berikatan dengan MHC I dan II. Seleksi positif sel T CD8 dipengaruhi oleh molekul  $\beta 2$  mikroglobulin yang merupakan komponen dari MHC kelas I. Molekul  $\beta 2$  mikroglobulin diekspresikan oleh semua sel yang memiliki nukleus. Molekul  $\beta 2$  mikroglobulin terletak secara lateral dengan rantai  $\alpha 3$  MHC kelas I. Tidak seperti rantai  $\alpha 3$  MHC kelas I,  $\beta 2$  mikroglobulin tidak mempunyai bagian transmembran pada permukaan sel. Tepat di atas  $\beta 2$  mikroglobulin terdapat rantai  $\alpha 1$ . Rantai  $\alpha 1$  terletak secara lateral terhadap rantai  $\alpha 2$ . Pada mencit yang mengalami defisiensi  $\beta 2$  mikroglobulin akan kehilangan ekspresi MHC kelas I. Sebagai konsekuensi dari hilangnya ekspresi molekul MHC-kelas I, sel T CD8 tidak dapat berkembang karena seleksi positif CD8 memerlukan molekul MHC kelas I. Pada kejadian infeksi sel T CD4 dengan cepat merespon antigen yang telah dipresentasikan MHC kelas II. Respon sel T CD4 terhadap antigen bersifat spesifik, artinya hanya klon tertentu yang dapat merespon antigen itu. Respon sel T CD4 ini ditandai dengan adanya proliferasi dan pelepasan molekul-molekul efektor (Rifa'i, 2009).

Asap rokok dapat mengakibatkan respon inflamasi pada beberapa organ tubuh yang berhubungan dengan sistem pernafasan, contohnya paru. Hal ini ditandai dengan meningkatnya jumlah neutrofil, makrofag dan limfosit T yang didominasi oleh CD8<sup>+</sup>, peningkatan konsentrasi

sitokin proinflamasi seperti leukotrien B4, IL-8 dan TNF- $\alpha$  dan bukti bahwa stress oksidatif disebabkan oleh inhalasi asap rokok atau sel inflamasi yang diaktifkan (Agusti,2003;Dahesia,2005).

Berikut adalah profil sel CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> pada organ timus dari hasil penelitian.



**Gambar 4.1** Profil sel CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> : Prosentase ekspresi sel CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, dan CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> pada organ Timus. Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (E), Pengasapan rokok filter DF (F).

Sel T yang mengekspresikan CD4<sup>+</sup> (Sel T helper), pada organ Timus dari hasil analisis flowcytometri (**Gambar 4.1**) menunjukkan bahwa pada kontrol mengekspresikan CD4<sup>+</sup> 26.17%, pada pengasapan rokok biasa 59.62%, pada pengasapan rokok filter B 29.37 %, pada pengasapan rokok filter DE 28.32 %,dan pada pengasapan rokok filter DF prosentase ekspresi 47.90%. Sel T yang mengekspresikan CD8<sup>+</sup> (Sel T sitotoksik) pada organ timus menunjukkan bahwa pada kontrol mengekspresikan CD8<sup>+</sup> 13.83%, pada pengasapan rokok biasa rata-rata 23.76%, pada pengasapan rokok filter B rata-rata 29.75%, pada

pengasapan rokok filter DE rata-rata 14.46%, dan dengan pengasapan rokok filter DF prosentase ekspresi 27.98%. Sedangkan untuk sel CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> pada timus menunjukkan bahwa pada kontrol mengekspresikan CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 66.01%, pada pengasapan rokok biasa rata-rata 46.69%, pada pengasapan rokok filter B rata-rata 51.39%, pada pengasapan rokok filter DE rata-rata 58.46%, dan pada pengasapan rokok filter DF prosentase ekspresi 5.96%. Penurunan prosentase sel CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ini dikarenakan perlakuan pengasapan memacu intermediate double positif (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) untuk melakukan diferensiasi ke prekursor sel T sitotoksik (CD4<sup>+</sup>) dan sel T *helper* (CD8<sup>+</sup>).

Uraian di atas didukung oleh hasil perhitungan jumlah sel T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> yang di presentasikan dalam tabel di bawah ini.

**Tabel 4.1** Rerata Jumlah sel yang mengekspresikan CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> pada organ Timus

	Rerata Jumlah Sel 10 <sup>7</sup> sel/ml				
	K	R	B	DE	DF
CD4 <sup>+</sup>	4.46 ± 2.1	2.7 ± 1.4	2.9 ± 2	4.02 ± 1.2	2.15 ± 1.4
CD8 <sup>+</sup>	0.93 ± 0.3	1.03 ± 1.1	1.21 ± 1	1.14 ± 0.9	1.19 ± 0.5
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	4.9 ± 2.3	3.59 ± 2.1	4.18 ± 3.2	3.9 ± 2	2.9 ± 2

$\alpha = 0.05$
-----------------

Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (DE), Pengasapan rokok filter DF (DF).

Berdasarkan hasil ANOVA diketahui bahwa perlakuan pengasapan memberi pengaruh terhadap penurunan populasi sel T CD4<sup>+</sup> pada timus tetapi pengaruhnya tidak signifikan ( $p > 0.05$ ). Dari penghitungan jumlah sel (**gambar 4.1 dan tabel 4.1**) menunjukkan bahwa hasil ini dapat dikelompokkan pada beberapa *cluster* yakni kontrol (tanpa perlakuan apapun) berada pada satu *cluster* dengan rokok berfilter DE. Kandungan acetosal, phenyl alanine, metionine dan manitol pada filter DE

memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup> (penurunan  $0.44 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol). Cluster kedua yaitu rokok berfilter biasa, B dan DF. Kandungan phenyl alanine, triptopan dan manitol pada filter B ini memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup> dengan penurunan sebesar  $1.55 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol. Sedangkan kandungan acetosal, phenyl alanine, EDTA dan manitol pada filter DF ini memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup> dengan penurunan sebesar  $2.31 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol. Sedangkan pada rokok berfilter biasa penurunan sebesar  $1.76 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol.

Sitokin IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 yang dilepas sel mast yang terpajan antigen merangsang diferensiasi dan proliferasi set T<sub>h0</sub> menjadi sel T<sub>h2</sub> (CD4<sup>+</sup>). Nanopartikel yang dihasilkan oleh *Divine Kretek* dapat menurunkan produksi sitokin T<sub>h2</sub> (IL-4,IL-5,IL-6). Hal ini sesuai dengan penelitian Liu,Y. et.al (2009) yang menyebutkan bahwa nanopartikel yang bersifat *scavenger* dapat menurunkan produksi sitokin T<sub>h2</sub> (IL-4,IL-5,IL-6). Jika produksi sitokin T<sub>h2</sub> menurun maka diferensiasi dan proliferasi akan terhambat.

Selain itu, penurunan jumlah sel CD4<sup>+</sup> pada perlakuan pengasapan ini dimungkinkan karena terjadinya migrasi sel CD4<sup>+</sup> ke organ perifer seperti spleen dan paru. Hal ini sesuai dengan penelitian Albab (2012) yang menyebutkan bahwa perlakuan pengasapan meningkatkan jumlah sel CD4<sup>+</sup> pada paru. Dengan demikian pada paru terjadi respon terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh.

Dari penghitungan jumlah sel (**tabel 4.1**) menunjukkan bahwa perlakuan pengasapan rokok meningkatkan jumlah sel CD8<sup>+</sup>. Dari hasil ANOVA diketahui bahwa perlakuan pengasapan memberi pengaruh terhadap kenaikan populasi sel T CD8<sup>+</sup> tetapi pengaruhnya tidak signifikan ( $p > 0.05$ ). Perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter B meningkatkan jumlah sel CD8<sup>+</sup> lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter lainnya, yakni  $0.73 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Kemudian rokok berfilter DF berada pada urutan kedua dengan peningkatan sebesar  $0.26 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Berikutnya adalah rokok berfilter DE dengan peningkatan sebesar

$0.21 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Terakhir adalah rokok berfilter biasa dengan peningkatan sebesar  $0.1 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol.

Rendahnya jumlah sel  $CD8^+$  pada perlakuan pengasapan diakibatkan oleh beberapa hal, yaitu terjadinya migrasi sel  $CD8^+$  ke organ perifer seperti spleen dan paru. Hal ini sesuai dengan penelitian Albab (2012) yang menyebutkan bahwa perlakuan pengasapan meningkatkan jumlah sel  $CD8^+$  pada paru. Dengan demikian pada paru terjadi respon terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh. Kemungkinan kedua adalah sudah tidak terdapat sitokin hasil inflamasi (Azizah, 2011).

Dari penghitungan jumlah sel yang mengekspresikan  $CD4^+CD8^+$  (prothymosit) menunjukkan bahwa pada kontrol memiliki jumlah sel prothymosit lebih tinggi daripada yang lain. Dengan kata lain bahwa perlakuan pengasapan memberikan pengaruh terhadap penurunan populasi sel  $CD4^+CD8^+$  pada timus, tetapi pengaruhnya tidak signifikan. Kemudian untuk perlakuan pengasapan yang memiliki jumlah sel prothymosit tertinggi adalah pengasapan menggunakan rokok berfilter B dengan penurunan sebesar  $0.72 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Untuk urutan berikutnya adalah pengasapan menggunakan rokok berfilter DE dengan penurunan sebesar  $1 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Pada rokok biasa terjadi penurunan sebesar  $1.31 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Sedangkan pada pengasapan menggunakan rokok berfilter DF terjadi penurunan sebesar  $2 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Penurunan ini jumlah sel protimosit ( $CD4^+CD8^+$ ) terjadi akibat adanya paparan antigen yang menstimulus diferensiasi sel  $CD4^+CD8^+$  menjadi sel T matur ( $CD4^+$  atau  $CD8^+$ ).

Sel progenitor limfosit berasal dari sumsum tulang, beberapa diantara limfosit yang secara relatif tidak mengalami diferensiasi bermigrasi ke timus lalu memperbanyak diri, disini sel limfosit ini memperoleh sifat limfosit T. Pada awalnya thymosit tidak mengekspresikan CD4 dan CD8, sel kemudian berkembang menjadi double positif ( $CD4^+CD8^+$ ) dan akhirnya matur menjadi single positif ( $CD4^+$  atau  $CD8^+$ ) kemudian dapat masuk kembali kedalam aliran darah, kembali kedalam sumsum tulang atau ke organ limfoid perifer dan dapat hidup beberapa bulan atau tahun (Schwarz and Bandola, 2008).

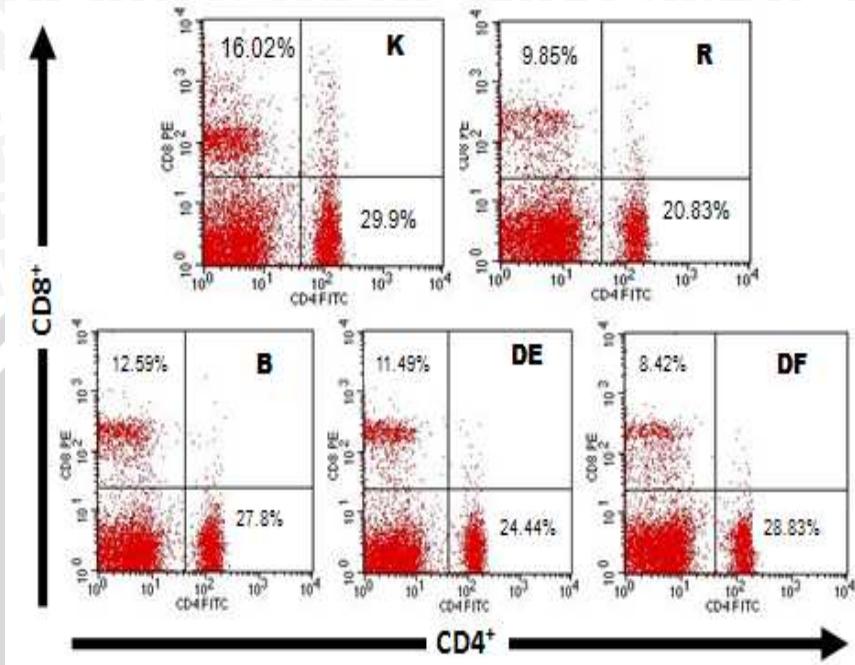
Diferensiasi limfosit dipengaruhi terutama oleh umur mencit yang berhubungan dengan aktifitas timus atau hormon yang dihasilkan oleh timus. Kelenjar timus dengan hormon-hormonnya yang spesifik merupakan pusat pengaturan reaksi pertahanan tubuh. Tanpa timus (misalnya yang dibuang atau rusak karena radiasi), limfosit T tidak bisa bekerja. Kerja timus menurun setelah masa pubertas berakhir. Penurunan aktivitas timus menjadi salah satu latar belakang berkembangnya penyakit-penyakit degeneratif, penyakit ganas, dan penyakit autoimun. Faktor-faktor penurunan kinerja timus menjadi penyebab pertahanan tubuh mulai menurun. Gangguan perkembangan timus juga diduga karena hilangnya homeostasis pada mencit tersebut. Gangguan homeostasis ini banyak disebabkan karena sel-sel teraktivasi terus terakumulasi karena kebal terhadap mekanisme apoptosis (Kina *et al.*, 2000).

#### **4.2 Profil Kuantitas Sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada Organ Limpa (Spleen)**

Limpa merupakan organ limfoid sekunder yang di dalamnya terdapat limfosit T maupun limfosit B, terutama di daerah pulpa putih. Folikel limfoid kaya dengan sel B yang berperan dalam system imun humoral. Aktivasi dan proliferasi sel T di limpa terjadi di selubung limfoid periaterioler, kemudian bermigrasi ke zona marginalis. Sebagian kecil sel T yang teraktivasi masuk ke dalam folikel limfoid, dan sebagian lainnya akan bersirkulasi ke organ perifer (Baratawidjaja, 2000).

Respon inflamasi dapat terjadi pada organ akibat paparan asap rokok. Hal ini ditandai dengan meningkatnya jumlah neutrofil, makrofag dan limfosit T yang didominasi oleh CD8<sup>+</sup>, peningkatan konsentrasi sitokin proinflamasi seperti leukotrien B<sub>4</sub>, IL-8 dan TNF- $\alpha$  dan bukti bahwa stress oksidatif disebabkan oleh inhalasi asap rokok atau sel inflamasi yang diaktifkan (Agusti,2003;Dahesia,2005).

Berikut adalah profil sel CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> pada organ limpa dari hasil penelitian.



**Gambar 4.2** Profil sel CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> : Prosentase ekspresi sel CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada organ Limpa. Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (E), Pengasapan rokok filter DF (F).

Sel T yang mengekspresikan CD4<sup>+</sup> (Sel T helper), pada organ Limpa dari hasil analisis flowcytometri (**Gambar 4.2**) menunjukkan bahwa pada kontrol mengekspresikan CD4<sup>+</sup> 29.9%, pada pengasapan rokok biasa 27.83%, pada pengasapan rokok filter B 27.8 %, pada pengasapan rokok filter DE 24.44 %, dan pada pengasapan rokok filter DF prosentase ekspresi 28.83%. Sedangkan untuk sel T yang mengekspresikan CD8<sup>+</sup> (Sel T sitotoksik) pada organ limpa menunjukkan bahwa pada kontrol mengekspresikan CD8<sup>+</sup> 16.02%, pada pengasapan rokok biasa rata-rata 9.85%, pada pengasapan rokok filter B rata-rata 12.59%, pada pengasapan rokok filter DE rata-rata 11.49%, dan dengan pengasapan rokok filter DF prosentase ekspresi 8.42%.

Uraian di atas didukung oleh hasil perhitungan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> yang di presentasikan dalam tabel di bawah ini.

**Tabel 4.2** Rerata Jumlah sel yang mengekspresikan CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada organ Limpa.

	Jumlah Sel 10 <sup>7</sup> sel/ml				
	K	R	B	DE	DF
CD4 <sup>+</sup>	1.86 ± 1.3	1.45 ± 1	1.73 ± 1.4	1.3 ± 1.5	1.83 ± 1.5
CD8 <sup>+</sup>	1.42 ± 1.2	1 ± 1.3	1.05 ± 1	1.06 ± 1.4	0.84 ± 1

$\alpha = 0.05$
-----------------

Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (E), Pengasapan rokok filter DF (F).

Berdasarkan hasil ANOVA diketahui bahwa perlakuan pengasapan memberi pengaruh terhadap penurunan populasi sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi tetapi pengaruhnya tidak signifikan ( $p > 0.05$ ). Dari penghitungan jumlah sel (**gambar 4.2 dan tabel 4.2**) menunjukkan bahwa hasil ini dapat dikelompokkan pada beberapa *cluster* yakni rokok berfilter biasa berada pada satu *cluster* dengan rokok berfilter DE. Kandungan acetosal, phenyl alanine, metionine dan manitol pada filter DE memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup> (penurunan  $0.56 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol) sedangkan pada rokok berfilter biasa penurunan sebesar  $0.41 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol. Cluster kedua yaitu rokok berfilter B, DF dan kontrol (tanpa perlakuan apapun). Kandungan phenyl alanine, triptopan dan manitol pada filter B ini memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup> penurunan sebesar  $0.13 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol. Sedangkan kandungan acetosal, phenyl alanine, EDTA dan manitol pada filter DF ini memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup> penurunan sebesar  $0.03 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol.

Sitokin IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 yang dilepas sel mast yang terpajan antigen merangsang diferensiasi dan proliferasi set T<sub>h0</sub> menjadi sel T<sub>h2</sub>

(CD4<sup>+</sup>). Nanopartikel yang dihasilkan oleh *Divine Kretek* dapat menurunkan produksi sitokin T<sub>h2</sub> (IL-4,IL-5,IL-6). Hal ini sesuai dengan penelitian Liu, Y. et.al (2009) yang menyebutkan bahwa nanopartikel yang bersifat *scavenger* dapat menurunkan produksi sitokin T<sub>h2</sub> (IL-4,IL-5,IL-6). Jika produksi sitokin T<sub>h2</sub> menurun maka diferensiasi dan proliferasi akan terhambat.

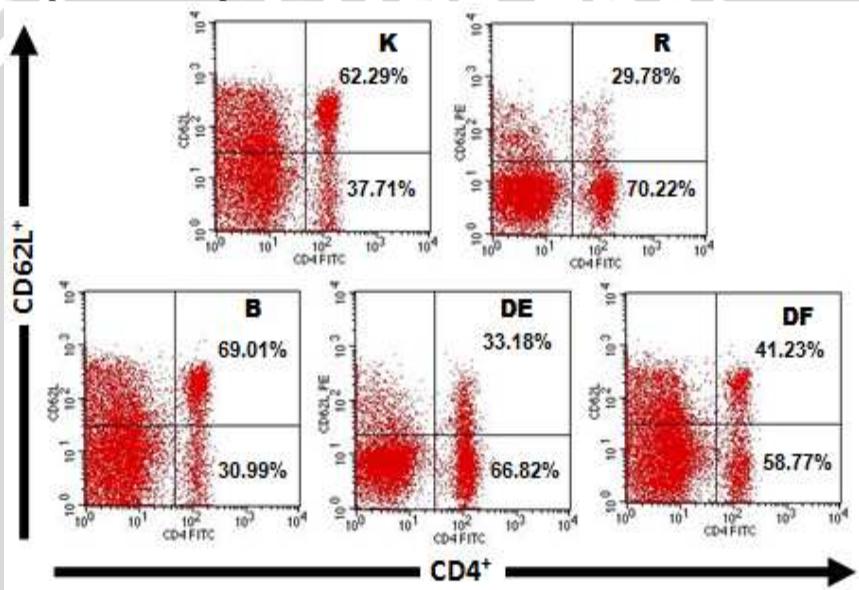
Selain itu, penurunan jumlah sel CD4<sup>+</sup> pada perlakuan pengasapan ini dimungkinkan karena terjadinya migrasi sel CD4<sup>+</sup> ke organ perifer seperti spleen dan paru. Hal ini sesuai dengan penelitian Albab (2012) yang menyebutkan bahwa perlakuan pengasapan meningkatkan jumlah sel CD4<sup>+</sup> pada paru. Dengan demikian pada paru terjadi respon terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh.

Berdasarkan hasil ANOVA diketahui bahwa perlakuan pengasapan memberi pengaruh terhadap penurunan populasi sel T CD8<sup>+</sup> tetapi pengaruhnya tidak signifikan ( $p > 0.05$ ). Dari penghitungan jumlah sel (**gambar 4.3 dan Tabel 4.3**) menunjukkan bahwa perlakuan pengasapan rokok menurunkan jumlah sel CD8<sup>+</sup>. Perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter DF menurunkan jumlah sel CD8<sup>+</sup> lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter lainnya, yakni  $0.58 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Kemudian rokok berfilter biasa berada pada urutan kedua dengan penurunan sebesar  $0.42 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Berikutnya adalah rokok berfilter B dengan penurunan sebesar  $0.37 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Terakhir adalah rokok berfilter DE dengan penurunan sebesar  $0.36 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol.

Rendahnya jumlah sel CD8<sup>+</sup> pada perlakuan pengasapan diakibatkan oleh beberapa hal, yaitu terjadinya migrasi sel CD8<sup>+</sup> ke organ perifer seperti paru. Hal ini sesuai dengan penelitian Albab (2012) yang menyebutkan bahwa perlakuan pengasapan meningkatkan jumlah sel CD8<sup>+</sup> pada paru. Dengan demikian pada paru terjadi respon terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh. Kemungkinan kedua adalah sudah tidak terdapat sitokin hasil inflamasi (Azizah, 2011).

### 4.3 Profil Kuantitas Sel T $CD4^+$ dan $CD4^+CD62L^+$ pada Organ Limpa (Spleen)

Sel T yang mengekspresikan  $CD4^+$  (Sel T helper), pada organ Limpa dari hasil analisis flowcytometri (**Gambar 4.3**) menunjukkan bahwa pada kontrol mengekspresikan  $CD4^+$  37.71%, pada pengasapan rokok biasa 70.22%, pada pengasapan rokok filter B 30.99%, pada pengasapan rokok filter DE 66.82%, dan pada pengasapan rokok filter DF prosentase ekspresi 58.77%.



**Gambar 4.3** Profil sel  $CD4^+$ ,  $CD62L^+$  dan  $CD4^+CD62L^+$  : Prosentase ekspresi sel  $CD4^+$ ,  $CD62L^+$ , dan  $CD4^+CD62L^+$  pada organ Limpa (Spleen). Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (E), Pengasapan rokok filter DF (F).

Sedangkan untuk sel T yang mengekspresikan  $CD4^+CD62L^+$  pada organ limpa menunjukkan bahwa pada kontrol mengekspresikan  $CD62L^+$  62.29%, pada pengasapan rokok biasa rata-rata 29.78%, pada pengasapan rokok filter B rata-rata 69.01%, pada pengasapan rokok

filter DE rata-rata 33.18%, dan dengan pengasapan rokok filter DF prosentase ekspresi 41.23%.

Uraian di atas didukung oleh hasil perhitungan jumlah sel T CD4<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> yang di presentasikan pada tabel dibawah ini.

**Tabel 4.3** Rerata Jumlah sel yang mengekspresikan CD4<sup>+</sup> dan CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada organ Limpa (Spleen).

	Jumlah Sel 10 <sup>7</sup> sel/ml				
	K	R	B	DE	DF
CD4 <sup>+</sup>	0.8 ±1	0.95 ±1.2	0.8 ±1.3	0.84 ±1	0.82 ±0.5
CD4+CD62L <sup>+</sup>	0.88 ±1	0.55 ±1.1	0.7 ±1	0.53 ±1	0.66 ±1

$\alpha = 0.05$
-----------------

Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (E), Pengasapan rokok filter DF (F).

Berdasarkan hasil ANOVA diketahui bahwa perlakuan pengasapan memberi pengaruh terhadap kenaikan populasi sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi tetapi pengaruhnya tidak signifikan ( $p > 0.05$ ). Dari penghitungan jumlah sel (**gambar 4.3 dan tabel 4.3**) menunjukkan bahwa hasil ini dapat dikelompokkan pada beberapa *cluster* yakni rokok berfilter biasa berada pada satu *cluster* dengan rokok berfilter DE dan DF. Kandungan acetosal, phenyl alanine, metionine dan manitol pada filter DE memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup> (kenaikan  $0.04 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol) yang hampir sama dengan rokok berfilter biasa (kenaikan  $0.15 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol). Sedangkan kandungan acetosal, phenyl alanine, EDTA dan manitol pada filter DF ini memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup> yang hampir sama dengan kontrol (kenaikan sebesar  $0.02 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol). Cluster Kedua yaitu rokok berfilter B dan kontrol (tanpa perlakuan apapun). Kandungan phenyl alanine, triptopan dan manitol pada filter B ini memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup> yang hampir sama dengan kontrol.

Berdasarkan hasil ANOVA diketahui bahwa perlakuan pengasapan memberi pengaruh terhadap penurunan populasi sel T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> tetapi pengaruhnya tidak signifikan ( $p > 0.05$ ). Dari penghitungan jumlah sel (**gambar 4.3 dan tabel 4.3**) menunjukkan bahwa hasil ini dapat dikelompokkan pada beberapa *cluster* yakni rokok berfilter B berada pada satu *cluster* dengan kontrol (tanpa perlakuan apapun). Kandungan phenyl alanine, triptopan dan manitol pada filter B ini memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> yang hampir sama dengan kontrol (penurunan  $0.18 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol). Cluster Kedua yaitu rokok berfilter biasa, DE dan DF. Kandungan acetosal, phenyl alanine, EDTA dan manitol pada filter DF ini memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> yang hampir sama dengan kontrol (penurunan sebesar  $0.12 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol). Sedangkan kandungan acetosal, phenyl alanine, metionine dan manitol pada filter DE memberikan pengaruh pada profil CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (penurunan  $0.25 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol) yang hampir sama dengan rokok berfilter biasa (penurunan  $0.23 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol).

Sel T yang teraktivasi akan kehilangan ekspresi CD62L. Sel T naive yaitu sel T yang belum pernah terpapar antigen mengekspresikan molekul CD62L, dan pada individu yang sehat umumnya lebih dari 80% sel T mengekspresikan molekul CD62L. CD62L merupakan molekul adhesi. Pada limfosit CD62L berfungsi untuk melakukan pelekatan dan rolling pada sel endotel sepanjang pembuluh darah.

Sitokin IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 yang dilepas sel mast yang terpajan antigen merangsang diferensiasi dan proliferasi set T<sub>h0</sub> menjadi sel T<sub>h2</sub> (CD4<sup>+</sup>). Nanopartikel yang dihasilkan oleh *Divine Kretek* dapat menurunkan produksi sitokin T<sub>h2</sub> (IL-4,IL-5,IL-6). Hal ini sesuai dengan penelitian Liu, Y. et al (2009) yang menyebutkan bahwa nanopartikel yang bersifat *scavenger* dapat menurunkan produksi sitokin T<sub>h2</sub> (IL-4,IL-5,IL-6). Jika produksi sitokin T<sub>h2</sub> menurun maka diferensiasi dan proliferasi akan terhambat.

Selain itu, penurunan jumlah sel CD4<sup>+</sup> pada perlakuan pengasapan ini dimungkinkan karena terjadinya migrasi sel CD4<sup>+</sup> ke organ perifer seperti spleen dan paru. Hal ini sesuai dengan penelitian Albab (2012)

yang menyebutkan bahwa perlakuan pengasapan meningkatkan jumlah sel CD4<sup>+</sup> pada paru. Dengan demikian pada paru terjadi respon terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh.

Dari penghitungan jumlah sel (**tabel 4.3**) menunjukkan bahwa perlakuan pengasapan rokok menurunkan jumlah sel CD8<sup>+</sup>. Dari hasil ANOVA diketahui bahwa perlakuan pengasapan memberi pengaruh terhadap kenaikan populasi sel T CD8<sup>+</sup> tetapi pengaruhnya tidak signifikan. Perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter DF menurunkan jumlah sel CD8<sup>+</sup> lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter lainnya, yakni  $0.58 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Kemudian rokok berfilter biasa berada pada urutan kedua dengan penurunan sebesar  $0.42 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Berikutnya adalah rokok berfilter B dengan penurunan sebesar  $0.37 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol. Terakhir adalah rokok berfilter DE dengan penurunan sebesar  $0.36 \times 10^7$  sel/ml dari kontrol.

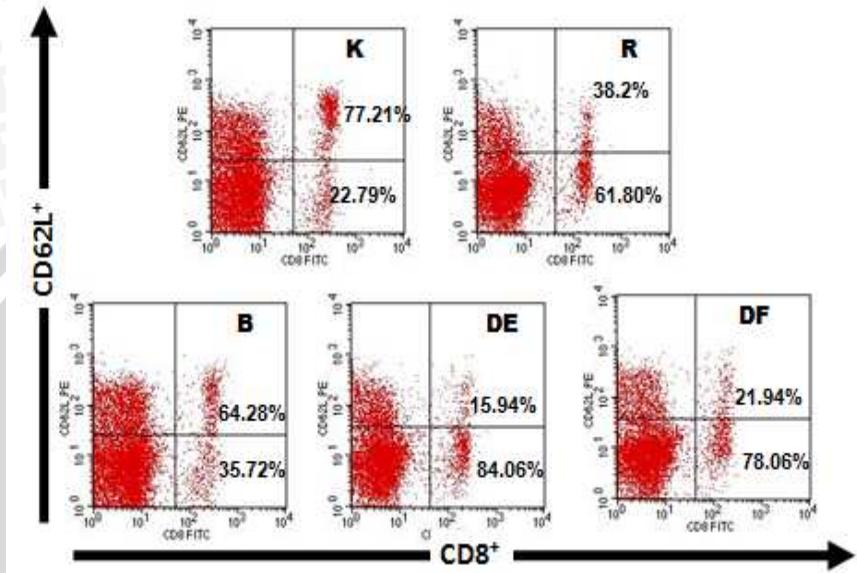
Penurunan CD4<sup>+</sup>CD62<sup>+</sup>L pada perlakuan pengasapan menggunakan *Divine Kretek* ini diduga akibat adanya paparan nanopartikel yang menginduksi produksi berbagai sitokin, seperti IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ . IFN- $\gamma$  merupakan pertanda adanya imunitas seluler. Seseorang yang terpapar antigen kadar TNFnya meningkat (Kar,2005).

Diferensiasi dari sel T naïve pada organ limfoid perifer diikuti dengan perubahan beberapa molekul adhesi. CD62L atau L-selektin adalah molekul pada permukaan pada limfosit yang berperan pada homing limfosit. CD62L ini terekspresi sangat tinggi pada sel T naïve. CD62L ini memediasi migrasi dari sel T naïve menuju paru, dimana pada daerah ini terdapat antigen dan terjadi inisiasi respon imun (Abbas,2005).

#### **4.4 Profil Kuantitas Sel T CD8<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada Organ Limpa (Spleen)**

Sel T yang mengekspresikan CD8<sup>+</sup> pada organ Limpa dari hasil analisis flowcytometri (**Gambar 4.4**) menunjukkan bahwa pada kontrol mengekspresikan CD8<sup>+</sup> lebih besar dibandingkan dengan perlakuan pengasapan, yakni 22.79%. Pada pengasapan rokok biasa 61.80%, pada pengasapan rokok filter B 35.72%, pada pengasapan rokok filter DE

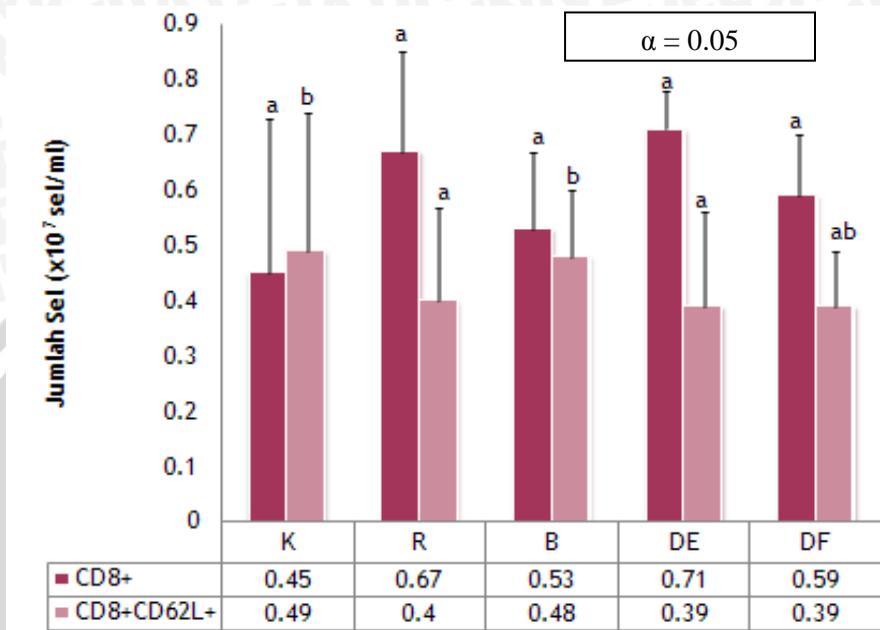
84.06%, dan pada pengasapan rokok filter DF prosentase ekspresi 78.06%.



**Gambar 4.4** Profil sel CD8<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> : Prosentase ekspresi sel CD8<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, dan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada organ Limpa (Spleen). Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (E), Pengasapan rokok filter DF (F).

Sedangkan untuk sel T yang mengekspresikan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada organ limpa menunjukkan bahwa pada kontrol mengekspresikan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> 77.21%, pada pengasapan rokok biasa rata-rata 38.2%, pada pengasapan rokok filter B rata-rata 64.28%, pada pengasapan rokok filter DE rata-rata 15.94%, dan dengan pengasapan rokok filter DF prosentase ekspresi 21.94%.

Uraian di atas didukung oleh hasil perhitungan jumlah sel T CD8<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> yang di presentasikan dalam bentuk grafik, seperti pada gambar dibawah ini.



**Gambar 4.5** Grafik Jumlah sel yang mengekspresikan CD8<sup>+</sup> dan CD62L<sup>+</sup> pada organ Limpa (Spleen). Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (E), Pengasapan rokok filter DF (F).

Berdasarkan hasil ANOVA diketahui bahwa perlakuan pengasapan memberi pengaruh terhadap kenaikan populasi sel T CD8<sup>+</sup> yang teraktivasi tetapi pengaruhnya tidak signifikan ( $p > 0.05$ ). Dari penghitungan jumlah sel (**gambar 4.4 dan gambar 4.5**) menunjukkan bahwa hasil ini dapat dikelompokkan pada beberapa *cluster* yakni rokok berfilter biasa berada pada satu *cluster* dengan rokok berfilter DE. Kandungan acetosal, phenyl alanine, metionine dan manitol pada filter DE memberikan pengaruh pada profil CD8<sup>+</sup> (kenaikan  $0.26 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol) yang hampir sama dengan rokok berfilter biasa (kenaikan  $0.22 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol). Cluster Kedua yaitu rokok berfilter B, DF dan kontrol (tanpa perlakuan apapun). Kandungan phenyl alanine, triptopan dan manitol pada filter B ini memberikan pengaruh pada profil CD8<sup>+</sup> yang hampir sama dengan kontrol (kenaikan  $0.08 \times 10^{-7}$  sel/ml dari

kontrol). Sedangkan kandungan acetosal, phenyl alanine, EDTA dan manitol pada filter DF ini memberikan pengaruh pada profil CD8<sup>+</sup> yang hampir sama dengan kontrol (kenaikan sebesar  $0.14 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol).

Berdasarkan penghitungan jumlah sel (**gambar 4.4 dan gambar 4.5**) menunjukkan bahwa hasil ini dapat dikelompokkan pada beberapa *cluster* yakni rokok berfilter B berada pada satu *cluster* dengan kontrol (tanpa perlakuan apapun). Kandungan phenyl alanine, triptopan dan manitol pada filter B ini memberikan pengaruh pada profil CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> yang hampir sama dengan kontrol (penurunan  $0.01 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol). Cluster Kedua yaitu rokok berfilter biasa dan DF. Kandungan acetosal, phenyl alanine, EDTA dan manitol pada filter DF ini memberikan pengaruh pada profil CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> yang hampir sama dengan kontrol (penurunan sebesar  $0.1 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol yang hampir sama dengan rokok berfilter biasa (penurunan  $0.09 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol). Perbedaan pada dua cluster ini sangat signifikan jika dilihat dari hasil ANOVA. Sedangkan pada rokok berfilter DF tidak berbeda nyata dengan *cluster* pertama dan kedua. Kandungan acetosal, phenyl alanine, metionine dan manitol pada filter DE memberikan pengaruh pada profil CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> (penurunan  $0.1 \times 10^{-7}$  sel/ml dari kontrol).

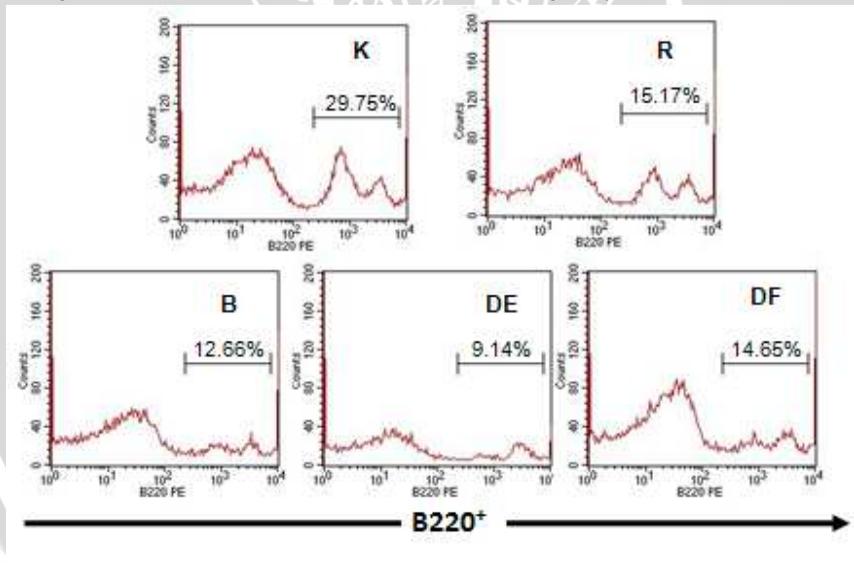
Penurunan CD4<sup>+</sup>CD62<sup>+</sup>L pada perlakuan pengasapan menggunakan *Divine Kretek* ini diduga akibat adanya paparan nanopartikel yang menginduksi produksi berbagai sitokin, seperti IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ . IFN- $\gamma$  merupakan pertanda adanya imunitas seluler. Seseorang yang terpapar antigen kadar TNFnya meningkat (Kar,2005).

Diferensiasi dari sel T naïve pada organ limfoit perifer diikuti dengan perubahan beberapa molekul adhesi. CD-62L atau L-selektin adalah molekul pada permukaan pada limfosit yang berperan pada homing limfosit. CD62L ini tereksresi sangat tinggi pada sel T naïve. CD62L ini memediasi migrasi dari sel T naïve menuju paru, dimana pada daerah ini terdapat antigen dan terjadi inisiasi respon imun (Abbas,2005).

#### 4.5 Profil Kuantitas Sel B ( $B220^+$ ) pada Organ Sumsum Tulang (*Bone marrow*)

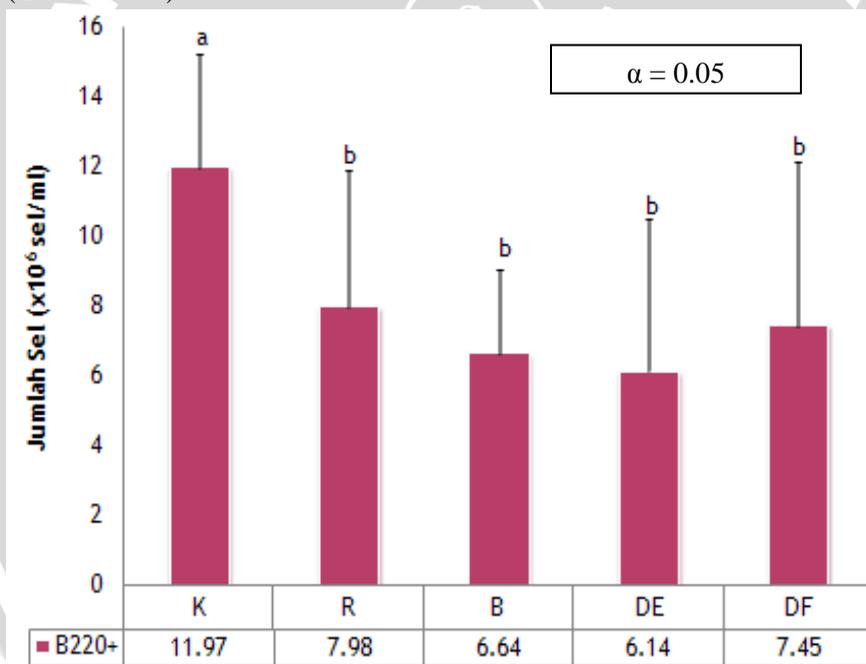
Sumsum tulang yang merupakan organ limfoid primer. Sumsum tulang merupakan tempat berlangsungnya proses hematopoiesis, yaitu lymphopoeisis untuk pematangan, diferensiasi dan proliferasi sel T dan sel B sehingga menjadi limfosit yang mengenal antigen. Selain itu sumsum tulang merupakan tempat terbentuknya sel darah merah (erythropoiesis).

Sel-sel yang terlibat dalam sistem imun tubuh terdiri atas sel yang mampu memproduksi antibodi. Sel B limfosit adalah jenis sel yang memproduksi antibodi yang berupa senyawa protein. Hal ini menjadi bagian penting imunitas humoral. Sel B yang memproduksi antibodi tersebut mencegah terjadinya infeksi dalam tubuh dengan mengeliminasi mikroba ekstraseluler atau antigennya (Abbas,2005)



**Gambar 4.6** Histogram Profil sel  $B220^+$  pada organ Sumsum tulang (*Bone Marrow*). Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (DE), Pengasapan rokok filter DF (DF).

Berdasarkan histogram di atas (**Gambar 4.6**) dapat dilihat bahwa pada kontrol mengekspresikan B220<sup>+</sup> 29.75%, pada pengasapan rokok biasa 15.17%, pada pengasapan rokok filter B 12.66%, pada pengasapan rokok filter DE 9.14%, dan pada pengasapan rokok filter DF prosentase ekspresi 14.65%. Kontrol (tanpa perlakuan pengasapan apapun) memiliki jumlah sel B220<sup>+</sup> yang lebih tinggi dibanding dengan perlakuan pengasapan. Perlakuan pengasapan dengan rokok berfilter biasa memiliki prosentase jumlah sel B220<sup>+</sup> paling tinggi dibanding perlakuan pengasapan lainnya. Berikutnya adalah perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter DF, B, dan yang terakhir adalah rokok berfilter DE. Uraian lebih jelasnya dapat dilihat pada grafik dibawah ini (**Gambar 4.7**).



**Gambar 4.7** Grafik Jumlah sel yang mengekspresikan B220<sup>+</sup> pada organ Sumsum tulang (*Bone Marrow*). Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (E), Pengasapan rokok filter DF (F).

Dari penghitungan jumlah sel (**gambar 4.7**) menunjukkan bahwa Kontrol (tanpa perlakuan pengasapan apapun) memiliki jumlah sel B yang paling tinggi di dibandingkan dengan perlakuan pengasapan. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa perlakuan pengasapan menurunkan jumlah sel B pada sumsum tulang. Dari hasil ANOVA diketahui bahwa perlakuan pengasapan memberi pengaruh yang signifikan terhadap penurunan populasi sel B ( $B220^+$ ) ( $p < 0.05$ ). Penurunan sel B yang terjadi pada perlakuan pengasapan tidak berbeda nyata pada masing-masing perlakuan. Perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter biasa mengalami penurunan sebesar  $3.99 \times 10^6$  sel/ml dari kontrol. Penurunan berikutnya terjadi pada pengasapan menggunakan filter DF dengan penurunan sebesar  $4.52 \times 10^6$  sel/ml dari kontrol. Berikutnya adalah perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter B yang menurunkan jumlah sel  $B220^+$  pada sumsum tulang sebesar  $5.33 \times 10^6$  sel dari kontrol. Jumlah sel  $B220^+$  terendah ada pada perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter DE yakni penurunan jumlah sel  $B220^+$  sebesar  $5.83 \times 10^7$  sel dari kontrol. Penurunan jumlah sel  $B220^+$  pada perlakuan pengasapan ini diduga akibat terjadinya migrasi sel B dari sumsum tulang menuju jaringan yang mengalami inflamasi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini yang melihat profil kuantitas sel B pada organ Limpa.

Selain itu, pada perlakuan pengasapan menggunakan *Divine Kretek* memiliki jumlah sel  $B220^+$  yang lebih rendah dibanding dengan pengasapan menggunakan rokok berfilter biasa. Nanopartikel yang dihasilkan oleh *Divine Kretek* dapat menurunkan produksi sitokin Th2 (IL-4, IL-5, IL-6). Hal ini sesuai dengan penelitian Liu, Y. et.al (2009) yang menyebutkan bahwa nanopartikel yang bersifat *scavenger* dapat menurunkan produksi sitokin Th2 (IL-4, IL-5, IL-6).

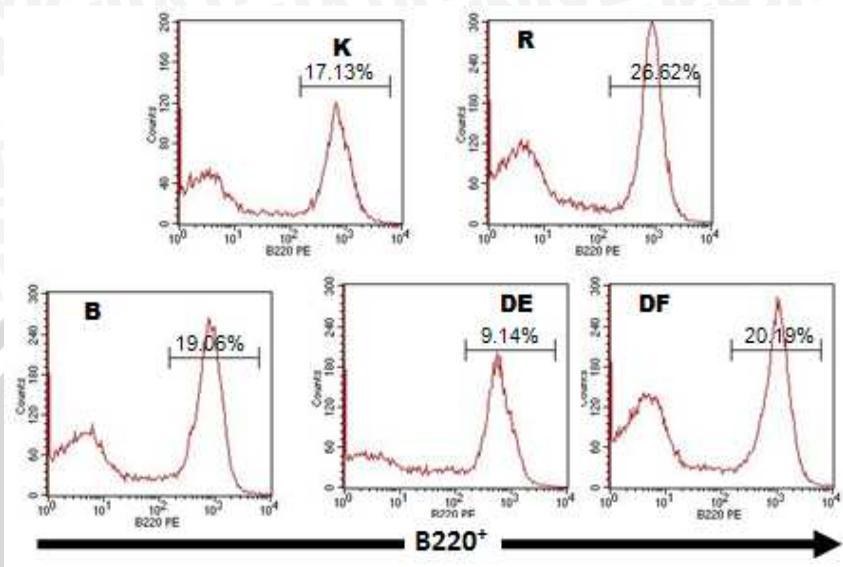
Proliferasi sel B dan diferensiasi menjadi sel plasma menjadi antibodi dipengaruhi oleh peningkatan sitokin yang berasal dari sel T seperti, IL-4, IL-5, IL-6 dan IFN- $\gamma$ . Interaksi fisik antara sel B dan sel T memberikan sinyal melalui koreseptor CD-40-CD40L yang berpengaruh IL-4 berperan penting dalam imunoregulasi dan pengalihan kelas Ig. Sel B naif mempresentasikan IgM dan Ig D pada permukaannya dan atas

pengaruh rangsangan., sel B mengalihkan kelas Ig dan memproduksi IgG, IgA, atau IgE. Ikatan antigen yang mengawali sinyal dari BCR meningkatkan ekspresi sejumlah molekul membrane sel seperti MHC-II dan ligan kostimulator B. Peningkatan kedua protein membrane tersebut meningkatkan kemampuan sel B berfungsi sebagai APC dalam aktivasi sel Th. Sel B yang teraktivasi mulai mengekspresikan reseptor berbagai sitokin yang memacu proliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma dan sel memori, pengalihan kelas dan pematangan afinitas. Progenitor sel B pada sumsum tulang berkembang menjadi sel B matur yang mengekspresikan IgM dan IgD pada permukaan membrannya. Kemudian meninggalkan *bone marrow* menuju organ limfoid perifer dan mengenali antigen yang ada pada organ tersebut dan melengkapi kematangannya ( Baratawidjaja, 2006).

#### **4.6 Profil Kuantitas Sel B (B220<sup>+</sup>) pada Organ Limpa (Spleen)**

Sel B merupakan komponen penting pada respon imun humoral. diproduksi di dalam bone marrow, kemudian bermigrasi ke spleen dan berdeferensiasi menjadi sel B matur. Bagian dari sistem imun adaptif sel B memberikan respon untuk antibodi umum ke antigen spesifik, sementara mereka berikatan melalui BCR (B Cell Reseptor) (Campbell, 2004).

Antigen B220 adalah marker permukaan dalam populasi limfosit yang berbeda. Sel marker ini termasuk kelompok glikoprotein T200 (Coffman & Weissman, 1988 la). Sementara T200 didapatkan secara dominan pada sel T dengan berat molekul antara 170000 dan 180 000, marker B220 diekspresikan sebagian besar oleh Sel B dengan berat molekul 220 000 (Coffman & Weissman, 1981a; Kincade et al., 1981; Scheid et al., 1982).



**Gambar 4.8** Histogram Profil sel B220<sup>+</sup> pada organ Limpa (Spleen).  
 Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (DE), Pengasapan rokok filter DF (DF).

Berdasarkan histogram di atas (**Gambar 4.8**) dapat dilihat bahwa pada kontrol mengekspresikan B220<sup>+</sup> 17.13%, pada pengasapan rokok biasa 26.62%, pada pengasapan rokok filter B 19.06%, pada pengasapan rokok filter DE 9.14%, dan pada pengasapan rokok filter DF prosentase ekspresi 20.19%. Pengasapan menggunakan rokok berfilter biasa memiliki jumlah sel B220<sup>+</sup> paling tinggi dibandingkan dengan kelompok yang lain. Berikutnya adalah jumlah sel pada pengasapan menggunakan rokok berfilter DF dan B. Urutan berikutnya adalah jumlah sel B220<sup>+</sup> pada kontrol dan yang terakhir adalah jumlah sel B220<sup>+</sup> pada perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter DE. Uraian lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

**Tabel 4.4** Rerata Jumlah sel yang mengekspresikan B220<sup>+</sup> pada organ Limpa (Spleen).

	Jumlah Sel 10 <sup>7</sup> sel/ml				
	K	R	B	DE	DF
B220 <sup>+</sup>	8.10 $\pm$ 4.3	8.20 $\pm$ 2.1	8.15 $\pm$ 4.1	6.86 $\pm$ 5	8.15 $\pm$ 4.6
$\alpha = 0.05$					

Keterangan: Kontrol (K), Pengasapan rokok biasa (R), Pengasapan rokok filter B (B), Pengasapan rokok filter DE (E), Pengasapan rokok filter DF (F).

Dari penghitungan jumlah sel (**gambar 4.10**) menunjukkan bahwa perlakuan pengasapan menggunakan rokok berfilter biasa meningkatkan jumlah sel B220<sup>+</sup> sebesar 0.1x10<sup>6</sup> sel/ml dari kontrol. Paparan asap rokok dapat memacu terjadinya inflamasi. Inflamasi yang terjadi akan memodulasi sel-sel imun seperti sel B dan sel T. Berikutnya adalah pengasapan menggunakan rokok berfilter DF dan B dengan peningkatan sebesar 0.05x10<sup>6</sup> sel/ml dari kontrol. Hal yang berbeda ditunjukkan oleh pengasapan menggunakan rokok berfilter DE yang justru menurunkan jumlah sel B220<sup>+</sup> sebesar 1.24x10<sup>6</sup> sel/ml dari kontrol.

Perlakuan pengasapan menggunakan *Divine Kretek* memiliki jumlah sel B220<sup>+</sup> yang lebih rendah dibanding dengan pengasapan menggunakan rokok berfilter biasa. Nanopartikel yang dihasilkan oleh *Divine Kretek* dapat menurunkan produksi sitokin Th2 (IL-4, IL-5, IL-6). Hal ini sesuai dengan penelitian Liu, Y. et al (2009) yang menyebutkan bahwa nanopartikel yang bersifat *scavenger* dapat menurunkan produksi sitokin Th2 (IL-4, IL-5, IL-6).

Proliferasi sel B dan diferensiasi menjadi sel plasma menjadi antibodi dipengaruhi oleh peningkatan sitokin yang berasal dari sel T seperti, IL-4, IL-5, IL-6 dan IFN- $\gamma$ . Interaksi fisik antara sel B dan sel T memberikan sinyal melalui koreseptor CD-40-CD40L yang berpengaruh IL-4 berperan penting dalam imunoregulasi dan pengalihan kelas Ig. Sel B naif mempresentasikan IgM dan Ig D pada permukaannya dan atas

pengaruh rangsangan., sel B mengalihkan kelas Ig dan memproduksi IgG, IgA, atau IgE. Ikatan antigen yang mengawali sinyal dari BCR meningkatkan ekspresi sejumlah molekul membrane sel seperti MHC-II dan ligan kostimulator B. Peningkatan kedua protein membran tersebut meningkatkan kemampuan sel B berfungsi sebagai APC dalam aktivasi sel Th. Sel B yang teraktivasi mulai mengekspresikan reseptor berbagai sitokin yang memacu proliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma dan sel memori, pengalihan kelas dan pematangan afinitas. Progenitor sel B pada sumsum tulang berkembang menjadi sel B matur yang mengekspresikan IgM dan IgD pada permukaan membrannya. Kemudian meninggalkan *bone marrow* menuju organ limfoid perifer dan mengenali antigen yang ada pada organ tersebut dan melengkapi kematangannya (Baratawidjaja, 2006).



## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Perlakuan pengasapan menggunakan *Divine Kretek* dapat menurunkan sel T CD4<sup>+</sup> dan sel T CD8<sup>+</sup> pada spleen dan timus dan sel B pada Sumsum tulang dibandingkan dengan keadaan normal.
2. Perlakuan pengasapan menggunakan *Divine Kretek* dapat meningkatkan jumlah sel B pada spleen dibandingkan dengan keadaan normal.
3. Profil Limfosit pada perlakuan paparan asap rokok kretek menggunakan *Divine Filter* dapat dikelompokkan, bahwa filter B dan DF memiliki profil limfosit yang hampir mirip dengan kontrol (tanpa perlakuan apapun). Sedangkan rokok berfilter DE memiliki profil limfosit yang hampir sama dengan rokok berfilter biasa.

#### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh maka perlu adanya penambahan jangka waktu paparan asap untuk mendapatkan hasil yang signifikan. Penelitian selanjutnya sebaiknya mengukur kecepatan migrasi yang terjadi pada sel-sel limfosit pada organ pusat ke perifer. Sebaiknya perlu dilihat profil sel T pada bone marrow untuk mendapatkan gambaran yang pasti mengenai profil sel T pada organ pusat dan perifer. Penelitian selanjutnya seharusnya melihat pengaruh pengasapan secara langsung.

## DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. 1994. Molecular Biology of the Cell, 3rd ed. Garland Publish., Inc. New York
- Azizah, F.N. 2011. Potensi Fraksi Air Daun Tapak Liman (*Elephantopus scaber L.*) Terhadap Hematopoiesis pada Mencit (*Mus musculus*) Jantan galur BALB/c. Model Anemia. Disertasi Universitas Brawijaya. Malang
- Baratawidjaja, KG. 2000. Imunologi Dasar, Edisi ke empat Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta
- Divine Cigarette.2010. Basic Invention of Divine Filter Cigarette.<http://divinecigarette.com/web/?p=577>. Tanggal Akes 15 Juli 2011
- Fitzpatrick, TM & Blair, EA,. 2000. Smoking and pulmonary and Cardiovascular Disease: Upper Airway Complications of Smoking, Clinics in Chest Medicine 21(1):147-157
- Hyde, Richard, M. 2000. IMMUNOLOGY 4th EDITION. Lippincott William dan Wilkins. Philadelphia
- Lee,K, MI. 2007. 3-week inhalation exposure to cigarette smoke and/or lipopolysaccharide in AKR/J mice. Inhal Toxicol. 2007 Jan;19(1):23-35
- Lidia Morawska, Milan Jamriska, and Neville D. Bofingerb. 1997. Size characteristics and ageing of the environmental tobacco smoke. The Science of the Total Environment 196 (1997) 43—55
- Marianti, A. 2009. Aktivitas Antioksidan Jus Tomat pada Pencegahan Kerusakan Jaringan Paru-Paru Mencit yang Dipapar Asap Rokok. BIOSAINTEFIKA Vol. I (1) :1 -10

- Murphy, R.F. 2006. Basic flow cytometry theory. Flow cytometry talks. Purdue University Cytometry Laboratories. Accessible at <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.htm>. Diakses tanggal 16 November 2011.
- Ning Z., C.S. Cheung, J. Fu, M.A. Liu, M.A. Schnell. 2006. Experimental study of environmental tobacco smoke particles under actual indoor environment. *Science of the Total Environment* 367 (2006) 822–830
- Ochatt, S.J. 2006. Flow cytometry (ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus). *Medicago truncatula handbook*. Perancis
- Primatesta, P. 2001. Association between smoking and blood pressure. *Hypertension* 37:187-193
- Robinson JP. 2006 Introduction to flow cytometry. Flow cytometry talks. Purdue University Cytometry Laboratories. Accessible at <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.htm>
- Smith. 2004. Attenuation of tobacco smoke-induced lung inflammation by treatment with a soluble epoxide hydrolase inhibitor. *PNAS*. 102 (6) : 2186–2191
- Sumitro, B.S. 2009. Divine Cigarette. <http://www.smartbio.com>. Diakses tanggal 7 Juni 2011
- Tsuji, T., Aoshiba, K. and Nagai, A. 2006. Alveolar Cell Senescence in Patients with Pulmonary Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 174: 886–893
- Wan, Wing-Yan Heidi, Abigail Morris, Gillian Kinnear, William Pearce, Joanie Mok, Daniel Wyss, Christopher S Stevenson. 2010. Pharmacological characterisation of anti-inflammatory compounds in acute and chronic mouse models of cigarette smoke-induced inflammation. *Respiratory Research* 2010, 11:126

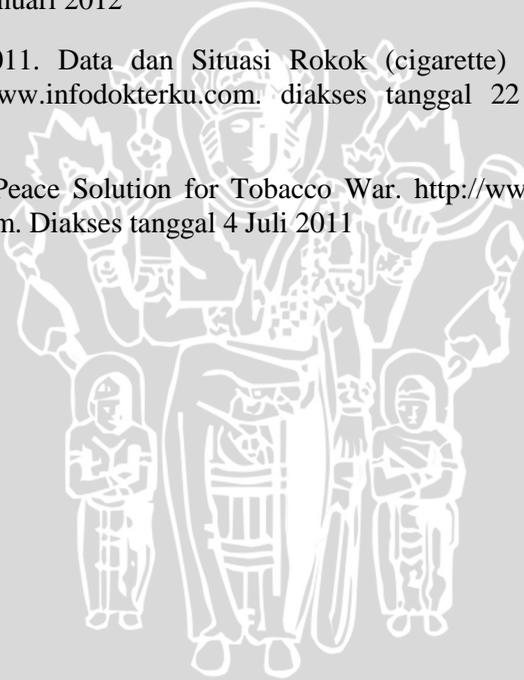
Watson, J.V. 2004. Introduction to Flow Cytometry, First Paperback Edition. Cambridge University Press

Wayne R. Ott, and Hans C. Siegmann. 2005. Using multiple continuous fine particle monitors to characterize tobacco, incense, candle, cooking, wood burning, and vehicular sources in indoor, outdoor, and in-transit settings. Atmospheric Environment 40 (2006) 821–84

WHO *Global Youth Tobacco Survey*. 2000. [http://www.who.int/fctc/signatories\\_parties/en/index.html](http://www.who.int/fctc/signatories_parties/en/index.html) , Parties to the WHO Framework Convention on Tobacco Control, diakses tanggal 2 Januari 2012

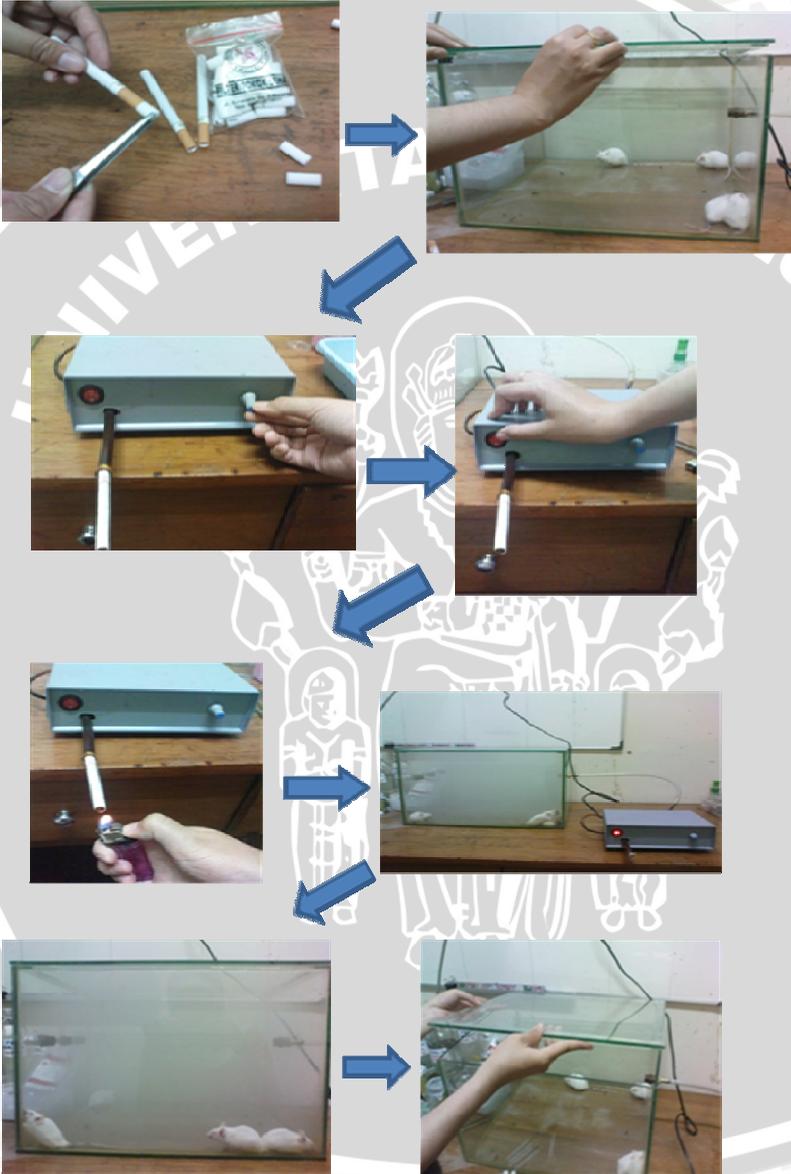
Wijaya, A.M. 2011. Data dan Situasi Rokok (cigarette) Indonesia Terbaru. [www.infodokterku.com](http://www.infodokterku.com). diakses tanggal 22 Februari 2012

Zahar, G. 2007. Peace Solution for Tobacco War. <http://www.divine-cigarette.com>. Diakses tanggal 4 Juli 2011



## LAMPIRAN

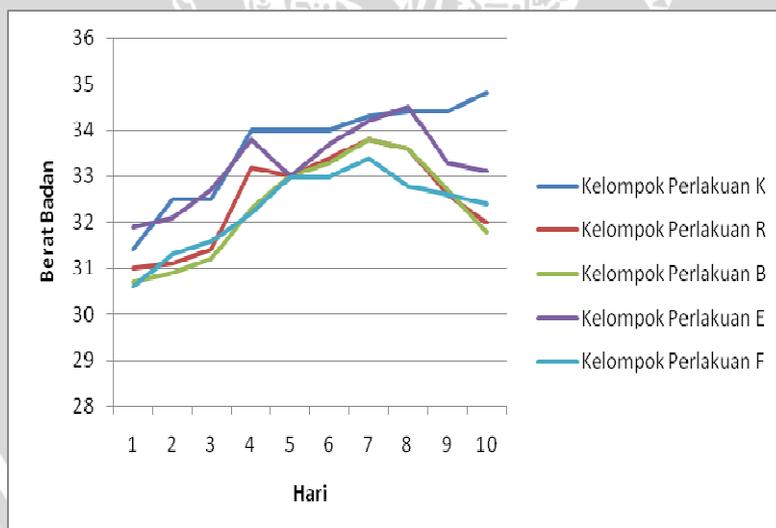
### Lampiran 1. Dokumentasi Perlakuan Pengasapan



## Lampiran 2. Data Berat Badan Mencit

Tabel L2.1 Rerata berat badan mencit (Gram)

	Hari	Kelompok Perlakuan				
		K	R	B	E	F
AKLIMASI	1	31.4	31	30.7	31.9	30.6
	2	32.5	31.1	30.9	32.1	31.3
	3	32.5	31.4	31.2	32.7	31.6
	4	34	33.2	32.3	33.8	32.2
	5	34	33	33	33	33
	6	34	33.4	33.3	33.7	33
	7	34.3	33.8	33.8	34.2	33.4
PERLAKUAN	8	34.4	33.6	33.6	34.5	32.8
	9	34.4	32.6	32.7	33.3	32.6
	10	34.8	32	31.8	33.1	32.4



## Lampiran 3. Data Hasil *One-way* ANOVA Jumlah Sel Tereksresi pada Organ Timus, Limpa dan Sumsum Tulang pada Mencit BALB/c

Lampiran 3.1 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, dan CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> pada Timus

Tabel L3.1.1 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD4<sup>+</sup> pada Timus

**Uji Normalitas**

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		CD4
N		30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	32495988.33
	Std. Deviation	2.901E7
Most Extreme Differences	Absolute	.246
	Positive	.246
	Negative	-.183
Kolmogorov-Smirnov Z		1.347
Asymp. Sig. (2-tailed)		.053

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.



## Uji Homogenitas

### Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel CD4+

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.204	4	25	.098

## Uji ANOVA One-Way

### ANOVA

Jumlah sel CD4+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.205E15	4	5.513E14	.621	.652
Within Groups	2.220E16	25	8.881E14		
Total	2.441E16	29			

Tabel L3.1.2 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD8<sup>+</sup> pada Timus

## Uji Normalitas

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD4
N		30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	32495988.33
	Std. Deviation	2.901E7
Most Extreme Differences	Absolute	.246
	Positive	.246

	Negative	-183
Kolmogorov-Smirnov Z		1.347
Asymp. Sig. (2-tailed)		.053

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.

### Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel CD8+

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.187	4	25	.943

### Uji ANOVA One-Way

#### ANOVA

Jumlah sel CD8+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.483E13	4	8.707E12	.164	.954
Within Groups	1.324E15	25	5.297E13		
Total	1.359E15	29			

Tabel L3.1.3 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> pada Timus

### Uji Normalitas

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah sel CD4+CD8+
N		30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	38938105.00
	Std. Deviation	3.158E7
Most Extreme Differences	Absolute	.151
	Positive	.151
	Negative	-.128
Kolmogorov-Smirnov Z		.829
Asymp. Sig. (2-tailed)		.497

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel CD4+CD8+

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.867	4	25	.044

## Uji ANOVA One-Way

### ANOVA

Jumlah sel CD4+CD8+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.296E15	4	3.240E14	.293	.880
Within Groups	2.762E16	25	1.105E15		
Total	2.892E16	29			

Lampiran 3.2 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD4<sup>+</sup> dan CD8<sup>+</sup> pada Limpa

Tabel L3.2.1 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD4<sup>+</sup> pada Limpa

## Uji Normalitas

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah sel CD4+
N		30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	76719141.67
	Std. Deviation	5.184E7
Most Extreme Differences	Absolute	.178
	Positive	.178
	Negative	-.123
Kolmogorov-Smirnov Z		.973
Asymp. Sig. (2-tailed)		.300

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.

### Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel CD4+

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.831	4	25	.154

### Uji ANOVA One-Way

#### ANOVA

Jumlah sel CD4+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.478E15	4	1.120E15	.381	.820
Within Groups	7.345E16	25	2.938E15		
Total	7.793E16	29			

Tabel L3.2.2 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD8<sup>+</sup> pada Timus

### Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Jumlah sel CD8+
N		30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	47144403.33
	Std. Deviation	3.121E7
Most Extreme Differences	Absolute	.174
	Positive	.174
	Negative	-.096
Kolmogorov-Smirnov Z		.953
Asymp. Sig. (2-tailed)		.324

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances			
Jumlah sel CD8+			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.741	4	25	.051

## Uji ANOVA One-Way

### ANOVA

Jumlah sel CD8+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.459E15	4	3.647E14	.340	.848
Within Groups	2.680E16	25	1.072E15		
Total	2.826E16	29			

Lampiran 3.3 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD4<sup>+</sup>, dan CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada Timus

Tabel L3.3.1 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD4<sup>+</sup> pada Limpa

### Uji Normalitas

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah sel CD4+
N		30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	43229928.33
	Std. Deviation	3.225E7
Most Extreme Differences	Absolute	.197
	Positive	.196
	Negative	-.197

Kolmogorov-Smirnov Z	1.079
Asymp. Sig. (2-tailed)	.195

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel CD4+

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.691	4	25	.054

### Uji ANOVA One-Way

#### ANOVA

Jumlah sel CD4+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.881E15	4	4.703E14	.416	.796
Within Groups	2.828E16	25	1.131E15		
Total	3.016E16	29			

Tabel L3.3.2 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada Timus

### Uji Normalitas

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah sel CD4+CD62L+
N		30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	30674500.00
	Std. Deviation	2.540E7
Most Extreme Differences	Absolute	.149
	Positive	.149
	Negative	-.133
Kolmogorov-Smirnov Z		.816
Asymp. Sig. (2-tailed)		.519

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

### Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel CD4+CD62L+

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.150	4	25	.104

## Uji ANOVA One-Way

### ANOVA

Jumlah sel CD4+CD62L+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.236E15	4	3.089E14	.442	.777
Within Groups	1.748E16	25	6.990E14		
Total	1.871E16	29			

Lampiran 3.4 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD8<sup>+</sup>, dan CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada Timus

Tabel L3.4.1 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD8<sup>+</sup> pada Limpa

### Uji Normalitas

#### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah sel CD8+
N		30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	13469693.33
	Std. Deviation	7682212.339
Most Extreme Differences	Absolute	.178
	Positive	.178
	Negative	-.115

Kolmogorov-Smirnov Z	.972
Asymp. Sig. (2-tailed)	.301

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.

### Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel CD8+

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.021	4	25	.122

### Uji ANOVA One-Way

#### ANOVA

Jumlah sel CD8+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.657E13	4	1.414E13	.214	.928
Within Groups	1.655E15	25	6.620E13		
Total	1.711E15	29			

Tabel L3.4.2 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> pada Timus

## Uji Normalitas

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah sel CD8+CD62L+
N		30
Normal Parameters <sup>a, b</sup>	Mean	16186661.67
	Std. Deviation	1.238E7
Most Extreme Differences	Absolute	.125
	Positive	.125
	Negative	-.115
Kolmogorov-Smirnov Z		.683
Asymp. Sig. (2-tailed)		.740

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## Uji Homogenitas

### Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel CD8+CD62L+

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.048	4	25	.403

## Uji ANOVA One-Way

### ANOVA

Jumlah sel CD8+CD62L+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.303E14	4	3.257E13	.189	.042
Within Groups	4.311E15	25	1.724E14		
Total	4.441E15	29			

Lampiran 3.5 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel B220<sup>+</sup> pada *Bone Marrow*

## Uji Normalitas

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah sel B220+
N		30
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	15543105.00
	Std. Deviation	1.094E7
Most Extreme Differences	Absolute	.224
	Positive	.224
	Negative	-.123
Kolmogorov-Smirnov Z		1.226

Asymp. Sig. (2-tailed)

.099

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.

### Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel B220+

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.965	4	25	.444

### Uji ANOVA One-Way

#### ANOVA

Jumlah sel B220+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.977E14	4	4.942E13	.378	.022
Within Groups	3.273E15	25	1.309E14		
Total	3.470E15	29			

Tabel L3.6 Analisis Statistik Antara Perlakuan terhadap Jumlah Ekspresi Sel B220<sup>+</sup> pada Limpa.

## Uji Normalitas

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah sel B220+
N		30
Normal Parameters <sup>a, b</sup>	Mean	2433265.00
	Std. Deviation	1985957.375
Most Extreme Differences	Absolute	.265
	Positive	.265
	Negative	-.171
Kolmogorov-Smirnov Z		1.450
Asymp. Sig. (2-tailed)		.030

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

## Uji Homogenitas

### Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel B220+

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.747	4	25	.569

## Uji ANOVA One-Way

### ANOVA

Jumlah sel B220+

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.136E12	4	1.034E12	.234	.916
Within Groups	1.102E14	25	4.410E12		
Total	1.144E14	29			

