

PENGARUH PEMBERIAN SARI BATANG NANAS (*ANANAS COMOSUS*) TERHADAP JUMLAH LIMFOSIT TIKUS WISTAR YANG DIBERI PAPARAN ASAP ROKOK.

Ruth Elizabeth Violita, Enny Probosari^{*)}

Program Studi Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
Jl.Dr.Sutomo No.18, Semarang, Telp (024) 8453708, Email : gizifk@undip.ac.id

ABSTRACT

Background: Cigarette smoke exposure on human can stimulate inflammation that signed by the increase of lymphocytes count in blood. Bromelain is one of proteolytic enzymes that has an effective function as anti-inflammatory and mainly found in pineapple stem. Therefore, the objective of this study is to determine the effect of pineapple stem juice on lymphocytes count that exposed to cigarette smoke.

Method: Sixteen male Wistar rats (6 weeks old, 150-200 g) used as the samples. Samples are divided into 3 groups: control group, intervention group 1, and intervention group 2. All of the groups are exposed to cigarette smoke. Two non-filtered cigarettes burned for 30 minutes/day. The intervention groups are given pineapple stem juice in dosage 20mg/kg weight of bromelain and 40 mg/kg weight of bromelain. These treatments are done for 30 days. Blood sample will be obtained for analyzing the lymphocytes count on the 31st day. Normality test done by Saphiro-Wilk method, and parametric statistic analysis done by One Way Anova method.

Result: Pineapple stem juice has an effect to lymphocytes count that exposed to cigarette smoke ($p=0.005$). There is no significant difference between the control group and the intervention group 1 and 2 ($p=0.81$; $p=0.63$), and there is no significant difference between the intervention group 1 and the intervention group 2 ($p=0.864$).

Conclusion: Pineapple stem juice has an effect to lymphocytes count that exposed to cigarette smoke, but there is no significant difference among all of the groups.

Key words: Bromelain, pineapple stem, lymphocyte, inflammation, cigarette smoke

ABSTRAK

Latar Belakang : Paparan asap rokok pada manusia memicu respon inflamasi yang ditandai dengan kenaikan jumlah limfosit dalam darah. Bromelain, salah satu enzim proteolitik, memiliki fungsi efektif dalam aktivitas anti inflamasi dan banyak ditemukan di batang nanas. Pada saat terjadi inflamasi, bromelain akan menurunkan jumlah limfosit yang berperan sebagai pro-inflamator. Untuk itu, penelitian ini bertujuan melihat pengaruh pemberian sari batang nanas terhadap jumlah limfosit setelah diberi paparan asap rokok.

Metode : Sampel penelitian berjumlah 16 ekor dan merupakan tikus wistar jantan. Sampel dibagi ke dalam 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, dan perlakuan 2. Ketiga kelompok diberikan paparan asap dari 2 batang rokok kretek non filter selama 30 menit/hari. Kelompok perlakuan 1 dan 2 dilanjutkan dengan pemberian sari batang nanas dengan kandungan 20 mg/kgBB bromelain dan 40 mg/kgBB bromelain. Penelitian ini dilakukan selama 30 hari dan di hari ke-31 dilakukan pengambilan darah sampel untuk mengetahui jumlah limfosit. Uji normalitas menggunakan Saphiro-Wilk dan analisis statistik menggunakan uji Oneway Anova.

Hasil : Pemberian sari batang nanas memiliki pengaruh terhadap jumlah limfosit darah ($p=0.005$). Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 dan 2 ($p=0.81$; $p=0.63$), dan juga tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan 1 dengan perlakuan 2 ($p=0.864$).

Kesimpulan : Pemberian sari batang nanas mempengaruhi jumlah limfosit setelah dipaparkan asap rokok, namun tidak terdapat perbedaan nilai yang signifikan pemberian sari batang nanas antara masing-masing kelompok.

Kata Kunci : Bromelain, batang nanas, limfosit, inflamasi, dan asap rokok

PENDAHULUAN

Asap rokok tersusun atas berbagai komponen, yaitu nikotin, tar, ammonia, karbon monoksida, karbondioksida, formaldehid, akrolein, aseton, *benzopyrene*, hidroksiquinon, nitrogen oksida, dan cadmium. Sebagian dari komponen tersebut diketahui dapat menjadi karsinogenik dan racun bagi sel-sel tubuh. Asap rokok yang terhirup menyebabkan aktivasi sel-sel inflamasi dalam tubuh, khususnya pada saluran pernapasan dan di organ paru-paru; dimana aktivasi ini menyebabkan pelepasan sitokin pro-inflamasi, faktor kemotaksis,

dan oksigen radikal yang dapat mengubah fungsi dari sel imun. Pengaruh zat dalam rokok terhadap risiko penyakit kanker, seperti tar dan nikotin bertindak sebagai immunosupresor, dengan menyerang respon imun bawaan pada sel dan meningkatkan kerentanan sel terhadap infeksi.¹

WHO menyatakan bahwa pada tahun 2011, kejadian paparan terhadap asap rokok di Indonesia pada orang dewasa yang terjadi di tempat kerja yaitu 51.3%, dengan paparan pada laki-laki 58% dan pada perempuan 41.4%. Selain itu, kejadian paparan terhadap asap rokok yang terjadi di dalam rumah

^{*)}Penulis Penanggungjawab

setiap bulan sebanyak 81.4%, dan paparan terhadap asap rokok yang terjadi di tempat umum dan restoran sebanyak 85.4%.²

Paparan terhadap asap rokok yang terjadi pada sel-sel tubuh akan menyebabkan respon inflamasi. Respon inflamasi merupakan respon protektif yang timbul akibat adanya paparan mikroorganisme, trauma mekanis, paparan senyawa kimia, dan dalam hal ini yaitu disebabkan oleh paparan senyawa kimia dari asap rokok. Respon inflamasi ditandai oleh meningkatnya jumlah limfosit. Peningkatan jumlah sel limfosit tersebut terjadi karena sel limfosit melakukan proliferasi, yaitu penggandaan jumlah sel limfosit untuk membentuk pertahanan sel terhadap antigen asing yang masuk.³ Terjadinya peningkatan jumlah limfosit secara signifikan mengindikasikan terjadinya reaksi inflamasi yang besar. Suatu penelitian terhadap tikus menunjukkan bahwa paparan asap dari 2 batang rokok per hari selama 2 minggu menunjukkan adanya reaksi inflamasi yang ditandai dengan peningkatan jumlah limfosit, sedangkan paparan asap 2 batang per hari selama 1 bulan menunjukkan adanya inflamasi dan disertai dengan stress oksidatif.⁴

Nanas diketahui memiliki kandungan bromelain. Bromelain pada nanas terbagi atas dua bagian utama, yaitu *stem bromelain* (SBM) dan *fruit bromelain* (FBM). *Stem bromelain* merupakan senyawa bromelain yang terdapat pada bagian batang nanas, sedangkan *fruit bromelain* merupakan senyawa bromelain yang terdapat pada bagian buah atau daging nanas. SBM memiliki kandungan bromelain lebih tinggi dibandingkan dengan FBM.^{6,7}

Bromelain banyak dipasarkan dalam bentuk ekstrak yang diperoleh dari hasil sentrifugasi, dan ultrafiltrasi sari batang dan buah nanas yang didinginkan; sehingga banyak ditemukan dalam bentuk bubuk, krim, tablet, atau kapsul. Penelitian oleh Moss et al menyatakan bahwa pemberian bromelain dengan dosis 10mg/kgBB pada tikus tidak menyebabkan bahaya toksisitas. Dosis letal pemberian bromelain pada tikus yaitu dengan dosis 85 mg/kgBB. Sedangkan pada manusia, pemberian bromelain dengan dosis 3000 FIP unit/hari dalam bentuk ekstrak selama 10 hari tidak menyebabkan perubahan parameter koagulasi darah.¹²

Bromelain dalam kesehatan diketahui dapat berfungsi sebagai anti inflamator, anti trombotik, anti analgesik, dan fungsi lainnya.^{6,8,9} Bromelain sebagai anti inflamator memiliki mekanisme yaitu dengan menghambat PMA-induced sel T yang diproduksi oleh sitokin Th2 (IL-4); yang merupakan

limfosit sel T anti inflamator dan menurunkan jumlah Th1 dalam memproduksi sitokin IL-2; yang merupakan pro-inflamator. Bromelain juga menunjukkan penurunan sel reseptor seperti reseptor CD44, yang berkaitan dengan migrasi leukosit dan mediator induksi proinflamasi. Selain itu, bromelain juga menunjukkan aktivitas dalam menurunkan CD4+ limfosit T, yang merupakan efektor utama dalam mekanisme inflamasi.⁹

Suatu penelitian menunjukkan bahwa bromelain dengan dosis 20 mg/kgBB dan 40 mg/kgBB secara signifikan memiliki aktivitas anti inflamasi pada tikus edema yang diinduksi dengan *carrageenan*. Penelitian lainnya menunjukkan bahwa dalam 0.1 ml sari batang nanas, terdapat kandungan bromelain sebesar 0.095 mg.^{8,10}

Berdasarkan uraian di atas, peneliti ingin meneliti mengenai pengaruh pemberian sari batang nanas (*Ananas comosus*) terhadap jumlah limfosit tikus wistar yang diberi paparan asap rokok.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan eksperimental dengan *post test only with randomized control group design* dan dilaksanakan selama 30 hari. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu sari batang nanas yang diberikan dengan 2 dosis bromelain berbeda; 20 mg/kg/BB dan 40 mg/kg/BB. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu jumlah limfosit tikus wistar, sedangkan variabel terkontrol meliputi pemaparan asap rokok yang berasal dari 2 batang rokok / hari selama 30 menit, galur tikus, jenis kelamin, pakan dan sistem perkandangan. Pelaksanaan penelitian ini telah memperoleh persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

Batang nanas (*Ananas comosus*) yang digunakan merupakan varietas *Cayenne* berusia 2 tahun. Batang nanas setelah dipanen, dikumpulkan, dan dipisahkan dari akar dan daun, kemudian dicuci bersih. Batang nanas bersih dipotong menjadi bagian-bagian kecil dan dihaluskan menggunakan *juicer*. Hasil penghalusan batang nanas tersebut kemudian disaring untuk menghilangkan bagian ampas sehingga akan diperoleh sari batang nanas murni. Sari batang nanas murni kemudian disimpan dalam lemari pendingin untuk mencegah kerusakan enzim bromelain akibat suhu. Diketahui bahwa dalam 0.1 ml sari batang nanas, mengandung 0.095 mg enzim bromelain.¹⁰

Dalam penelitian ini, pemeliharaan hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang, dan pemeriksaan jumlah limfosit dilaksanakan di Balai Laboratorium Kesehatan

Provinsi Jawa Tengah. Jumlah sampel menurut penelitian hewan coba untuk perlakuan jangka pendek menggunakan peraturan dari WHO, yaitu minimal 5 ekor. Untuk mengantisipasi *drop out* maka jumlah sampel menjadi 6 ekor untuk setiap kelompok. Hewan coba yang digunakan adalah tikus jantan dari galur wistar yang berusia 6 minggu, dengan berat badan antara 150-200 gram.

Terdapat 3 kelompok percobaan dengan masing-masing kelompok terdiri atas 6 sampel, yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, dan kelompok perlakuan 2. Semua kelompok secara terpisah diberikan paparan asap rokok yang berasal dari 2 batang rokok setiap hari selama 30 menit. Kelompok kontrol tidak diberikan sari batang nanas, sedangkan kelompok perlakuan 1 diberikan sari batang nanas sebanyak 3.1 ml/hari dan kelompok perlakuan 2 diberikan sari batang nanas sebanyak 6.2 ml/hari. Pemberian sari batang nanas pada kelompok perlakuan 1 dan 2 dilakukan dalam 2 kali pemberian. Pemberian pertama dilakukan 1 jam setelah pemaparan asap rokok, dan pemberian kedua dilakukan 1 jam setelah pemberian pertama. Pemberian sari batang nanas menggunakan sonde.

Pemaparan asap rokok dilakukan di dalam kotak berukuran 28,4 cm x 32,3 cm x 43,5 cm dengan ventilasi berukuran 5,6 cm x 28,4 cm. Rokok yang digunakan adalah rokok kretek non filter dengan kandungan tar 2 mg dan nikotin 38 mg per batang. Pemaparan asap rokok dilakukan selama 30 menit setiap hari. Pemaparan asap rokok dan pemberian sari batang nanas dilakukan dari hari

pertama penelitian hingga hari ke-30 dan pada hari ke-31 dilakukan pengambilan darah sampel melalui *plexus retro orbitalis* sebanyak ± 1 cc. Jumlah limfosit dianalisis menggunakan alat *blood analyzer Mikros 6.0*.

Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan program komputer untuk analisis statistik. Data yang diperoleh merupakan hasil pemeriksaan jumlah limfosit darah sampel seluruh kelompok. Data tersebut terlebih dahulu diuji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Kemudian dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way Anova* untuk melihat apakah terdapat perbedaan yang bermakna. Jika terdapat perbedaan yang bermakna, maka dilakukan uji lanjut *Post Hoc* untuk mengetahui besar perbedaan pada kelompok percobaan.

HASIL PENELITIAN

Penelitian dilakukan selama 30 hari. Jumlah sampel awal yaitu 18 ekor tikus wistar, namun pada prosesnya, terdapat 3 sampel *drop out* : 2 sampel *drop out* pada kelompok kontrol sehingga dilakukan penggantian sampel agar tetap memenuhi jumlah sampel minimal dan 1 sampel *drop out* pada kelompok perlakuan 2. Jumlah sampel hingga pada akhir penelitian yaitu 16 ekor. Pemaparan 2 batang asap rokok dan pemberian sari batang nanas dilakukan dari hari pertama penelitian hingga hari ke-30. Pada hari ke-31 seluruh sampel diambil darah sebanyak ± 1 cc untuk diperiksa jumlah limfosit sampel dari tiap kelompok.

Tabel.1 – Rerata jumlah limfosit dan pengaruh pemberian sari batang nanas antar kelompok

| Kelompok | N | Rata-rata jumlah limfosit \pm SD | <i>p</i> ¹ |
|-------------|---|------------------------------------|-----------------------|
| Kontrol | 5 | 11460.00 \pm 3550.07 | |
| Perlakuan 1 | 6 | 6716.67 \pm 1503.88 | 0.005 |
| Perlakuan 2 | 5 | 6320.00 \pm 1010.94 | |

1. Hasil uji *One Way Anova*

Tabel.1 menunjukkan rata-rata jumlah limfosit tikus wistar pada kelompok kontrol sebanyak 11460.00 \pm 3550.07/ μ L, kelompok perlakuan 1 memiliki rata-rata jumlah limfosit 6716.67 \pm 1503.88/ μ L dan 6320.00 \pm 1010.94/ μ L untuk rata-rata jumlah limfosit pada kelompok perlakuan 2. Rata-rata tertinggi ditemukan pada kelompok kontrol, dan rata-rata terendah ditemukan pada kelompok perlakuan 2.

Hasil uji *One Way Anova* didapatkan *p* = 0.005. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa *H₀* ditolak atau terdapat pengaruh pemberian sari batang nanas terhadap jumlah limfosit. Untuk mengetahui besar perbedaan sari batang nanas pada masing-masing kelompok, maka dilakukan uji lanjutan yaitu uji *Post Hoc Games Howell*.

Tabel.2 - Perbedaan pengaruh sari batang nanas pada masing-masing kelompok

| | Perbedaan rerata | IK 95% | | <i>p</i> |
|----------------------------|------------------|---------|----------|----------|
| | | Minimum | Maksimum | |
| Kontrol Vs perlakuan 1 | 4743.33 | 722.74 | 10209.4 | 0.81 |
| Kontrol vs perlakuan 2 | 5140 | 381.19 | 10661.19 | 0.63 |
| Perlakuan 1 vs perlakuan 2 | 396.667 | 1745.88 | 2539.22 | 0.864 |

Hasil dari uji *post-hoc* diketahui bahwa nilai signifikansi (p) antara kelompok kontrol dan perlakuan 1 yaitu 0.81, kelompok kontrol dan perlakuan 2 $p=0.63$, kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 2 $p=0.864$. Berdasarkan nilai p dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara masing-masing kelompok secara spesifik.

PEMBAHASAN

Pemberian sari batang nanas dilakukan selama 30 hari terhadap 2 kelompok perlakuan, dimana pemberian sari batang nanas dibedakan ke dalam dosis yang berbeda. Dosis pemberian sari batang nanas diperoleh dari hasil konversi, bahwa dalam 0.1 ml sari batang nanas mengandung 0.095 mg bromelain; sedangkan efektifitas bromelain dalam aktivitas anti inflamasi ditemukan pada dosis 20mg/kgBB dan 40 mg/kgBB.^{8,10} Kelompok perlakuan 1 diberikan sari batang nanas dengan dosis 3.1 ml, dengan kandungan bromelain 20 mg/kgBB; sedangkan kelompok 2 diberikan sari batang nanas dengan dosis 6.2 ml, dengan kandungan bromelain 40 mg/kgBB.

Pemaparan asap dari 2 batang rokok kepada seluruh sampel bertujuan untuk menimbulkan respon inflamasi dalam sistem imun tikus wistar. Berdasarkan intensitas dari paparan yang terjadi, paparan terhadap asap rokok dengan taraf dosis rendah berasal dari pembakaran 2 batang rokok per hari, dan paparan asap rokok dikategorikan ke taraf dosis tinggi jika berasal dari 20 batang rokok per hari.¹¹ Intensitas paparan asap yang berasal 2 batang rokok per hari tersebut kemudian dinyatakan dapat memicu respon inflamasi yang ditandai dengan adanya peningkatan jumlah limfosit dalam darah. Pada hasil penelitian ini, kelompok kontrol memiliki rata-rata jumlah limfosit yang paling tinggi, yaitu 11460 unit / μ L. Kelompok perlakuan 1 menunjukkan rata-rata jumlah limfosit di bawah dari rata-rata kelompok kontrol, yaitu 6716,67 unit / μ L, dan kelompok perlakuan 2 menunjukkan rata-rata jumlah limfosit paling rendah, yaitu 6320 unit / μ L. Suatu penelitian menunjukkan bahwa, paparan asap yang dihasilkan dari pembakaran 2 batang rokok per hari selama 2 minggu menunjukkan adanya reaksi inflamasi, dan paparan selama 1 bulan menunjukkan reaksi inflamasi dan disertai stres oksidatif.⁴

Adanya perbedaan rata-rata jumlah limfosit pada setiap kelompok kemudian didukung dengan hasil analisis *One Way Anova* yang menunjukkan bahwa nilai $p=0.005$, yang berarti pemberian sari batang nanas memiliki pengaruh terhadap jumlah limfosit tikus yang diberi paparan asap rokok.

Limfosit merupakan mediator inflamasi, yang bertindak sebagai pro-inflamator sekaligus anti inflamator. Pada saat terjadi inflamasi, timus akan melepaskan limfosit, dimana limfosit itu sendiri terbagi atas kelompok-kelompok dan memiliki tugas masing-masing yang berbeda. Sel timus akan melepaskan sel *T-helper1* dan *T-helper17* sebagai pro-inflamator, dan *T-helper2* sebagai anti inflamator, serta *T-regulator* yang berfungsi meregulasi keseimbangan antara sel Th1 dan Th2.^{9,13} Pelepasan limfosit dalam mekanisme inflamasi merupakan upaya sistem ketahanan tubuh untuk melindungi sel-sel dari antigen yang berasal dari asap rokok. Maka, pada saat terjadi inflamasi, akan ditemukan limfosit dalam jumlah yang besar.¹¹ Hal ini yang terjadi pada kelompok kontrol. Paparan asap rokok yang diterima oleh kelompok kontrol setiap hari menyebabkan jaringan limfoid pada tikus memproduksi limfosit dalam jumlah besar mengindikasikan terjadinya inflamasi hebat. Kondisi ini didukung oleh suatu penelitian yang menyatakan bahwa paparan asap dari 5 batang rokok per hari (5 hari/minggu) selama 6 bulan pada tikus menunjukkan peningkatan limfosit dari 700 unit/ μ L menjadi 60.300 unit/ μ L.¹¹

Bromelain merupakan salah satu jenis enzim pemecah protein yang banyak terkandung dalam batang nanas. Bromelain diketahui memiliki peran dalam aktivitas anti-inflamasi, anti edema, anti trombotik, dan dalam aktivitas fibrinolisis. Pada kelompok perlakuan 1 dan perlakuan 2, terdapat pemberian sari batang nanas yang mengandung bromelain. Pemberian sari batang nanas dilakukan 1 jam setelah paparan asap rokok. Bromelain yang terdapat pada batang nanas diketahui memiliki aktivitas sebagai anti-inflamator dalam darah, dimana bromelain bekerja dengan menstimulasi fungsi sel Th2 (anti-inflamator).⁹ Stimulasi yang dilakukan bromelain akan semakin meningkatkan aktivasi Th2 dan menginduksi sitokin anti inflamasi, sehingga respon inflamasi dapat menurun. Bromelain juga menghambat dan dapat menurunkan jumlah Th1 dan sitokin pro-inflamasinya, seperti IL-2. Suatu penelitian menunjukkan bahwa dosis 3000 unit FIP atau lebih bromelain menstimulasi produksi IL-5, sitokin anti inflamasi yang diproduksi oleh Th2.¹⁵ Oleh karena itu, hasil analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pemberian sari batang nanas terhadap jumlah limfosit tikus yang diberikan paparan asap rokok.

Namun, tidak terdapat perbedaan nilai yang signifikan pada jumlah limfosit antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1, kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 2, maupun

antar kelompok perlakuan. Tidak adanya perbedaan nilai jumlah limfosit yang signifikan antar kelompok tersebut menunjukkan bahwa bromelain pada dosis 20 mg/kgBB dan 40 mg/kgBB sudah dapat memberikan pengaruh terhadap jumlah limfosit pada saat terjadi inflamasi, tetapi belum cukup untuk menunjukkan pada dosis mana aktivitas yang signifikan terhadap inflamasi akibat paparan asap rokok dapat ditemukan.

Dosis bromelain 20 mg/kgBB dan 40 mg/kgBB pada tikus apabila dikonversi ke dalam dosis manusia maka akan diperoleh dosis 126 mg dan 252 mg bromelain. Suatu penelitian menunjukkan bahwa pemberian 100 mg selama 3 hari dan dilanjutkan dengan dosis 150 mg selama 4 hari ekstrak bromelain pada kelompok perlakuan memiliki aktivitas inflamasi yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberikan plasebo; namun tidak terdapat perbedaan yang ditunjukkan dari hasil analisis statistik.¹⁶

SIMPULAN

Pemberian sari batang nanas (*Ananas comosus*) berpengaruh terhadap jumlah limfosit tikus wistar yang diberi paparan asap rokok ($p < 0.05$), namun tidak terdapat pengaruh yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1, kelompok kontrol dengan perlakuan 2, dan antara kelompok perlakuan 1 dan 2 ($p > 0.05$).

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka dapat disarankan dosis bromelain untuk diaplikasikan kepada manusia dalam menurunkan respon inflamasi yaitu pada dosis 126 mg bromelain atau setara dengan 132.6 ml sari batang nanas dan pada dosis 252 mg bromelain atau setara dengan 265.2 ml sari batang nanas.

DAFTAR PUSTAKA

1. Fowles J, Bates M. The Chemical Constituents in Cigarettes and Cigarette Smoke, Priorities for Harm Reduction. *Epidemiology and Toxicology Group*. 2000.
2. Global Adult Tobacco Survey Fact Sheet Indonesia 2011, World Health Organization.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of The Cell, 4th edition. *NCBI Bookshelf*; New York : Garland Science; 2002
4. Fajrunni'mah R. Pengaruh Pemberian Sari Noni terhadap Selisih Jumlah Total Leukosit, Jumlah Neutrofil, dan Kadar Alkalifosfatase pada Tikus Wistar Sebelum dan Sesudah Diberi Paparan Asap Rokok. *Universitas Diponegoro*. 2011.
5. Bala M, Ismail NA, Mel M, Jami MS, Salleh HM, Amid A. Bromelain production : current trends and perspective. Vol 65 No 11 ; 2012.
6. Amid A, Othman MEF, Jamaluddin MJ. Effects of operating conditions in spray drying of recombinant bromelain. *J Appl. Sci & Agric*. 2014. 9 (20) : 37 – 43.
7. Lawal D. Medicinal, pharmacological, and phytochemical potentials of *Annona comosus* Linn. Peel – A review. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. 2003 ; 6 (1) : 101 – 104.
8. Sudjarwo SA. Anti-inflammatory and Analgesic Effect of Bromelain in Mice and Rats. *Department of Pharmacology Airlangga University School of Medicine Surabaya*. 2005. 24 : 4.
9. Secor ER, et al. Bromelain Exerts Anti-inflammatory Effects in An Ovalbumin Induced Mice Model of Allergic Airway Disease. *Cell Immunol*. 2005 ; 237 (1) : 68 – 75.
10. Mohapatra A, Rao VM, Ranjan M. Comparative study of the increased production and characterization of bromelain from the peel, pulp, and stem pineapple (*Anannus commas*). *International Journal of Advancements in Research & Technology*. 2013. Vol 2 : Issue 8 World Health Organization 2014. [cited 2015 March 6]. Available from URL : apps.who.int/gho/data/node.main.1259?lang=en.
11. D'hulst AI, Vermaelen KY, Bruselle GG, Joos GF, Pauwels RA. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J*. 2005; 204-213
12. Orsini, RA. Safety and Efficacy Report of Bromelain. *American Society of Plastic Surgeon*. 2006; DOI: 10.1097/01.prs.0000242503.50548.ee
13. Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ. Inflammation : Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annu Rev.Ecol.Evol.Syst*. 2012. 43 : 385 – 406
14. Witten ML. Environmental Tobacco Smoke (Google eBook). CRC Press. 2000; 340-341.
15. Muller S, et al. Placebo-controlled randomized clinical trial on the immunomodulating activities of low-and high dose of bromelain after oral administration – new evidence on the anti-inflammatory mode of action of bromelain. *Phytother. Res*. 2012 ; DOI: 10.1002/ptr.4678
16. de la Barrera-Núñez MC, et al. Prospective double-blind clinical trial evaluating the effectiveness of Bromelain in the third molar extraction postoperative period. *Med Oral Patol Oral Cir.Bucal*. 2014 Mar 1;19 (2):e157-62.