

The image shows a vertical column of 25 identical thesis covers from Universitas Brawijaya. Each cover is white with black text. The title 'EFEK PAPARAN PADA MASA KONSENTRASI FASILITATOR TERHADAP AKTIVITAS SOCIETY' is at the top, followed by the author's name 'WINDY YANTI'. Below that is the number '176'. At the bottom, it says 'PROGRAM PASCASARJANA'. To the right of the text, there is a circular logo with 'UNIVERSITAS BRAWIJAYA' written around the perimeter and 'PROGRAM PASCASARJANA' in the center.

EFEK PAPARAN PARTIKEL DEBU BATU BARA UPAKTIVITAS SOD DAN KERUSAKAN OXIDATIF DNA PADA MENCIT MODEL ASMA

ADA MENCIT MODEL ASMA

Vijaya Repository Univ
Bengaluru India

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Magister



Oleh:

WINDY YULIANA BUDIANTO

176070100111002

PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK

KONSENTRASI FARMAKOLOGI, TOKSIKOLOGI,

DAN FISIOLOGI MOLEKULER

PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

ITAS BRA
MADANG

2019



PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur unsur plagiasi, saya bersedia agar tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (Magister) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 13 Desember 2018
Mahasiswa

Nama : Windy Yuliana Budianto
NIM : 176070100111002
PS : Ilmu Biomedik
Program : Pascasarjana

Fakultas : Kedokteran UB

iii

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

JUDUL TESIS:

**EFEK PAPARAN PARTIKEL DEBU BATU BARA
TERHADAP AKTIVITAS SOD DAN KERUSAKAN OXIDATIF DNA
PADA MENCIT MODEL ASMA**

Nama Mahasiswa : WINDY YULIANA BUDIANTO

NIM : 176070100111002

Program Studi : Magister Ilmu Biomedik

Minat : Farmakologi, Toksikologi dan Fisiologi Molekuler

KOMISI PEMBIMBING:

Ketua : Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes

Anggota : Dr. Eko Suhartono, Drs., M.Si

TIM DOSEN PENGUJI:

Dosen Penguji 1 : Agustina Tri Endharti, S.Si., PhD

Dosen Penguji 2 : Dr. dr. Setyawati Suharto, M.Kes

Tanggal Ujian : 13 Desember 2018

SK Penguji : 1247/UN10.F08.11.21/PP/2018

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

IDENTITAS TIM PENGUJI

Repository Universitas Brawijaya

PERNYATAAN KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH

Windy Yuliana Budianto, Husnul Khotimah, Eko Suhartono. Effect of Coal Dust Exposure on the SOD Activity and the Oxidative DNA Damage in Asthma Mice Model. *Indonesian Biomedical Journal*. 2019, in press



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan

rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul: Efek

Paparan Partikel Debu Batu Bara Terhadap Aktivitas SOD dan Kerusakan

Oksidatif DNA pada Mencit Model Asma.

Pokok-pokok bahasan yang disajikan dalam tesis ini yaitu meliputi tentang

penyakit asma, batu bara, serta efek negatif yang ditimbulkan dari masing-masing

hal tersebut. Poin penting yang ingin disampaikan pada tesis ini adalah potensi

efek debu batu bara terhadap kerusakan oksidatif DNA serum pada kondisi asma.

Tesis ini disusun untuk memenuhi sebagian syarat guna memperoleh gelar

Magister Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Orang tua, Karsu'ut Budianto dan Sri Wahyuningsih Pinda yang dengan senantiasa memberikan dukungan baik berupa semangat, materiil, dan doa dalam penyelesaian tesis ini.

2. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani A.R., MS., selaku Rektor Universitas Brawijaya, Malang.

3. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4. Dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, Sp.M., selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

5. Dr. Husnul Khotimah, S.Si., M.Kes, selaku ketua komisi pembimbing tesis yang telah banyak meluangkan waktu untuk berbagi ilmu, serta memberikan dukungan, arahan, masukan, dan bimbingan yang sangat bermanfaat dalam penyelesaian penyusunan tesis ini.

6. Dr. Drs. Eko Suhartono, M.Si selaku anggota komisi pembimbing tesis yang telah banyak meluangkan waktu untuk berbagi ilmu, serta memberikan dukungan, arahan, masukan, dan bimbingan yang sangat bermanfaat dalam penyelesaian penyusunan tesis ini.
 7. Ibu Agustrina Tri Endharti, S.Si., Ph.D dan Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes selaku dosen pengaji tesis yang telah memberikan masukan serta saran yang membangun dalam penyusunan tesis ini.
 8. Rekan peneliti ibu Fujati yang telah memfasilitasi dan bekerjasama dalam penelitian.
 9. Seluruh staf Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Sentra Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah banyak membantu selama proses penelitian berlangsung.
 10. Segenap pihak yang telah banyak membantu selama proses penelitian ini berlangsung.
- Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun agar tesis ini dapat menambah wawasan dan memberikan manfaat.

Malang, Desember 2018

Penulis

Windy Yuliana Budianto, NIM. 176070100111002. Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, 13 Desember 2018. Efek Paparan Partikel Debu Batu Bara Terhadap Aktivitas SOD dan Kerusakan Oksidatif DNA pada Mencit Model Asma. Komisi Pembimbing, Ketua: Husnul Khotimah, Anggota: Eko Suhartono

RINGKASAN

Asma merupakan inflamasi kronis saluran pernapasan yang dapat diperparah dengan paparan alergen secara terus menerus. Partikel debu batu bara merupakan jenis alergen yang didapat dari polutan udara yang diketahui dapat meningkatkan hipersensitivitas, inflamasi saluran pernapasan, dan menimbulkan stres oksidatif pada kondisi asma. Meski demikian, hingga saat ini patomekanisme asma dan debu batu bara belum diketahui secara pasti. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek paparan partikel debu batu bara terhadap aktivitas SOD dan kerusakan oksidatif DNA pada mencit model asma.

Sebanyak 24 ekor mencit balb/c betina dibagi kedalam empat kelompok. Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol. Kelompok kedua adalah mencit yang diberi paparan inhalasi partikel debu batu bara PM₅ 12,5 mg/m³ selama 4 minggu. Kelompok ketiga yaitu mencit yang disensitisasi OVA melalui injeksi intraperitoneal dan inhalasi OVA 1% dalam NaCl 8 mL 3 kali dalam seminggu selama 8 minggu. Kelompok keempat adalah mencit yang disensitisasi OVA melalui injeksi intraperitoneal dan inhalasi OVA 1% dalam NaCl 8 mL 3 kali dalam seminggu selama 8 minggu serta diberi paparan inhalasi partikel debu batu bara PM₅ 12,5 mg/m³ selama 4 minggu.

Pengolahan partikel debu batu bara dilakukan menggunakan alat *pulverizer* yang terdiri dari Ball, Ring, dan Raymond Mild di Laboratorium Carsurin Coal Banjarmasin. Proses tersebut menghasilkan partikel debu batu bara berukuran 75 µm. Agar partikel debu batubara dapat masuk ke dalam saluran pernapasan bawah, maka partikel debu batubara tersebut kemudian di lakukan penyaringan kembali menggunakan filter *Mesh MicroSieve* (BioDesign, Newyork, Ny, USA). sehingga diperoleh partikel debu batubara dengan diameter 5 µm (PM₅). Sensitisasi OVA yang diberikan adalah albumin yang berasal dari Dried Egg White, crude (nomer produk A0198, TCI Chemical, India, Pvt, Ltd). Sensitisasi awal diberi melalui injeksi OVA secara intraperitoneal pada hari ke-0 dan 14. Sensitisasi ulang diberikan pada hari ke-21 melalui inhalasi OVA 1% dengan menggunakan ultrasonic nebulizer Omron (tipe NE-U17, Shimadzu, Konotsubo, Terado-cho, Muko, Kyoto, Japan) selama 20 menit secara berkala 3 kali dalam seminggu selama 8 minggu.

Stres oksidatif dilihat dengan mengukur aktivitas SOD dengan metode NBT, dan konsentrasi 8-OHdG dengan enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) kit mouse 8-Hydroxy-desoxyguanosine (Cat.No. E0187Mo, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China). Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat penurunan yang signifikan pada aktivitas SOD serum serta tidak terdapat peningkatan yang signifikan pada konsentrasi 8-OHdG serum dari masing-masing kelompok ($p>0,05$). Paparan partikel debu batu bara selama 4 minggu belum mampu menyebabkan penurunan aktivitas SOD serum dan peningkatan 8-OHdG serum pada mencit model asma.

Windy Yulian Budianto, NIM. 176070100111002, Master Program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine Universitas Brawijaya Malang, December 13th, 2018. Effect of Coal Dust Particulate Matter Exposure on the SOD Activity and the Oxidative DNA Damage in Asthma Mice Model. Supervisor Chairman: Husnul Khotimah, Member: Eko Suhartono.

Asthma is a chronic inflammation of the respiratory tract which can be aggravated by continuous exposure to allergens. Coal dust particles are a type of allergen obtained from air pollutants that are known to increase hypersensitivity and inflammation of the respiratory tract as well as trigger the oxidative stress in asthma conditions. However, to date, coal dust and asthma pathomechanism remain unclear. Thus, this study aimed to examine the effect of coal dust particulate matter exposure on the SOD activity and the oxidative DNA damage in asthma mice model.

Twenty-four female balb/c mice were divided into four groups. The first group was the controlled group. The second group was composed of mice exposed to 12.5 mg/m³ PM₅ coal dust for four weeks. The third group was composed of OVA-sensitized mice by peritoneal injection and inhalation of 1% OVA diluted in 8 mL NaCl, three times a week for eight weeks. The fourth group was composed of OVA-sensitized mice by peritoneal injection and inhalation of 1% OVA diluted in 8 mL NaCl, three times a week for eight weeks, and exposed to inhalation of 12.5 mg/m³ PM₅ coal dust particles for four weeks.

The coal dust particles were produced using pulverizer consisting of Ball, Ring, and Raymond Mill at Carsurin Coal Laboratory in Banjarmasin. The process produced coal dust particles with a diameter of 75 µm. Coal dust particle that was engineered to reach the lower respiratory tract was confirmed to have the diameter of fewer than 5 µm (PM5). It was obtained by filtering the coal dust that has been grinded priorly using a Mesh MicroSieve (BioDesign, Newyork, Ny, USA). The OVA used was albumin from Dried Egg White, crude (Product number A0198, TCI Chemical, India, Pvt. Ltd). The initial sensitization was performed by intraperitoneally injecting of OVA. The re-sensitization was performed on day 21 by inhalation of 1% OVA using Omron Ultrasonic Nebulizer (type NE-U17, Konotsubo, Terado-cho, Muko, Kyoto, Japan) for 20 minutes periodically three times a week for eight weeks.

The oxidative stress was examined by measuring the SOD activity employing the NBT method, and the 8-OHdG concentration using the mouse 8-Hydroxy-deoxyguanosine enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Cat. No.E0187Mo, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China). The results reported that there were no significant decrease in SOD activity and also no significant increase in 8-OHdG serum concentration from each group ($p>0.05$). Combination of OVA and coal dust showed the worst effect on IL-13, 8-OHdG, and SOD activity as well. Coal dust exposure for four weeks isn't adequate to induce oxidative DNA damage systemically in asthma mice model.

SUMMARY

Repository Universitas Brawijaya

	DAFTAR ISI
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS	iii
IDENTITAS TIM PENGUJI	iv
PERNYATAAN KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH	v
KATA PENGANTAR	vi
RINGKASAN	viii
SUMMARY	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Teoritis	6
1.4.2 Manfaat Praktis	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Asma	7
2.1.1 Definisi	7
2.1.2 Etiologi	7
2.1.3 Patofisiologi Asma	8
2.1.4 Stres Oksidatif pada Asma	11
2.2 Partikel Debu Batu Bara	13
2.2.1 Definisi	13
2.2.2 Komposisi Kimia	14
2.2.3 Stres Oksidatif Akibat Paparan Partikel Debu Batu Bara	16
2.3 Marker Stres Oksidatif	18
2.3.1 Superoxida Dismutase (SOD)	18
2.3.2 8-OHDG (<i>8-hydroxy-deoxyguanosine</i>)	19
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	22
3.1 Kerangka Konsep	22
3.2 Hipotesis	24
BAB 4 METODE PENELITIAN	25
4.1 Rancangan Penelitian	25
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian	25
4.3 Material dan Instrumen Penelitian	26
4.3.1 Material Penelitian	26
4.3.2 Alat dan Bahan Penelitian	26

Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya	Repository Universitas Brawijaya
4.4 Variabel Penelitian	27
4.4.1 Variabel Bebas	27
4.4.2 Variabel Terikat	27
4.5 Definisi Operasional	27
4.6 Metode Penelitian	28
4.6.1 Aklimatisasi	28
4.6.2 Pembuatan Debu Batu bara	29
4.6.3 Pembuatan Model Asma pada Mencit	30
4.6.4 Paparan Debu Batu Bara	32
4.6.5 Pengambilan Sampel Darah	33
4.6.6 Pemisahan Serum	33
4.6.7 Pemeriksaan SOD	34
4.6.8 Pemeriksaan 8-OHdG	35
4.7 Analisis Data	36
4.8 Alur penelitian.....	37
BAB 5 HASIL PENELITIAN	38
5.1 Aktivitas SOD Serum	38
5.2 Konsentrasi 8-OHdG Serum	39
5.3. Analisis Korelasi Aktivitas SOD dan Konsentrasi 8-OHdG Serum	40
BAB 6 PEMBAHASAN	41
6.1 Aktivitas SOD Serum	42
6.2 Konsentrasi 8-OHdG Serum	45
6.3 Korelasi Aktivitas SOD dan Konsentrasi 8-OHdG Serum	47
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	50
7.1 Kesimpulan	50
7.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	60

DAFTAR GAMBAR	
Gambar 2.1 Mekanisme Sitokin pada Patofisiologi Asma	9
Gambar 2.2 Faktor-faktor yang Meghambat Aliran Udara pada Asma Akut dan Persisten	10
Gambar 2.3 Batu Bara dan Partikel Debu Batu Bara.....	14
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	22
Gambar 4.1 Skema Sensitisasi OVA.....	30
Gambar 4.2 Alat Inhalasi OVA.....	32
Gambar 4.3 Skema Alur Penelitian	37
Gambar 5.1 Aktivitas SOD pada Serum Mencit Balb/c Betina	38
Gambar 5.2 Konsentrasi 8-OHDG pada Serum Mencit Balb/c Betina	39
Gambar 6.1 Skema Korelasi Aktivitas SOD dan Konsentrasi 8-OHDG	48

DAFTAR SINGKATAN

•OH	: Radikal Hidroksil
•O ₂	: Superoxide
°C	: Derajat Celcius
8-OHdG	: 8-hydroxydeoxyguanosine
Al(OH) ₃	: Aluminium Hidroksida
AOPP	: Advanced Oxidation Protein Products
BAL	: Bronchoalveolar lavage
COPD	: Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DEP	: Diesel Exhaust Particle
DFX	: Deferoxamine
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGF	: Epidermal Growth Factor
ELISA	: Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fe	: Besi
FGF	: Fibroblast Growth Factor
GM-CSF	: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H ₂ O ₂	: Hydrogen Peroxide
HOBr	: Hypobromous Acid
HOCl	: Hypochlorous Acid
IgE	: Immunoglobulin E
IGF-1	: Insulin Growth Factor 1
IL	: Interleukin
m ³	: Meter Kibik
MCP-1	: Monocyte Chemotactic Protein-1
MDA	: Malondialdehyde
mg	: mili gram
ml	: mili liter
mm	: mili mol
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid
MSI	: Microsatellite DNA Instability
NAC	: N-acetylysteine
NaCl	: Natrium Chlorida
NADPH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa B
O ₂	: Oksigen
OD	: Optical Density
OVA	: Ovalbumin
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PM	: Particulate Matter
RISKESDAS	: Riset Kesehatan Dasar
ROS	: Reactive Oxigen Species
rpm	: Rotate per minute
SOD	: Superoxide Dismutase
STAT6	: Signaling Transducer and Activator of Transcription 6

TARC	: Modified Congo Residue
TBARS	: Thiobarbituric Acid Reactive Substances
Th2	: T helper 2
TNF- α	: Tumor Necrosis Factor-alpha
U	: Unit
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	: World Health Organization
XO	: Xantine Oxidase
μ g	: Mikro gram
μ l	: Mikro liter
μ M	: Mikro molar

1.1 Latar Belakang

Asma merupakan penyakit inflamasi kronis saluran pernapasan yang melibatkan banyak sel dan elemennya. Inflamasi tersebut menyebabkan hiperresponsif pada saluran pernapasan yang akan menimbulkan gejala episodik berulang. Gejala episodik berulang yang sering muncul adalah sesak napas yang diikuti dengan suara mengi (*wheezing*), dada terasa berat, dan batuk yang sering terjadi pada malam hari (GINA, 2015). Gejala yang berulang dari asma dapat mengganggu aktivitas tidur dan aktivitas sehari-hari. Asma memiliki tingkat kematian terendah jika dibandingkan dengan penyakit kronis lainnya, meskipun demikian derajat keparahan asma sangat menentukan kualitas hidup dari penderita (WHO, 2017).

Berdasarkan data *World Health Organization (WHO)* (2017) dinyatakan bahwa, prevalensi penderita asma diprediksi meningkat dari tahun 2016-2025 yakni dari 235 juta menjadi 400 juta penduduk di dunia (WHO, 2017 dan GINA 2015). Sementara itu, berdasarkan data RISKESDAS tahun 2013 prevalensi penyakit asma di Indonesia mencapai 4,5% dari seluruh jumlah penduduk. Pada sisi lain, sebanyak 6,4% penduduk menderita asma berada di Wilayah Kalimantan Selatan (Riskesdas, 2013). Berdasarkan data tersebut didapatkan bahwa Kalimantan Selatan merupakan wilayah terbesar ke-5 di Indonesia dengan jumlah penderita asma terbanyak setelah Sulawesi Tengah (7,8%), Nusa Tenggara Timur (7,3%), Daerah Istimewa Yogyakarta (6,9%), dan Sulawesi Selatan (6,7%).

Kejadian asma disebabkan oleh adanya kontak dan interaksi secara terus menerus tehadap alergen, sehingga menyebabkan reaksi alergi yang memicu inflamasi dan perubahan struktur saluran pernapasan (*airway remodeling*).

PENDAHULUAN

Penelitian tentang asma sudah banyak dilakukan dengan subyek manusia. Akan tetapi, beberapa penelitian telah menggunakan hewan coba sebagai model asma yakni dengan menggunakan Ovalbumin (OVA). Berdasarkan penelitian Barlianto dkk (2009) menyebutkan bahwa paparan kronik OVA secara inhalasi pada model binatang alergi menyebabkan inflamasi alergi dan perubahan struktur saluran napas. Perubahan struktur saluran napas (*airway remodeling*) menunjukkan seperti gambaran asma pada manusia (Barlianto dkk, 2009). Penelitian Ricardo et al (2004) menunjukkan adanya kerusakan oksidatif protein yang ditandai oleh peningkatan kadar karbonil protein dan TBARS (*Thiobarbituric Acid-Reactive Species*) pada paru dari proses paparan debu batu bara (Ricardo, et al, 2004).

Selain itu, penelitian Kania et al (2012) menunjukkan bahwa efek dari paparan debu batu bara PM₁₀ menyebabkan peroksidasi lipid yang ditunjukkan dengan peningkatan kadar *malondialdehyde* (MDA) pada paru dan cairan BAL (*Bronchoalveolar lavage*) tikus (Kania et al, 2012).

Kondisi asma dapat diperparah dengan adanya paparan dari alergen yang terus menerus. Alergen-alergen tersebut ditemukan pada polutan udara seperti asap rokok, asap kendaraan bermotor, asap pabrik dan pertambangan, serta debu dari lingkungan rumah atau debu dari proses pertambangan (Liu et al, 2009).

Polutan yang banyak terdapat di Wilayah Kalimantan Selatan salah satunya adalah debu pertambangan batu bara. Berdasarkan data Badan Geologi Indonesia tahun 2013, Kalimantan Selatan merupakan salah satu dari 3 provinsi sebagai penghasil tambang batu bara terbesar di Indonesia (Badan Geologi Indonesia, 2013).

Debu batu bara hasil proses pertambangan dan transportasi batu bara dapat terhirup pekerja tambang dan masyarakat sekitar. Hasil pengamatan yang didapatkan dari proses tambang batu bara dan transportasinya diketahui bahwa dari proses tersebut diduga dapat menghasilkan *particulate matter* debu batu bara

di udara bebas baik dipertambangan maupun pada jalur lalu lintas yang dilalui truk-truk pengangkut batu bara. *Particulate matter* debu batu bara yang beredar bebas

diudara dapat menjadi polutan yang mempengaruhi morfologi saluran pernapasan

(Ricardo *et al.*, 2004).

Senyawa yang terkandung didalam debu batu bara antara lain karbon,

hidrogen, nitrogen, oksigen, mineral anorganik, kuarsa, dan *trace logam* (Donbak

et al., 2005). Kandungan anorganik yang terdapat dalam debu batu bara yaitu besi

(36.9%), silika (17.9%), molibdenum (15%), alumunium (10%), kalsium (8.67%),

sulfur (4.7%), titanium (3.65%), dan beberapa senyawa anorganik lainnya yang

terdapat lebih sedikit seperti potassium (0.96%), magnesium (0.53%), ytterbium

(0.40%), kromium (0,34%), nikel (0.20%), dan vanadium (0.16%) (Kania *et al.*,

2012). Senyawa-senyawa tersebut terdapat pada polutan debu batu bara yang

dapat terhirup melalui saluran pernapasan. Paparan yang terus menerus akan

mengakiviasi makrofag alveolar dan menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS),

serta melepaskan mediator inflamasi. Mekanisme tersebut dapat memicu

kerusakan paru-paru yang dapat mengakibatkan penurunan fungsi sistem

pernapasan dan stres oksidatif (Richardo *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009).

Stress oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara oksidan dan

antioksidan yang ada di dalam tubuh sehingga dapat mengakibatkan kerusakan

oksidatif. Oksidan merupakan molekul yang dapat menarik elektron molekul

terdekatnya sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil. Oksidan terdapat

dalam dua bentuk, yakni bentuk radikal (misalnya radikal hidroksil, radikal peroksil,

anion superokida, dan lain-lain) dan non radikal (misal molekul H_2O_2 , HOCl,

HOBr, dan lain-lain) (Umit *et al.*, 2011). Sementara itu antioksidan adalah molekul

yang dapat menghambat proses oksidasi. Antioksidan dapat dibedakan menjadi

antioksidan enzimatik (misal peroksidase, katalase, dan superokida dismutase)

dan nonenzimatik seperti, vitamin C dan E, beta karoten, glutation, dan lain-lain.

Penelitian Ricardo *et al* (2004) menunjukkan adanya peningkatan aktivitas SOD di paru-paru tikus pada hari ke-60 setelah diberikan paparan debu batu bara. Peningkatan aktivitas SOD merupakan salah satu mekanisme pertahanan terhadap proses kerusakan oksidatif yang terjadi pada paru-paru (Ricardo *et al*, 2004). Kerusakan oksidatif merupakan efek dari proses oksidatif yang tidak teratasi sehingga dapat menyebabkan kerusakan lipid dengan terbentuknya malondialdehid (MDA), kerusakan protein dengan terbentuknya karbonil dan Advanced Oxidation Protein Products (AOPP), dan kerusakan DNA dengan terbentuknya 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) (Cho *et al*, 2010). Penelitian oleh Bortey-Sam *et al* (2017) mengenai hubungan antara paparan metal terhadap kerusakan lipid dan DNA pada populasi, menunjukkan adanya peningkatan MDA dan 8-OHdG pada urin sampel yang tinggal di daerah perkotaan Kumasi, Ghana. Selain itu, pada penelitian tersebut menunjukkan adanya hubungan paparan metal pada daerah perkotaan Kumasi terhadap peningkatan penyakit asma pada individu perkotaan (Bortey-Sam *et al*, 2017).

Pengukuran 8-OHdG serum pada mencit model asma didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Tzortzaki *et al* (2012). Penelitian tersebut mengidentifikasi adanya peningkatan konsentrasi 8-OHdG pada serum dan sputum pasien COPD (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) yang diikuti dengan terdeteksinya MSI (*Microsatellite DNA Instability*) atau (MSI+) (Tzortzaki *et al*, 2012). Hal tersebut sesuai dengan beberapa hipotesis pada penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa MSI akan terlihat pada kondisi inflamasi kronik pada jaringan seperti yang ditunjukkan sebelumnya pada COPD, reumatoid artritis, dan asma. MSI akan menjadi subjek perubahan sekunder yang berhubungan dengan inflamasi kronik saluran napas dan peningkatan stres

oksidatif yang kemudian menyebabkan ketidakseimbangan antara kerusakan

DNA dan mekanisme DNA *repair* (Makris *et al*, 2008; Zervou *et al*, 2006; Chang *et al*, 2002).

Meski demikian, keterlibatan SOD pada kondisi asma yang terpapar batu bara hingga mengakibatkan kerusakan oksidatif DNA masih belum diketahui secara jelas. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dikaji efek paparan partikel debu batu bara terhadap aktivitas SOD dan kerusakan oksidatif DNA yang ditandai oleh peningkatan 8-OHdG serum pada mencit model asma.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah paparan partikel debu batu bara dapat menurunkan aktivitas SOD dan kerusakan oksidatif DNA yang ditandai dengan peningkatan 8-OHdG serum pada mencit model asma?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini untuk menjelaskan efek paparan partikel debu batu bara terhadap aktivitas SOD dan kerusakan oksidatif DNA yang ditandai oleh peningkatan 8-OHdG serum pada mencit model asma.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini untuk:

1. Membuktikan adanya penurunan aktivitas antioksidan superoksid dismutase (SOD) serum pada mencit model asma.

2. Membuktikan adanya peningkatan kerusakan oksidatif DNA yang ditandai adanya peningkatan 8-OHdG serum pada mencit model asma.

3. Membuktikan hubungan antara aktivitas antioksidan superoksida dismutasi (SOD) dengan kerusakan oksidatif DNA yang ditandai dengan peningkatan 8-OHdG serum pada monyet model asma.

3. Membuktikan hubungan antara aktivitas antioksidan superoksid dismutasi (SOD) dengan kerusakan oksidatif DNA yang ditandai dengan peningkatan 8-OHDG serum pada mencit model asma.

4. Membuktikan hubungan antara efek paparan partikel debu batu bara terhadap aktivitas SOD dan kerusakan oksidatif DNA yang ditandai oleh peningkatan 8-OHdG serum pada mencit model asma.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan tentang patofisiologi partikel debu batu bara pada kondisi terhadap aktivitas antioksidan tubuh dan

Repository Universitas Brawijaya
kerusakan oksidatif DNA

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bahwa 8-OHDg dapat

digunakan sebagai biomarker kerusakan oksidatif DNA pada serum dari darah individu yang memiliki asma dan terpapar partikel debu batu bara

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya⁶

Repository Universitas Brawijaya

2.1 Asma

2.1.1 Definisi

Asma merupakan gangguan inflamasi kronik pada bagian pernapasan yang

melibatkan interaksi kompleks dari berbagai jenis sel dan mediatornya (Sahiner et al, 2011). Inflamasi tersebut menyebabkan peningkatan hiperresponsivitas saluran pernapasan yang menimbulkan gejala episodik berulang yang ditandai dengan sesak napas disertai suara mengi (*wheezing*), dada terasa berat, batuk yang sering terjadi pada malam hari atau pagi hari (WHO, 2017; Kleniewska & Pawliczak, 2017). Asma bersifat reversibel sehingga dapat pulih tanpa pengobatan, meskipun demikian derajat keparahan asma sangat menentukan kualitas hidup penderitanya (WHO, 2017).

2.1.2 Etiologi

Beberapa hasil penelitian menyebutkan keterlibatan spesies oksigen reaktif (ROS) yang diproduksi secara endogen maupun eksogen, terhadap perkembangan patogenesis asma. Selain itu, terdapat banyak faktor risiko yang memicu perkembangan asma, diantaranya faktor yang berasal dari individu dan lingkungan. Kedua faktor tersebut secara bersama-sama akan meningkatkan risiko asma. Faktor individu seperti kecenderungan genetik misanya peningkatan

IgE, jenis kelamin (asma sering menyerang wanita dan pria dewasa muda), ras, obesitas, dan stres oksidatif. Sementara itu, faktor lingkungan yang dapat menyebabkan asma diantaranya adalah alergen (baik dari hewan ataupun tumbuhan), terjadinya infeksi virus, diet (asupan rendah antioksidan dalam makanan), dan polusi udara (asap knalpot, asap tembakau, serta debu hasil dari proses tambang batu bara) (Kleniewska & Pawliczak, 2017).

BAB 2

JAN PUSTAKA

lamasi kronik pada bagian pernapasan yang berbagai jenis sel dan mediatornya (Sahiner et al., 2017). Pada pasien dengan asma kronik terdapat peningkatan hiperresponsivitas saluran pernafasan yang berulang yang ditandai dengan adanya episodik berulang yang ditandai dengan (wheezing), dada terasa berat, batuk yang terjadi pagi hari (WHO, 2017; Kleniewska & Wozniak, 2017). Asma kronik merupakan penyakit reversibel sehingga dapat pulih tanpa rajaat keparahan asma sangat menentukan

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

ebutkan keterlibatan spesies oksigen reaktif endogen maupun eksogen, terhadap Selain itu, terdapat banyak faktor risiko yang lainnya faktor yang berasal dari individu dan secara bersama-sama akan meningkatkan cenderung genetik misanya peningkatan yang wanita dan pria dewasa muda), ras, tentara itu, faktor lingkungan yang dapat adalah alergen (baik dari hewan ataupun diet (asupan rendah antioksidan dalam ska & Pawliczak, 2017).

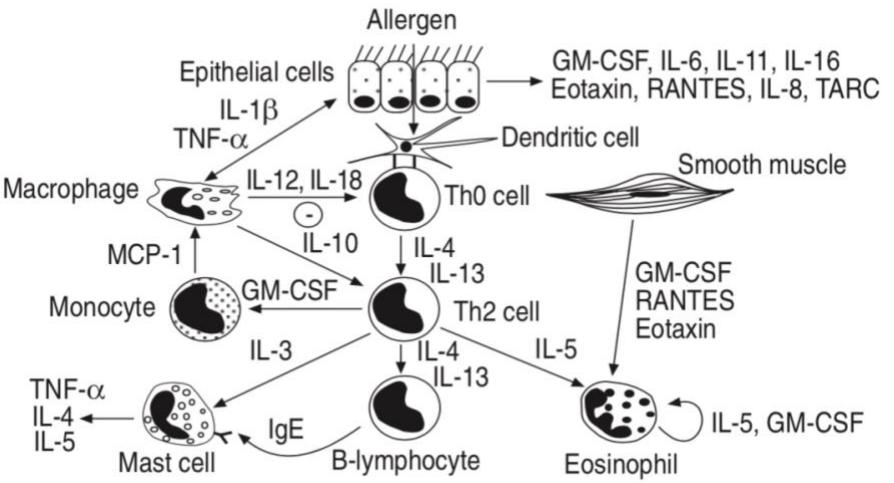
Proses tambang batu bara dapat mencemari lingkungan baik itu tanah, air dan udara yang nantinya akan berdampak buruk bagi kesehatan manusia. Beberapa hasil penelitian menunjukkan adanya proses inflamasi pada saluran pernapasan yang terjadi pada pekerja tambang dan masyarakat yang bermukim disekitarnya yang terpapar oleh batu bara (Kania *et al*, 2014; Petsonk *et al*, 2013, Matzenbacher *et al*, 2016). Mo *et al* (2014) mengemukakan bahwa individu yang menghirup debu batu bara menimbulkan berbagai penyakit saluran pernapasan seperti fibrosis paru (Mo *et al*, 2014). Sementara itu, Omland *et al* (2014) menyebutkan bahwa inhalasi kronik batu bara dapat menstimulasi penyakit kronik seperti asma, bronkitis dan empisema (Omland *et al*, 2014).

2.1.3 Patofisiologi Asma

Keterpaparan faktor risiko asma terhadap penderita asma merupakan langkah awal yang mencetuskan berkembangnya asma dan menimbulkan berbagai macam gambaran klinis yang sering muncul pada penderita asma. Gambaran khas dari asma berupa inflamasi saluran pernapasan yang merupakan hasil yang dimediasi oleh sel mast, eosinofil, sel epitelial, dan sel limfosit T, makrofag, dan neutrofil. Mekanisme imun yang menggerakkan proses inflamasi pernapasan pada asma diperantarai oleh sel-sel imun terutama sel limfosit T.

Sementara itu, asma dapat dipresentasikan sebagai akibat adanya kondisi alergik dan nonalergik, hal tersebut terlihat pada kehadiran IgE yang diaktivasi oleh alergen. (Faturrachman *et al.* 2012; Maslan & Mims, 2014).

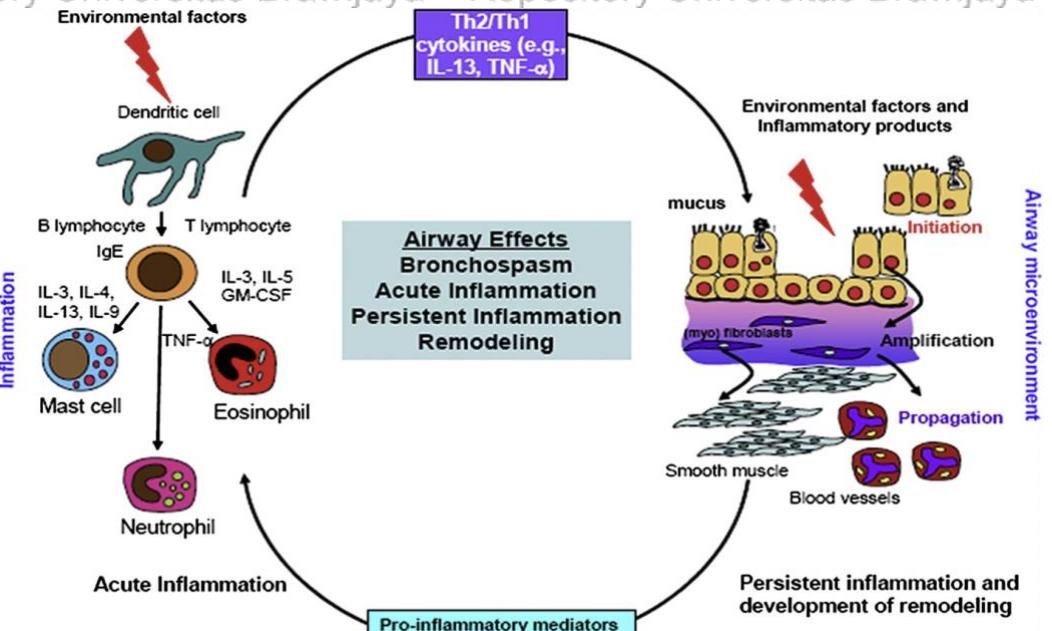
Alergen yang masuk ke dalam saluran pernapasan dan terakumulasi pada sel epitelial saluran pernapasan. Akumulasi alergen di sel epitelial akan mengaktifasi makrofag dan melepaskan sitokin (GM-CSF, IL-6, IL-8, IL-11, IL-16) serta kemokin (eotaxin, RANTES, dan TARC). Alergen yang masuk pada saluran pernapasan juga akan diresepsi oleh antigen dari alergen di presentasikan oleh sel



Gambar 2.1. Mekanisme Sitokin pada Patofisiologi Asma. Terdapat banyak sitokin yang dilepaskan dari sel-sel inflamasi dan sel struktural saluran pernapasan yang menimbulkan respon inflamasi saluran pernapasan.

Makrofag yang telah teraktivasi baik melalui akumulasi alergen di sel epitelial ataupun melalui MCP-1 kemudian akan melepaskan IL-12 dan IL-18 yang berperan dalam stimulasi Th0 untuk mengaktifasi Th2. Selain itu, Th2 yang teraktivasi juga akan melepaskan IL-4, IL-5, IL-9 dan IL-13. IL-4 dan IL-13 dapat menstimulasi sel B dalam memproduksi IgE. IgE yang terbentuk bersama dengan IL-9 akan mengaktifasi sel mast (Barnes, 2003; Killen & Skora, 2013). Sel mast yang teraktivasi akan melepaskan mediator inflamasi seperti histamin, leukotrien (C₄, D₄, dan E₄), serta prostaglandin D2. Ketiga mediator tersebut berperan sebagai bronkokonstriktor yang menimbulkan bronkokonstriksi saluran pernapasan. Hal

tersebut menyebabkan munculnya gejala pada penderita asma (Busse & Lemanske, 2006; Killeen & Skora, 2013; Maslan & Mims, 2014).



(Holgate & Polosa, 2006; Killeen & Skora, 2013)

Gambar 2.2. Faktor-faktor yang Menghambat Aliran Udara pada Asma Akut dan Persisten. Faktor-faktor yang mempengaruhi aliran udara pada asma akut dan persisten. GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor); IgE (imunoglobulin E); IL-13 (interleukin 13); Th (T helper); TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha).

Sementara itu, IL-5 yang teraktivasi akan bermigrasi ke sumsum tulang dan berperan dalam diferensiasi eosinofil. Greenfeder *et al* (2001) mengkonfirmasi terdapat peningkatan ekspresi gen IL-5 di limfosit pada biopsi bronkus pasien dengan asma simptomatis dan rinitis alergik (Greenfeder *et al*, 2001). Aktivasi eosinofil juga dapat dilakukan oleh otot polos yang berinteraksi dengan sitokin GM-CSF, serta kemokin RANTES, eotaxin dan MCP-4 melalui aktivasi reseptor CCR3 yang terletak di eosinofil. Eosinofil yang terbentuk berupa survival eosinofil yang dapat melepaskan mediator inflamasi untuk menciderai saluran pernapasan. Keberadaan survival eosinofil dapat bertahan lama akibat interaksi yang berulang dengan IL-5 dan GM-CSF sehingga menimbulkan inflamasi saluran napas

Repository Universitas Brawijaya
persisten dan hiperresponsif saluran napas (Barnes, 2003; Kasaian, et al, 2013; Killeen & Skora, 2013).
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Sitokin lainnya yang dilepaskan dari makrofag yang teraktivasi (IL-1 β , IL-6, dan TNF- α) dan sel epitelial (PDGF, FGF, EGF, dan IGF-1) memiliki peranan penting dalam memperkuat respon inflamasi yang menimbulkan reaksi inflamasi saluran pernapasan yang memicu asma. IL-1 β dan TNF- α secara bersama-sama membentuk *proinflammatory transcription factor, nuclear factor- κ B (NF- κ B)*, dan activator protein-1 (AP-1) yang akan mengaktifkan gen-gen inflamasi di saluran napas pada kondisi asma (Kay et al, 2004; Holgate, 2006).

IL-6, TNF- α , dan faktor pertumbuhan VEGF yang dilepaskan, dapat menstimulasi peningkatan jumlah pembuluh darah di saluran napas. Inflamasi terus menerus pada saluran pernapasan dapat menstimulasi kebocoran mikrovaskular. Kebocoran mikrovaskular yang terjadi mengakibatkan peningkatan sekresi saluran napas, gangguan fungsi mukosiliar, pembentukan mediator inflamasi baru dari prekursor plasma (kinin) dan terjadinya edema mukosa yang berkontribusi pada penyembitan saluran pernapasan dan hiperresponsif saluran pernapasan. Sementara itu, PDGF, FGF, EGF dan IGF-1 akan yang teraktivasi menstimulasi hipersekresi mukus, hiperplasia otot polos dan fibrosis paru (Barnes, 2003; Kay et al, 2004; Holgate, 2006).

2.1.4 Stres Oksidatif pada Asma

Keseimbangan (homeostasis) fungsi seluler selama stres oksidatif bergantung pada induksi yang tepat dari mekanisme pertahanan antioksidan. Antioksidan merupakan mekanisme pertahanan *in vivo* dan *in situ* dari sel terhadap ketidakseimbangan radikal bebas dan antioksidan (Mak, et al, 2006; Riedl et al, 2008). Antioksidan yang terbentuk berperan dalam perlindungan sel dan jaringan terhadap produksi spesies oksigen dan nitrogen reaktif yang berlangsung

selama terus-menerus selama proses metabolisme. *Disequilibrium* pada penurunan status pernapasan merupakan penentu tingkat keparahan asma

Antioksidan enzimatik yang utama terdapat di paru-paru adalah SOD, katalase, dan glutation peroksidase. Saat terjadinya asma, maka paru-paru mengalami penurunan aktivitas antioksidan. Hal tersebut didukung dengan beberapa penelitian yang menunjukkan adanya penurunan kadar antioksidan nonenzimatik dan enzimatik seperti glutation peroksidase, SOD pada anak-anak dengan asma. Selain itu, adanya penurunan yang signifikan dari asam amino yang berkontribusi dalam sintesis glutation, glisin dan glutamin pada anak dengan asma (Sahiner et al, 2011).

Tiga bentuk SOD (CuZn-SOD, Mn-SOD, dan EC-SOD) secara luas dinyatakan terletak di dalam paru-paru. Pada kondisi asma terjadi penurunan aktivitas dari tiga bentuk SOD baik di sel epitel paru, cairan paru, dan saluran pernapasan. Penurunan tersebut berhubungan dengan tingkat keparahan dari asma (Comhair *et al.*, 2005; Sahiner *et al.*, 2011). Tidak hanya penurunan SOD, kondisi asma juga menyebabkan penurunan katalase yang terjadi di cairan BAL. Seperti yang diketahui, katalase merupakan metaloprotein yang berperan sebagai scavenger bagi H₂O₂. Penurunan katalase sebagai akibat dari tekanan oksidatif yang terus menerus sehingga NADPH berikatan dengan enzim dan menstabilkan struktur serta melindungi katalase agar tidak teraktivasi (Ghosh *et al.*, 2003; Sahiner *et al.*, 2011).

Berbeda dengan SOD dan katalase yang mengalami penurunan pada kondisi asma, glutation peroksidase mengalami peningkatan di paru-paru. Sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan adanya peningkatan glutation pada kondensat napas yang dikeluarkan anak dengan asma (Comhair et al. 2000; Cerredji et al. 2003). Penurunan antikidien yang terjadi selempem

menyebabkan stress oksidatif yang berdampak merugikan pada fungsi saluran pernapasan penderita asma seperti kontraksi otot polos saluran pernapasan, menginduksi reaksi hiperresponsivitas saluran napas, hipersekresi mukus, dan eksudasi vaskular. Secara keseluruhan dampak tersebut akan menyebabkan peningkatan keparahan asma (Wood *et al.* 2003).

2.2 Partikel Debu Batu Bara

2.2.1 Definisi

Batu bara merupakan batuan sedimen mudah terbakar yang terbentuk dari bahan organik seperti sisa tumbuhan selama jutaan tahun yang dipengaruhi oleh adanya tekanan dan panas bumi. Batu bara merupakan bahan bakar fosil yang menjadi sumber energi paling banyak terdapat di dunia. Pada proses pertambangan akan terbentuk serpihan kecil dari batu bara yang disebut dengan partikel debu batu bara (Matzenbacher *et al.* 2016; Kania *et al.* 2014; Suhartono, 2016).

Partikel debu batu bara merupakan campuran bahan yang sangat kompleks dan heterogen, berasal dari senyawa yang terdapat pada batu bara. Partikel debu batu bara merupakan material batu bara yang berbentuk bubuk (Powder), yang berasal dari hancuran batu bara ketika pemrosesannya (*breaking, blending, transporting, and weathering*) (Huang & Finkelman, 2008; Matzenbacher *et al.*, 2016). Pada transportasi batu bara, partikel debu batu bara dihasilkan dari pergerakan batu bara di dalam bak truk pengangkut selama proses pengangkutan (Suhartono, 2016).



Gambar 2.3. Batu Bara dan Partikel Debu Batu Bara

2.2.2 Komposisi Kimia

Karbon merupakan senyawa utama penyusun struktur batu bara. Selain itu, baik batu bara maupun partikel debu batu bara tersusun dari campuran berbagai senyawa seperti oksigen, nitrogen, hidrogen, logam transisi (tembaga, nikel, kadmium, timbal, antimon, besi, boron, serta seng), kuarsa (*crystalline silica*), serta mineral dan berbagai elemen anorganik (kaolin, *pyrite*, titanium, kalsit, sulfur, natrium, dan magnesium) (Huertas *et al*, 2012; Matzenbacher *et al*, 2016).

Komposisi kandungan berbagai senyawa yang terdapat pada batu bara dan partikel batu bara akan berbeda-beda, sesuai dengan jenis dan asal dari tambang batu bara tersebut (Huang & Finkelman, 2008; Cohen *et al*, 2008).

Jenis dari batu bara menentukan jumlah komposisi karbon dan air yang terkandung di dalamnya. Sementara itu, jenis batu bara ditentukan berdasarkan proses pembentukannya (tekanan, panas dan waktu). Hasil dari proses pembentukan tersebut didapatkan beberapa jenis batu bara yaitu antrasit (senyawa karbon 86-98%), bituminous (senyawa karbon 68-86%), sub-bituminous (kandungan air mencapai 40%), dan lignit atau disebut batu bara coklat (kandungan air 35-75%) (Huang & Finkelman, 2008). Berdasarkan data Badan Geologi Indonesia, jenis batu bara (antrasit, bituminous, sub-bituminous dan lignit) terdapat di Indonesia yang tersebar di kepulauan Sumatera dan Kalimantan (Badan Geologi Indonesia, 2013).

Kania *et al* (2011) menunjukkan bahwa kandungan senyawa batu bara yang berasal dari tambang batu bara di daerah Kalimantan selatan memiliki komponen senyawa seperti mineral anorganik (besi 6,9%, silikon 17,9%, molibdenum 15%, aluminium 10%, kalsium 8,6%, sulfur 4,7%, titanium 3,65%). Selain itu, batu bara di daerah Kalimantan Selatan juga memiliki kandungan mineral lain yang kadarnya <1% seperti kalium 0,96%, mangan 0,53%, ytterbium 0,4%, chromium 0,34%, nikel 0,2% dan vanadium 0,16% (Kania *et al*, 2011).

Senyawa logam transisi yang terdapat pada batu bara dan partikel debu batu bara memiliki efek yang berbahaya bagi lingkungan (tanah, air, dan udara) dan bersifat karsinogenik bagi tubuh (Huang & Finkelman, 2008; Matzenbacher *et al*, 2016). Komponen besi yang banyak terdapat di permukaan partikel debu batu bara merupakan komponen FeS₂ yaitu besi berikatan dengan sulfur dalam bentuk pirit.

Huang *et al* (2005) menyimpulkan bahwa pirit yang terdapat pada batu bara merupakan faktor yang sangat signifikan terhadap prevalensi penyakit paru (pneumokinosis) pada pekerja tambang batu bara. Selain itu pada penelitian yang dilakukan juga menunjukkan bahwa kandungan fraksi besi total pada partikel debu batu bara dapat membentuk oksidan yang berperan dalam kerusakan paru (Huang *et al*, 2005). Sementara itu, Chon *et al* (2006) menyimpulkan bahwa semakin tinggi kandungan besi pada partikel debu batu bara maka semakin tinggi tingkat pneumokinosis yang dialami oleh pekerja tambang batu bara (Chon *et al*, 2006).

Castranova *et al* (2002) menunjukkan bahwa senyawa silika dan asbestos dapat menyebabkan kerusakan pada paru binatang model (Castranova *et al*, 2002). Sementara itu, reaktivitas permukaan silika yang berbentuk kristal atau dikenal dengan krital silika yang terdapat pada partikel debu batu bara jika terhirup maka berperan dalam patogenitas yang menginduksi penyakit paru (Zontek *et al*, 2017).

2.2.3 Stres Oksidatif Akibat Paparan Partikel Debu Batu Bara

Partikel debu batu bara yang terpapar secara inhalasi dalam waktu yang lama dapat menstimulasi produksi spesies oksigen reaktif. Mekanisme produksi spesies oksigen reaktif dari partikel debu batu bara dapat melalui dua mekanisme yaitu langsung dan tidak langsung. Partikel debu batu bara dapat menstimulasi produksi spesies oksigen reaktif secara langsung dengan melibatkan komponen aktif yang dimilikinya (Chon *et al*, 2006; Zou *et al*, 2011).

Logam transisi memiliki peranan penting dalam mekanisme langsung terbentuknya spesies oksigen reaktif. Hal tersebut terjadi karena beberapa senyawa dari logam transisi dapat mengkatalisis reaksi Fenton dalam menstimulasi terbentuknya senyawa oksigen reaktif. Besi (II) atau Fe (II) dapat membentuk radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) melalui reaksi fenton. Fe (II) akan bereaksi dengan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang terbentuk dari Fe (II) yang terletak di permukaan pyrite yang terdapat pada batu bara akan bereaksi dengan oksigen terlarut melalui reaksi Haber-Weiss (Borda *et al*, 2001; Cohn *et al*, 2005; Chon *et al*, 2006).

Senyawa lain dari golongan logam transisi yang terdapat pada batu bara dapat membentuk spesies oksigen reaktif seperti ferrit (FeIV=O) atau $\bullet\text{OH}$ (Huang & Finkelman, 2008). Silika yang terdapat pada bongkahan batu bara baru merupakan silika bentuk radikal yaitu $\bullet\text{SiO}$ dan $\bullet\text{Si}$. Radikal $\bullet\text{SiO}$ dan $\bullet\text{Si}$ dapat membentuk $\bullet\text{OH}$ saat berikatan dengan air. $\bullet\text{OH}$ yang terbentuk dan terakumulasi akan mendegradasi struktur sel yang menyebabkan pelepasan sel-sel serta mediator inflamasi secara terus menerus sehingga berdampak pada proses inflamasi dan menimbulkan kerusakan oksidatif lipid, protein dan DNA (Rohr *et al*, 2013; Zontek *et al*, 2017).



Tidak seperti mekanisme langsung, pada mekanisme tidak langsung dari partikel debu batu bara dalam pembentukan senyawa oksigen reaktif melibatkan aktivasi makrofag dan perekruit sel polimorfonuklear. Inhalasi Partikel debu batu bara yang masuk ke dalam saluran pernapasan secara terus menerus akan mengaktivasi makrofag yang kemudian akan memproduksi neutrofil dan akan mengaktivasi sel-sel inflamasi. Sel-sel inflamasi dilepaskan ke bagian target yaitu paru sehingga menyebabkan inflamasi kronik saluran pernapasan yang kemudian dapat menstimulasi terbentuknya produk spesies oksigen reaktif di saluran pernapasan bagian bawah (Wood *et al*, 2003; Altin *et al*, 2004; Sahiner *et al*, 2011). Partikel debu batu bara yang terinhalasi akan terakumulasi di epitelium alveolar yang kemudian akan di fagosit oleh makrofag alveolar dan selanjutnya akan melepaskan H_2O_2 dan $\bullet O_2$. H_2O_2 yang terbentuk akan dikatalisis oleh myeloperoksidase membentuk anion hipoklorit ($HOCl^-$) yang kemudian dapat bereaksi dengan gugus amino protein membentuk kloramin. Jika $HOCl^-$ terbentuk secara terus menerus dan kapasitas antioksidan endogen tidak mampu meredam produksi tersebut maka akan menyebabkan stres klorinatif (Suhartono, 2016; Setiawan *et al*, 2011). Sementara itu, H_2O_2 yang terbentuk akan mampu berikatan dengan logam transisi yang terdapat dari partikel debu batu bara dan membentuk $\bullet OH$ yang berlebihan baik pada *in vitro* dan *in vivo*. Radikal hidroksil yang terbentuk berlebihan akan mengurangi reaktivitas dari antioksidan sehingga memicu stres oksidatif (Altin *et al*, 2004; Lee *et al*, 2014).

Zimet *et al* (2016) menunjukkan bahwa terjadi stres oksidatif yang ditunjukkan dengan adanya peningkatan kadar 8-isoproston pada kondensat napas pekerja tambang batu bara setelah terpapar oleh partikel debu batu bara dalam melakukan pekerjaan selama 6 jam berturut-turut (Zimet *et al*, 2016). Guerrero-Castilla *et al* (2014) mengungkap bahwa dari hasil analisis mRNA hati

Repository Universitas Brawijaya
tikus yang berasal dari daerah sekitar tambang batu bara menunjukkan adanya

profil ekspresi gen yang terkait dengan stres oksidatif dan kerusakan DNA

(Guerrero-Castilla et al, 2014).

2.3 Marker Stres Oksidatif

Marker yang dapat digunakan untuk mengamati keadaan stres oksidatif antara lain adalah dengan pengukuran kadar antioksidan superokida dismutase (SOD) dan kadar 8-OHdG untuk melihat kerusakan DNA akibat kerusakan oksidatif (Ighodaro & Akinloye, 2017; Fenga et al, 2017).

2.3.1 Superoksid Dismutase (SOD)

Superoksid dismutase (SOD) merupakan enzim detoksifikasi pertama dan berperan sebagai antioksidan utama di dalam sel. Superoksid dismutase (SOD) adalah enzim yang secara mendasar berperan dalam mengkatalisis radikal superokida $\bullet\text{O}_2^-$ ke dalam bentuk molekul biasa oksigen (O_2) atau hidrogen peroksid (H_2O_2). H_2O_2 dari hasil detoksifikasi tersebut kemudian akan didegradasi oleh katalase agar tidak terakumulasi berlebihan yang dapat menimbulkan kerusakan sel. Oleh karena itu, SOD merupakan termasuk ke dalam komponen anti oksidan lini pertama saat terbentuk reaktif oksigen spesies dalam tubuh (Ighodaro & Akinloye, 2017; Lu et al, 2015).

Tingkat SOD yang menurun merupakan salah satu ciri adanya peningkatan jumlah radikal bebas dalam tubuh sehingga menimbulkan ketidakseimbangan antara antioksidan dan oksidan. Selain itu, hubungan antara rendahnya tingkat SOD dan sejumlah patologi penyakit (vaskular dan kardiovaskular, neurologis, peradangan, penyakit paru, dan lain-lain) telah diamati pada hewan dan manusia (Krishnamurthy et al, 2012; Ighodaro & Akinloye, 2017).

Dalam beberapa penelitian yang berkaitan dengan kondisi stres oksidatif, aktivitas SOD merupakan biomarker yang dapat dijadikan penanda adanya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

kondisi ketidakseimbangan oksidan dan antioksidan. Junior *et al* (2009) mengidentifikasi adanya kondisi stres oksidatif pada penambang batu bara di Brazil. Kondisi tersebut dibuktikan melalui biomarker stres oksidatif yang digunakan menunjukkan terdapat peningkatan TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substance*) dan penurunan aktivitas SOD pada plasma darah para penambang (Junior *et al*, 2009).

Pinho *et al* (2005) menganalisis adanya peningkatan SOD dan Katalase yang diikuti dengan penurunan TBARS cairan paru tikus setelah pemberian tretmen NAC (*N-acetylcysteine*) dan DFX (*Deferoxamine*) pada tikus yang dipaparkan dengan batu bara. SOD, katalase dan TBARS yang digunakan pada penelitian tersebut berfungsi sebagai penanda adanya kerusakan oksidatif pada paru tikus (Pinho *et al*, 2005). Sementara itu, Jarikre *et al* (2017) mengevaluasi adanya stres oksidatif pada binatang dengan pneumoni. Stres oksidatif dikonfirmasi melalui adanya penurunan kadar GSH dan aktivitas SOD yang dibarengi dengan peningkatan MDA, H_2O_2 dan MPO pada cairan BAL tikus pneumonia (Pinho *et al*, 2005).

2.3.2 8-OHdG (*8-hydroxy-deoxyguanosine*)

Radikal bebas dan spesies reaktif lainnya terus menerus dihasilkan secara *in vivo* dan menyebabkan kerusakan oksidatif pada biomolekul. Proses yang terus dijalankan hanya akan diawasi oleh beberapa sistem antioksidan dan perbaikan serta penggantian asam nukleat, protein dan lipid yang mengalami kerusakan.

DNA merupakan target serangan oksidatif yang paling penting secara biologis dan diperkirakan bahwa kerusakan oksidatif yang terus menerus terhadap DNA akan mengakibatkan kerusakan parah pada sekuen DNA. Kerusakan oksidatif DNA ditandai dengan pembentukan *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) (Loft & Moller, 2006; Fenga *et al*, 2017).

DNA terjadi secara fisiologis dan meningkat oleh adanya karsinogen. Secara khusus 8-OHdG adalah modifikasi dari basa DNA yang disebabkan oleh ROS yang menyerang radikal guanin. Ketika proses tersebut tidak diperbaiki, kerusakan ini akan melibatkan adanya mutagenisitas dan promosi kanker. Oleh karena itu, 8-OHdG merupakan indikator adanya kerusakan DNA oksidatif endogen yang bertujuan untuk mengevaluasi risiko kanker dan munculnya penyakit degeneratif (Valavanidis et al, 2009; Fenga et al, 2017).

Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa 8-OHdG dapat digunakan menjadi biomarker yang sesuai untuk kerusakan DNA akibat paparan kerja terhadap senyawa beracun. Pada kenyataannya pekerja yang terpapar benzena, Cr VI, hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH) atau nanopartikel menunjukkan adanya peningkatan kadar 8-OHdG pada urin. Kadar 8-OHdG pada urin dapat mewakili adanya salah satu lesi pada DNA yang paling banyak dipelajari dan merupakan biomarker yang dapat menunjukkan kerusakan DNA jangka pendek (Fenga et al, 2017).

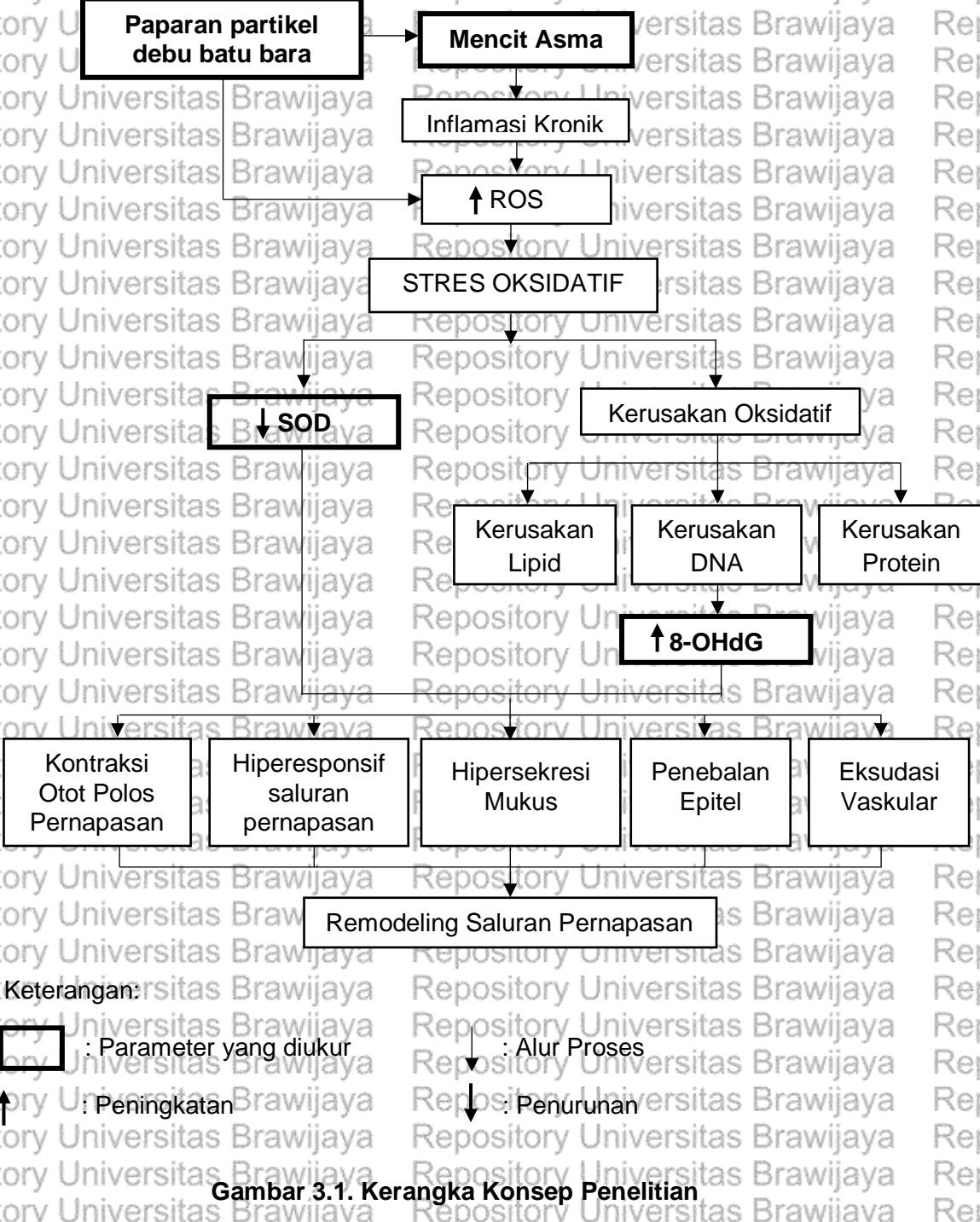
Li et al (2017) menunjukkan bahwa pemberian 1-Nitropyrene (1-NP) dengan dosis tinggi (1.6×10^4) secara instilasi intratrakeal selama 10 hari menyebabkan kerusakan DNA ditandai dengan putusnya rantai DNA dan peningkatan formasi 8-OHdG serta DPC pada paru tikus jantan jika dibandingkan dengan tikus kontrol. Dengan demikian, menunjukkan bahwa pemberian 1-NP dengan dosis tinggi memiliki efek genotoksik pada paru tikus jantan (Li et al, 2017). Yano et al (2009) mengemukakan bahwa adanya peningkatan kadar 8-OHdG pada urin pasien kanker paru yang merokok jika dibandingkan dengan pasien kanker paru yang tidak merokok. Pada penelitian tersebut, juga menunjukkan adanya hubungan yang positif antara perokok dengan peningkatan kadar 8-OHdG yang menjadi penanda terdapat kerusakan oksidatif DNA (Yano et al, 2009).



oksidatif DNA pada penelitian Lee *et al* (2010). Lee *et al* (2010) menjelaskan adanya peningkatan kadar 8-OHdG pada urine pekerja pabrik di Taiwan setelah terpapar polutan DEP2,5 (*Diesel Exhaust Particle*) selama 8 jam setiap hari jika dibandingkan dengan kelompok kontrol yaitu pekerja administrasi di tempat yang sama. Paparan DEP di sejumlah studi epidemiologi telah dikaitkan dengan dampak buruk bagi kesehatan seperti gangguan pada kardiopulmoner dan kanker paru (Lee *et al*, 2010; Hesterberg *et al*, 2009).

3.1 Kerangka Konsep

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS



Gambar 3.1. Kerangka Konsep Penelitian

Asma dapat memicu inflamasi kronik pada saluran pernapasan. Inflamasi yang timbul merupakan hasil interaksi kompleks dari berbagai sel dan mediatornya yang menyebabkan hiperresponsitas saluran pernapasan. Beberapa faktor risiko yang berperan dalam perkembangan asma diantaranya adalah faktor individu (peningkatan IgE, jenis kelamin, obesitas, ras, dan stres oksidatif) dan lingkungan (paparan alergen, polusi udara akibat asap kendaraan bermotor, asap pabrik, dan partikel debu batu bara).

Partikel debu batu bara yang terpapar terus menerus secara inhalasi pada penderita asma dapat meningkatkan derajat keparahan asma. Peningkatan derajat keparahan asma merupakan respon dari terbentuknya spesies oksigen reaktif endogen seiring dengan teraktivasinya sel-sel inflamasi saluran pernapasan dan terbentuknya spesies oksigen reaktif eksogen yang berasal dari kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam partikel debu batu bara. Produksi senyawa oksigen reaktif endogen dan eksogen yang berlangsung terus menerus dapat melebihi jumlah antioksidan tubuh yang disebut dengan kondisi stres oksidatif.

Stres oksidatif pada asma ditandai dengan menurunnya aktivitas antioksidan yang banyak terdapat di paru seperti superokida dismutase (SOD). Tidak hanya menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan SOD, stres oksidatif yang berlangsung terus menerus memicu terjadinya kerusakan oksidatif. Kerusakan oksidatif yang dapat terjadi salah satunya adalah kerusakan oksidatif DNA yang ditandai dengan meningkatnya kadar 8-OHdG. Penurunan aktivitas SOD dan peningkatan kerusakan oksidatif yang tidak teratasi menyebabkan dampak buruk pada saluran pernapasan penderita asma seperti kontraksi otot polos pernapasan, menginduksi reaksi hiperresponsitas saluran napas, hipersekresi mukus, penebalan epitel paru, dan eksudasi vaskular yang pada akhirnya memicu remodeling saluran pernapasan pada penderita asma.

3.2 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah paparan partikel debu batu bara menyebabkan penurunan aktivitas SOD dan kerusakan oksidatif DNA yang ditandai dengan peningkatan 8-OHdG serum pada mencit model asma.

4.1 Rancangan Penelitian

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni atau *true eksperimental* dengan menggunakan rancangan *post test only control group design* dengan teknik pengambilan sampel *simple random sampling*. Sampel yang digunakan akan dibagi menjadi empat kelompok, yaitu:

1. Kelompok kontrol yakni mencit yang disensitisasi NaCl secara intraperitoneal dan diberikan paparan inhalasi dengan nebulisasi NaCl 0,9% sebanyak 8ml.
 2. Kelompok batu bara yakni mencit yang diberi paparan partikel debu batu bara PM₅ 12,5mg/m³ melalui inhalasi.
 3. Kelompok OVA yakni mencit yang disensitisasi OVA melalui injeksi intraperitoneal dan diberi paparan inhalasi OVA 1% sebanyak 8ml yang diberikan 3 kali dalam seminggu selama 8 minggu.
 4. Kelompok OVA dan batu bara yakni mencit yang disensitisasi OVA melalui injeksi intraperitoneal dan diberi paparan inhalasi OVA 1% sebanyak 8ml yang diberikan 3 kali dalam seminggu selama 8 minggu, serta diberi paparan inhalasi partikel debu batu bara PM₅ 12,5mg/m³ selama 4 minggu.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Sentra Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus-Oktober 2018.

Repository Universitas Brawijaya
BAB 4 Repository Universitas Brawijaya

BAB 4

METODE PENELITIAN

penelitian eksperimental murni atau *true experiment*. Rancangan *post test only control group design* memerlukan sampel *simple random sampling*. Sampel yang diteliti dibagi ke dalam kelompok, yaitu:

- yang disensitisasi NaCl secara intraperitoneal dengan nebulisasi NaCl 0,9% sebanyak 8ml. ncit yang diberi paparan partikel debu batu malasi. t yang disensitisasi OVA melalui injeksi aran inhalasi OVA 1% sebanyak 8ml yang u selama 8 minggu.

yakni mencit yang disensitisasi OVA melalui ri paparan inhalasi OVA 1% sebanyak 8ml minggu selama 8 minggu, serta diberi paparan PM₅ 12,5mg/m³ selama 4 minggu.

baboratorium Farmakologi dan Laboratorium Keteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilakukan pada tahun 2018.

4.3 Material dan Instrumen Penelitian

4.3.1 Material Penelitian

Penelitian ini menggunakan 24 ekor mencit Balb/C dengan jenis kelamin betina. Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini didapatkan berdasarkan hasil dari perhitungan dengan menggunakan rumus Federer, yaitu (Federer, 1977):

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah replikasi

dengan demikian, jumlah sampel yang digunakan pada setiap kelompok pada penelitian ini adalah:

$$(t - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$3(n - 3) \geq 15$$

$$n \geq \frac{18}{3}$$

$$n \geq 6$$

Mencit Balb/C betina didapatkan dari induk *inbred* yang ada di Pusvetma

Surabaya. Induk *inbred* dipilih untuk menghomogenkan jenis tikus yang digunakan

dalam penelitian. Mencit Balb/C betina yang dapat dijadikan sampel dalam penelitian ini adalah mencit yang berusia 8-10 minggu (saat awal perlakuan), memiliki berat 20-30g, dan bebas dari penyakit.

4.3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini, adalah:

1. Alat penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain gunting jaringan, cirurgis, pinset, spoit 1ml, tabung serum, tabung eppendorf 1,5ml,

Repository Universitas Brawijaya
micropipet dan tip, kertas label, tabung reaksi, mesin *centrifuge*,
Repository Universitas Brawijaya

inkubator, spektrofotometer, *Pre-coated ELISA plate*, dan *Microplate*

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini untuk membuat model asma

adalah albumin yang berasal dari *Dried Egg White, crude* (nomor produk

AO198, TCI Chemical, India, Pvt. Ltd), bahan yang digunakan untuk

anestesi pada proses pembedahan pengambilan darah jantung adalah

ketamin 0,5mg/KgBB dan midazolam 0,5mg/KgBB. Sementara itu,

bahan lain yang digunakan pada penelitian ini adalah serum mencit,

selain itu bahan yang digunakan pada pemeriksaan SOD menggunakan

metode NBT yang sesuai dengan Bannister dan Calbrese adalah EDTA

10mM NBT 25mM xantine 25mM xantine oxidase (XO) 1 unit buffer

500 ul dan aquadest. Sementara itu, bahan yang digunakan untuk

Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya
pemeriksaan kerusakan DNA vaity anti-mouse 8-Hydroxy-

Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya
desoxyguanosine ELISA kit Cat No: E0187Mo /Bioscience Technology

Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya
(Laboratory Shanghai China)

Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya Repository | Universitas Brawijaya

label Penelitian Repository Universitas Brawijaya

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah paparan partikel debu batu bara

PM₅ 12.5mg/m³

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar SOD dan konsentrasi 8-

OHDc serum pada manusia model caco

4.5 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah:

1. Mencit model asma adalah mencit yang disensitisasi kronik OVA baik

secara intraperitoneal dan inhalasi yang ditandai dengan peningkatan

kadar IgE, reseptor IL-4, infiltrasi sel radang dan eosinofil, penebalan

epitel, hiperplasia sel goblet, dan penebalan sel otot polos saluran

pernapasan (Barlianto *et al.*, 2009).

2. Debu batu bara adalah partikel kecil dari batu bara yang berukuran

5 μ m hasil dari penggalian tambang batu bara, serta proses

pengangkutannya yang menyebabkan partikel-partikel tersebut

berterbang pada udara bebas (Kania *et al.*, 2012; Matzenbacher *et*

al., 2016).

3. Aktivitas Superoksida dismutase (SOD) adalah enzim yang diukur

secara tidak langsung berdasarkan kemampuannya dalam

menghambat reaksi antara $\bullet\text{O}_2$ dengan NBT. Reaksi ini diukur dengan

menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm.

Satuan aktivitas SOD dinyatakan dengan satuan unit (Bannister and

Calabrese, 1987; Cheng *et al.*, 2015).

4. 8-OHdG adalah modifikasi basa DNA yang terbentuk sebagai akibat

adanya serangan radikal guanin. Konsentrasi 8-OHdG diukur dengan

menggunakan metode ELISA dan pembacaan nilai *optical density*

dari konsentrasi 8-OHdG dilakukan dengan *microplate reader* pada

panjang gelombang 450 nm. Konsentrasi 8-OHdG dinyatakan dengan

satuan ng/ml (Tzortzaki *et al.*, 2012; Fenga *et al.*, 2017).

4.6 Metode Penelitian

4.6.1 Aklimatisasi

Mencit Balb/C betina yang digunakan dalam penelitian sebelum dilakukan

proses penelitian akan dilakukan aklimatisasi selama 7 hari. Aklimatisasi dilakukan

Saat aklimatisasi, mencit akan diberikan makanan dan minuman standar yang sesuai dengan standar laboratorium. Air minum diberikan secara *ad libitum* dengan metode tetes untuk menghindari kontaminasi dengan kotoran

4.6.2 Pembuatan Debu Batu bara

Pembuatan partikel debu batu bara dilakukan dengan mengikuti prosedur dari penelitian yang dilakukan oleh Kania *et al* tahun 2012. Bongkahan batu bara dengan berat 2kg dihancurkan dengan menggunakan alat khusus yang disebut *pulvarizer*. Alat ini terdiri dari *Ball Mill*, *Ring Mill*, dan *Raymond Mill*. Proses pembuatan partikel debu batu bara dilakukan di laboratorium *Carsurin Coal* Banjarmasin. Hasil dari proses tersebut didapatkan partikel batu bara yang berukuran 75 μm , dimana partikel tersebut akan disaring kembali menggunakan filter *Mesh MicroSieve* (BioDesign, Newyork, Ny, USA) berukuran 5 μm sehingga mendapatkan ukuran partikel debu batu bara 5 μm .

Konsentrasi partikel debu batu bara yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah 12,5 mg/m³. Konsentrasi tersebut didapatkan dengan cara menimbang partikel batu bara PM₅, menggunakan timbangan analitik di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Selain itu, konsentrasi tersebut didasarkan atas hasil studi pendahuluan yang dilakukan. Studi pendahuluan dalam menentukan konsentrasi partikel debu batu bara menggunakan tiga jenis konsentrasi yaitu 6,5 mg/m³, 12,5 mg/m³, dan 25 mg/m³.

Dari ketiga konsentrasi tersebut, konsentrasi partikel debu batu bara sebanyak 12,5 mg/m³ memberikan hasil yang lebih baik dalam memberikan gambaran terhadap hiperresponsif saluran pernapasan jika dibandingkan dengan dua konsentrasi lainnya.

4.6.3 Pembuatan Model Asma pada Mencit

Pembuatan model asma pada mencit dilakukan dengan menggunakan 2 cara yaitu sensitisasi OVA secara intraperitoneal dan inhalasi. Ovalbumin yang digunakan adalah albumin yang berasal dari *Dried Egg White, crude* (nomor produk AO198, TCI Chemical, India, Pvt. Ltd). Sensitisasi OVA yang diberikan sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Barlianto *et al* tahun 2009.

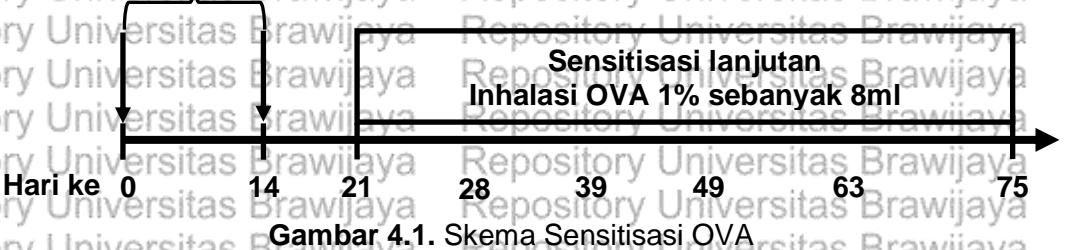
1. Sensitisasi OVA Intraperitoneal

Sensitasi OVA secara intraperitoneal merupakan sensitasi awal yang dilakukan. Proses ini dilakukan dengan cara meyuntikkan 10 μ g OVA dan 1mg Al(OH)₃ yang diencerkan dalam 0,5 ml normal saline (NaCl) 0,9%. Penyuntikan dilakukan pada hari ke-0 dan ke-14.

Sensitisasi Awal

OVA + Al(OH)₃

i.p



Gambar 4.1. Skema Sensitisasi OVA

2. Sensitisasi OVA Inhalasi

Sensitisasi OVA melalui inhalasi merupakan proses lanjutan yang

harus dilakukan setelah sensitasi OVA secara intraperitoneal. Sensitasi OVA secara inhalasi dilakukan dengan memberikan sebanyak 8ml OVA 1% dengan menggunakan Ultrasonik nebulizer

OMRON (tipe NE-U17, Konotsubo, Terado-cho, Muko, Kyoto, Japan).

Proses inhalasi melalui nebulisasi ini diberikan sebanyak 3 kali dalam

seminggu dengan durasi pemberian selama 20 menit setiap kali
pemberian melalui injeksi subkutan selama 8 minggu. Adanya isolat

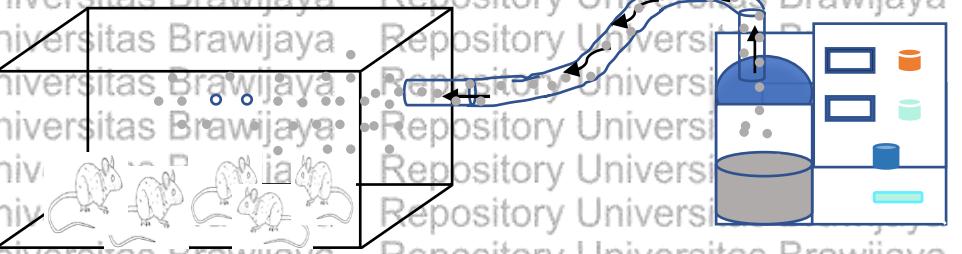
Pemberian hebulasi dan dilakukan selama 8 minggu. Adapun Jadwal

Repository Universitas Brawijaya ³⁰

Universitas Brawijaya Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
pemberian inhalasi dilakukan pada hari ke-21, 23, 25, 28, 30, 32, 35,
37, 39, 42, 44, 46, 49, 51, 53, 56, 58, 60, 63, 65, 68, 71, 73 dan 75.
Tahapan sensitisasi OVA secara inhalasi adalah sebagai berikut:

- a. Semua bagian nebulizer dibersihkan dengan alkohol, kemudian tunggu hingga kering.
- b. Bagian selang inhalasi dibersihkan dengan cara dilakukan irrigasi (pengaliran air) pada bagian dalam selang dengan menggunakan air steril, dan keringkan.
- c. Tabung humidifier dari nebulizer diisi dengan menggunakan air steril sampai batas dari pengisian yang tertera. Kemudian letakkan cangkir obat pada bagian atas humidifier.
- d. OVA 8ml dimasukkan pada cangkir obat, kemudian tutup bagian cangkir dengan penutup cangkir obat.
- e. Mencit dimasukkan ke dalam tempat khusus, kemudian tutup bagian atas tempat dengan penutup yang dirancang khusus yang memiliki lubang udara dan lubang tempat selang inhalasi.
- f. Selang inhalasi dipasang dibagian atas penutup cangkir obat, kemudian ujung selang lainnya dipasang pada lubang yang terdapat pada penutup tempat tikus berada. Pastikan selang inhalasi terpasang dengan tepat.
- g. Kabel listrik dari nebulizer disambung ke arus listrik, kemudian tombol ON ditekan. Pengatur waktu diatur ke angka 20, kemudian volume uap pada level 1, dan volume nebulisasi pada level 1. Setelah semua tetep tombol start ditekan.
- h. Setelah 20 menit, nebulizer dimatikan dan selang yang tersambung pada bagian tutup cangkir obat dan lubang penutup tempat tikus dilepas.



Gambar 4.2. Gambar Skematik Alat Inhalasi OVA

4.6.4 Paparan Debu Batu Bara

Paparan debu batu bara dilakukan selama 4 minggu. Paparan ini dilakukan dengan mengacu pada penelitian terdahulu oleh Kania *et al* (2012), paparan partikel debu batu bara dilakukan menggunakan alat khusus yaitu *coal dust exposure* yang dirancang oleh peneliti sebelumnya. Alat tersebut akan menyediakan lingkungan ambien yang mengandung partikel debu batu bara yang akan dihirup dan masuk ke dalam saluran pernapasan mencit. Aliran udara pada alat tersebut dikondisikan seperti aliran yang ada dilingkungan tambang batu bara, sehingga pada alat tersebut juga terdapat celah pada bagian dinding sebagai jalan keluar masuknya oksigen dari lingkungan sekitar. Hal tersebut bertujuan untuk mencegah hipoksia pada mencit selama proses paparan. Adapun proses pemaparan sebagai berikut:

1. Alat coal dust exposure dibersihkan menggunakan alkohol
2. Partikel debu batu bara $PM_5 12,5 \text{ mg/m}^3$ dimasukkan pada tempat yang tersedia pada alat.
3. Kelompok mencit yang akan dilakukan paparan dimasukkan dan bagian pintu dari coal dust exposure ditutup.
4. Kabel listrik dihubungkan ke arus listrik agar partikel debu batu bara bersirkulasi di dalam ruangan dari *coal dust exposure*.

4.6.5 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan darah jantung dilakukan secara *intracardiac* setelah proses paparan partikel batu bara dan sensitiasi OVA selesai. Prosedur pengambilan darah jantung sesuai dengan standar yang ada di laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya. Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam proses pengambilan darah dari jantung adalah:

1. Bagian abdomen didesinfeksi dengan alkohol 70%.
2. Mencit dianestesi dengan diinjeksi ketamin/xylazine 0,1 mL/20g secara intraperitoneal.
3. Mencit dibiarkan beberapa saat hingga terlihat lemah dan tidak sadar, kemudian pembedahan dilakukan.
4. Mencit diletakkan pada posisi pronasi di parafin blok, dengan bagian kaki difiksasi dengan jarum ke bagian parafin agar proses pembedahan mudah dilakukan.
5. Bagian abdomen hingga thorak diinsisi, kemudian bagian tulang iga mencit dibuka hingga terlihat bagian jantung.
6. Darah jantung diambil secara perlahan dengan Spuit 1ml agar tidak terjadi kerusakan dari darah sampel.
7. Darah yang berhasil diambil pada spuit kemudian dipindahkan kedalam tabung serum yang telah disiapkan dengan cara bagian jarum dilepas dan darah dialirkan melalui dinding tabung secara perlahan.
8. Mencit dipindah ketempat yang disediakan, dan dilakukan penguburan/pembakaran.

4.6.6 Isolasi Serum

Serum didapatkan dari hasil pemisahan komponen darah. Mekanisme pemisahan komponen darah dapat dilakukan dengan cara:

- Repository Universitas Brawijaya
1. Darah mecit yang ditampung pada tabung serum diletakkan dalam mesin sentrifuge.
2. Mesin sentrifuge diatur pada kecepatan 6.000rpm selama 10 menit dan pada suhu 4 °C.
3. Bagian tutup dari mesin sentrifuge ditutup dengan tepat kemudian tombol start ditekan.
4. Hasil dari sentrifugasi didapatkan adanya cairan bening dibagian atas tabung dan supernatan dibagian bawah tabung.
5. Cairan bening dibagian atas tabung diambil secara perlahan dan dipindahkan ke dalam tabung ependorf yang telah diberi label kelompok.
6. Serum disimpan di kulkas pendingin dengan suhu 20°C.

4.6.7 Pemeriksaan SOD

Pemeriksaan SOD bertujuan untuk melihat aktivitas antioksidan yang terdapat dalam serum sampel. Pemeriksaan ini menggunakan metode dari Bannister dan Calabrese yaitu dengan metode reaksi NBT. Adapun prosedur yang dilakukan pada pemeriksaan SOD adalah (Bannister and Calabrese, 1987):

1. Semua bahan yang digunakan disiapkan dan diletakkan pada suhu ruang.
2. Sampel sebanyak 100 μ l dimasukkan pada tabung reaksi yang telah diberikan label sesuai dengan nomor sampel.
3. EDTA 100 mM sebanyak 200 μ l ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi yang berisi serum sampel.
4. NBT 25 unit sebanyak 100 μ l ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi yang telah berisi serum sampel dan EDTA.
5. Xantine 25 mM sebanyak 100 μ l ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi yang telah berisi serum sampel, EDTA, dan NBT.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

6. Xantine oxidase 1 unit sebanyak 100 μ l ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi yang berisi serum sampel, EDTA, NBT, dan xantine kemudian campurkan hingga homogen.

7. Campuran tersebut diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 30 menit.

8. Buffer sebanyak 500 μ l dan aquadest ditambahkan pada masing-masing tabung reaksi hingga larutan pada tabung mencapai 3ml.

9. Larutan tersebut dianalisis atau dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis (UV-1700, Shimadzu, Kyoto, Japan) pada panjang gelombang 580nm.

4.6.8 Pemeriksaan 8-OHdG

Pemeriksaan ELISA dilakukan untuk mengukur kadar 8-OHdG sebagai penanda adanya kerusakan DNA. Pemeriksaan 8-OHdG menggunakan ELISA kit mouse 8-Hydroxy-desoxyguanosine Cat.No. E0187Mo (*Bioassay Technology Laboratory*, Shanghai, China). Adapun prosedur pemeriksaan ELISA untuk mengukur kadar 8-OHdG adalah:

1. Semua reagen yang akan digunakan disiapkan dan diletakkan pada suhu ruang.

2. Well pre-coated ELISA diletakkan pada frame.

3. Standar solution 50 μ l ditambahkan pada well standar.

4. Serum sampel sebanyak 40 μ l ditambahkan pada well sampel.

5. Antibodi anti 8-OHdG 10 μ l dan streptavidin-HRP 50 μ l ditambahkan pada masing-masing well sampel dan well standar. Kemudian campuran larutan pada plate dishaker secara perlahan dan ditutup menggunakan sealer yang disediakan, kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C.

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

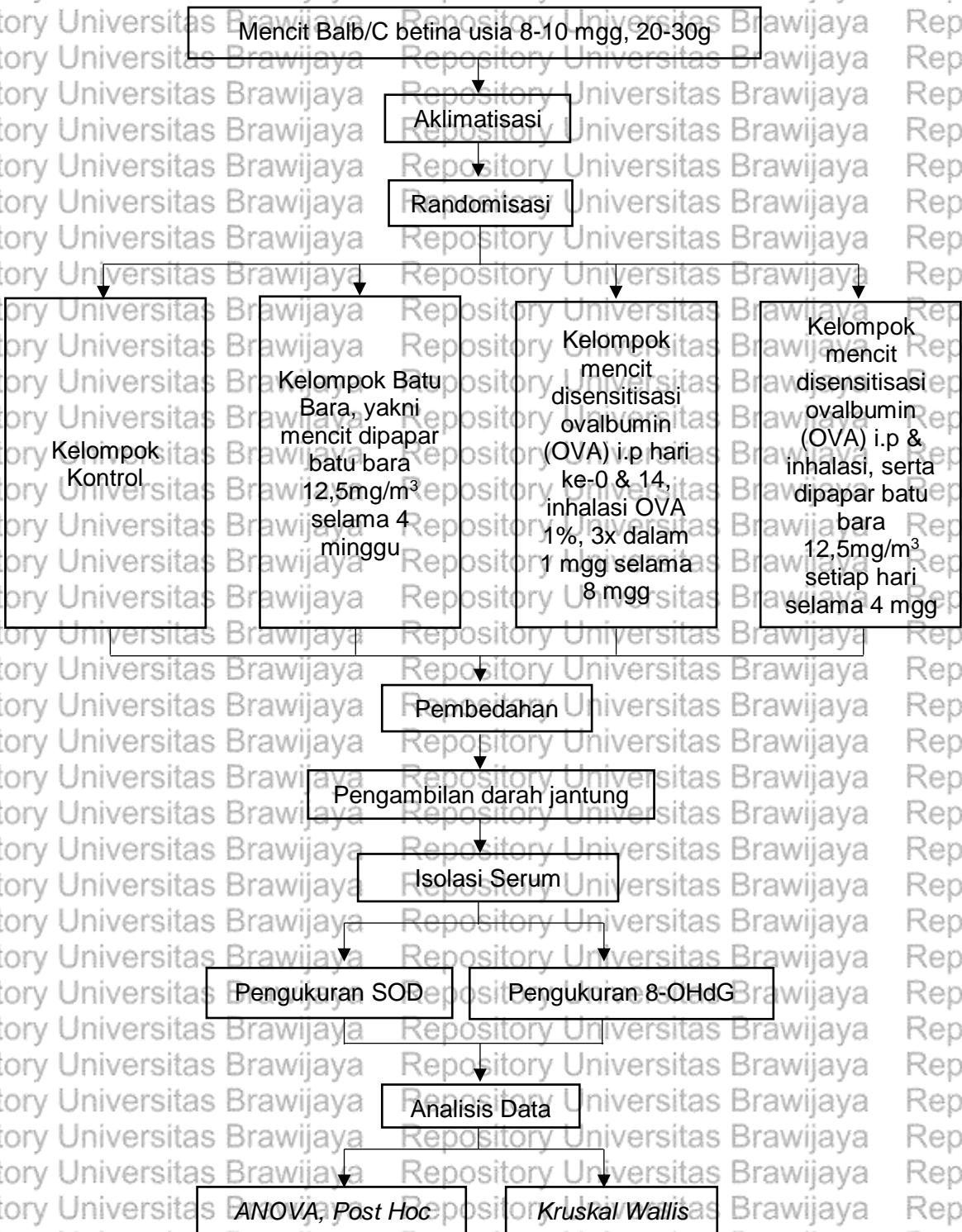
- Repository Universitas Brawijaya
6. Sealer dilepas dan well dicuci sebanyak 5 kali menggunakan wash buffer. Proses pencucian dilakukan dengan cara 0.35ml wash buffer ditambahkan pada well sampel dan well standar selama 30 detik dan dilakukan pencucian sebanyak 5 kali. Well dikeringkan dengan tisu.
7. Substrat solution A 50 μ l dan substrat solution B 50 μ l ditambahkan pada masing-masing well sampel dan standar. Kemudian ditutup menggunakan sealer dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C pada ruang gelap.
8. Campuran larutan akan menjadi warna biru, kemudian 50 μ l stop solution ditambahkan, sehingga warna biru akan berubah menjadi kuning.
9. Larutan dianalisis dengan pemeriksaan optical density (OD) menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 450nm.

4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan tabulasi data untuk mendapatkan angka rata-rata (mean) dari kadar SOD dan 8-OHdG pada setiap kelompok. Kemudian dilakukan uji normalitas dan homogenitas data menggunakan uji Shapiro-Wilk dan Levene's test. Jika data berdistribusi normal dan bersifat homogen maka dapat dilakukan uji statistik menggunakan uji ANOVA, tetapi jika data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen maka dilakukan uji statistik menggunakan uji Kruskal-Wallis. Derajat kepercayaan yang digunakan pada uji ini adalah 95% untuk mengetahui perbandingan rerata kadar SOD dan 8-OHdG dari masing-masing kelompok. Jika dari hasil uji ANOVA didapatkan perbedaan aktivitas SOD dan 8-OHdG dari masing-masing kelompok, maka uji dilanjutkan dengan melakukan uji post hoc untuk menilai signifikansi perbedaan dari masing-masing kelompok.

4.8 Alur penelitian

Penelitian akan dilaksanakan dengan tahapan sebagai berikut:



Gambar 4.3. Skema Alur Penelitian

Repository Universitas Brawijaya

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan sejak bulan Agustus hingga Oktober 2018 dengan

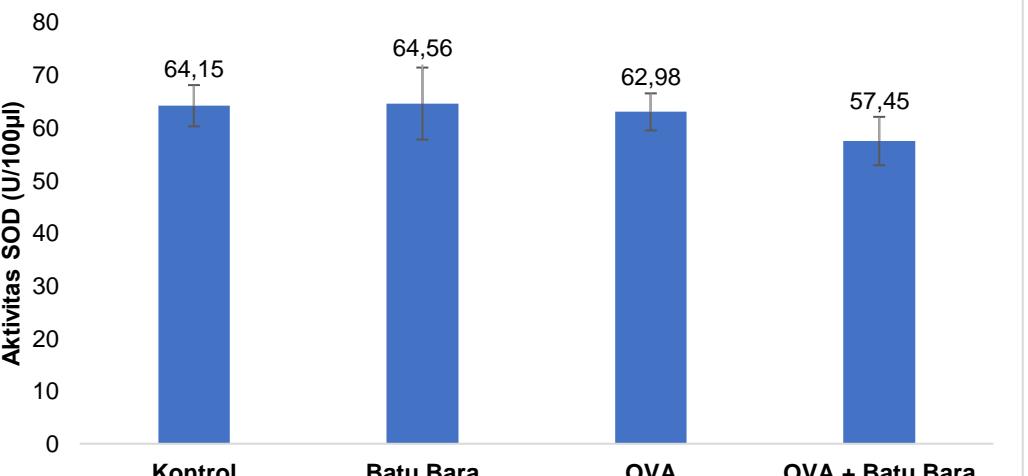
jumlah sampel sebanyak 24 ekor mencit balb/c betina berusia 8-10 minggu.

Setelah pemberian sensitisasi OVA selama 8 minggu dan paparan partikel debu batu bara selama 4 minggu didapatkan hasil sebagai berikut:

5.1. Aktivitas SOD Serum

Aktivitas SOD serum yang diperiksa menggunakan metode NBT diperoleh

hasil berupa nilai rerata dari masing-masing kelompok. Hasil tersebut disajikan pada gambar 5.1.



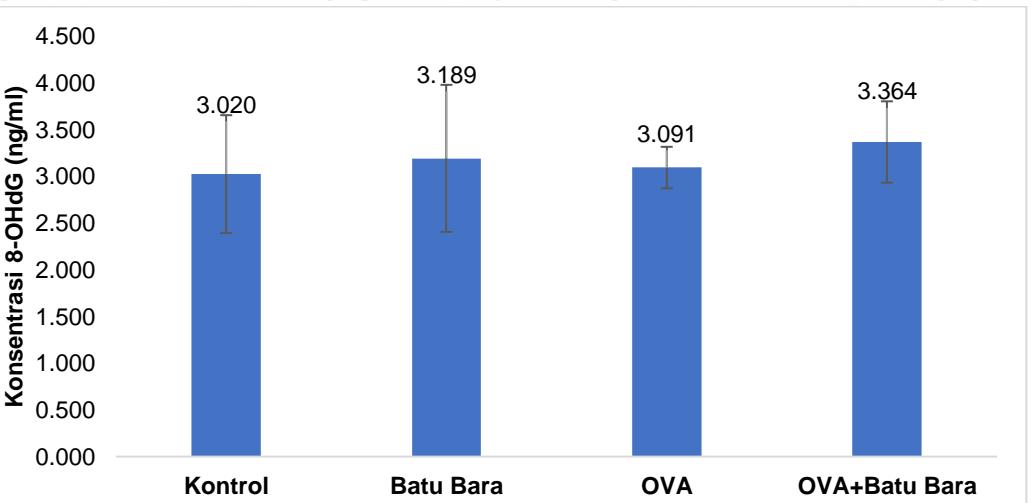
Gambar 5.1. Aktivitas SOD Serum pada Mencit Balb/C Betina.

Nilai rerata Aktivitas SOD serum pada gambar 5.1 menunjukkan bahwa aktivitas SOD serum paling rendah ditunjukkan pada kelompok mencit yang disensitisasi OVA dan diberi paparan debu batu bara yaitu sebesar 57,45 U/100µl jika dibandingkan dengan kelompok mencit yang disensitisasi OVA (62,98 U/100µl) dan kelompok kontrol (64,56 U/100µl). Sementara itu, kelompok mencit

Repository

5.2. Konsentrasi 8-OHdG Serum

Rerata konsentrasi 8-OHdG serum pada setiap kelompok yang diperoleh dari hasil penelitian disajikan pada gambar 5.2.



Gambar 5.2. Konsentrasi 8-OHdG Serum pada Mencit Balb/c Betina

Gambar 5.2 menunjukkan bahwa konsentrasi 8-OHdG paling tinggi ditunjukkan oleh kelompok mencit yang disensitisasi OVA dan diberi paparan partikel debu batu bara yaitu sebesar 3,364 ng/ml jika dibandingkan dengan kelompok mencit yang hanya diberi paparan debu batu bara, OVA, dan kelompok kontrol (3,189 ng/ml, 3,091 ng/ml, dan 3,020 ng/ml secara berurutan).

Hasil uji normalitas dan homogenitas diperoleh data berdistribusi normal ($p>0,05$) dan tidak homogen ($p<0,05$). Dengan demikian, konsentrasi 8-OHdG

serum dianalisis menggunakan uji non parametrik *Kruskal Wallis* dan diperoleh nilai $p=0,571$ ($p>0,05$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan konsentrasi 8-OHdG serum yang signifikan dari masing-masing kelompok.

5.3. Analisis Korelasi Aktivitas SOD dan Konsentrasi 8-OHdG Serum

Tabel 5.1. Korelasi Aktivitas SOD dan Konsentrasi 8-OHdG Serum Mencit Model Asma

SOD	8-OHdG
r	0,156
p	0,466
n	24

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa tidak terdapat korelasi yang bermakna antara aktivitas SOD dengan konsentrasi 8-OHdG serum ($p=0,466$). Nilai korelasi *Spearman's rho* sebesar -0,156 menunjukkan bahwa arah hubungan negatif dengan kekuatan korelasi sangat lemah.

PEMBAHASAN

Sensitasi OVA dan paparan partikel debu batu bara PM₅ dapat menimbulkan efek negatif pada saluran pernapasan. Sensitasi OVA diketahui dapat menyebabkan inflamasi dan hipereaktivitas saluran pernapasan (Ma *et al*, 2016; Sethi *et al*, 2018). Sementara itu, paparan debu batu bara PM₅ dapat memperparah kondisi hipereaktivitas saluran pernapasan, inflamasi dan memungkinkan terjadinya reaksi redoks (Rohr *et al*, 2013; Zontek *et al*, 2017). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek paparan partikel debu batu bara terhadap penurunan aktivitas SOD dan kerusakan oksidatif DNA yang ditandai oleh peningkatan 8-OHdG serum pada mencit model asma.

Sensitasi OVA yang diberikan pada mencit dalam penelitian Fujjati (2018) menunjukkan adanya peningkatan signifikan kadar IL-13 pada cairan BAL, serta peningkatan signifikan jumlah eosinofil dan sel goblet jaringan paru mencit jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (Fujjati, 2018). Hal tersebut menunjukkan bahwa mencit yang disensitasi OVA selama 8 minggu mengalami inflamasi dan remodeling saluran pernapasan (gejala asma) seperti yang terjadi pada manusia.

Hasil penelitian lain menyebutkan bahwa OVA merupakan salah satu jenis alergen yang secara luas dapat menstimulasi gejala seperti asma pada model eksperimental (Zosky *et al*, 2007; Bates *et al*, 2009; Kumar *et al*, 2008). Induksi OVA menyebabkan aktivasi Thelper II (Th2) yang berasal dari aktivasi sitokin dalam bentuk interleukin (IL-4, IL-5 dan IL-13) yang kemudian menstimulasi aktivasi sel-sel inflamasi, peningkatan produksi mucus, bronkokonstriksi saluran napas, dan remodeling saluran pernapasan (Kumar *et al*, 2008; Rael *et al*, 2011; Gour *et al*, 2015; Ma *et al*, 2016; Sethi *et al*, 2018). Barlianto *et al* (2009)

mengidentifikasi adanya reaksi alergi, respon inflamasi dan remodeling saluran

pernapasan yang masing-masing ditandai oleh peningkatan kadar IgE dan ekspresi IL-4, peningkatan jumlah sel radang dan eosinofil, serta penebalan epitel, hiperplasia sel goblet dan penebalan sel otot polos pernapasan pada mencit yang disensitisasi OVA selama 6 minggu (Barlianto *et al*, 2009).

6.1. Aktivitas SOD Serum

Pada penelitian ini, terdapat peningkatan aktivitas SOD serum pada kelompok mencit yang diberi paparan partikel debu batu bara PM₅ 12,5 mg/m³ selama 4 minggu jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan ini diduga berhubungan dengan banyaknya jumlah produksi ROS yang dihasilkan dan mekanisme kompensasi tubuh terhadap adanya radikal bebas yang terbentuk. ROS dapat dihasilkan secara langsung dari kandungan debu batu bara dan secara tidak langsung melalui aktivasi mediator dan sel-sel inflamasi seperti TNF- α dari aktivasi IL-13, serta makrofag alveolar (Sahiner *et al*, 2011; Rohr *et al*, 2013; Zontek *et al*, 2017; Bishopp *et al*, 2017). Banyaknya jumlah ROS yang diproduksi melalui kedua mekanisme tersebut dipengaruhi oleh lama waktu paparan dan dosis partikel debu batu bara yang diberikan (Bayersmann *et al*; 2008; Yuan *et al*, 2012).

Dosis batu bara yang diberikan akan menentukan jumlah komponen senyawa anorganik (aluminium, kromium, nikel, mangans, vanadium) dan logam transisi yang terakumulasi di saluran pernapasan. Senyawa-senyawa tersebut akan menstimulasi produksi •OH melalui reaksi Fenton yang akan menyebabkan reaksi oksidasi. Sementara itu, lama paparan debu batu bara dapat mempengaruhi jumlah ROS (•OH) yang dihasilkan. Radikal •OH yang dihasilkan akan dapat merusak protein dari enzim sehingga mempengaruhi aktivitas SOD (Bayersmann *et al*; 2008; Yuan *et al*, 2012; Matough *et al*, 2012; Lu *et al*, 2015).

Repository Universitas Brawijaya Sementara itu, pada kelompok mencit yang disensitisasi OVA selama 8 minggu didapatkan penurunan aktivitas SOD serum jika dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini disebabkan oleh karena sensitisasi OVA dapat mengaktifasi IL-13 dan IL-4 yang kemudian akan meningkatkan produksi ROS ($\bullet\text{O}_2$). Molekul $\bullet\text{O}_2$ yang dihasilkan akan menstimulasi pelepasan antioksidan endogen (SOD) untuk merubah $\bullet\text{O}_2$ menjadi H_2O_2 sebagai mekanisme pertahanan tubuh. Proses konversi tersebut akan menyebabkan penurunan aktivitas SOD (Byers *et al*, 2012; Barlow *et al*, 2013). Penurunan aktivitas SOD serum merupakan salah satu ciri banyaknya produksi ROS yang dihasilkan (Lu *et al*, 2015; Igħodaro *et al*, 2017). Diperkuat dengan penelitian Dickinson *et al* (2018) yang menjelaskan bahwa terdapat peningkatan radikal superoksida dari hasil aktivasi IL-13 dan IL-4 yang dilikuti dengan penurunan aktivitas SOD1 (Dickinson *et al*, 2018).

Hasil yang sama ditunjukkan pada kelompok mencit yang disensitisasi OVA dan diberi paparan partikel debu batu bara yaitu terdapat penurunan aktivitas SOD serum jika dibandingkan dengan kelompok lainnya. Meski demikian, secara statistik penurunan aktivitas SOD tersebut tidak berbeda secara signifikan. Hal ini diduga berhubungan dengan lamanya waktu sensitasi OVA 8 minggu belum mampu menimbulkan reaksi inflamasi alergik secara sistemik, serta paparan partikel debu batu bara 4 minggu belum mampu menimbulkan akumulasi produksi ROS di sistemik.

Hasil penelitian ini sesuai dengan beberapa hasil penelitian lainnya yang menyatakan bahwa tikus yang diinduksi OVA menunjukkan peningkatan mediator inflamasi pada jaringan paru dan cairan brokoalveolar, tetapi tidak menunjukkan peningkatan mediator inflamasi pada serum. Pada penelitian tersebut juga menyebutkan bahwa pelepasan mediator inflamasi dan sel-sel inflamasi

Repository Universitas Brawijaya
dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya lamanya paparan alergen yang

diberikan serta keparahan dari penyakit (Ma *et al*, 2016; Fallahi *et al*, 2016;
Kianmehr *et al*, 2016; Hasegawa *et al*, 2017).

Lama paparan alergen dan keparahan dari penyakit dapat menentukan area dari infiltrasi sel-sel dan mediator inflamasi. Paparan akut dan sub kronik hanya menimbulkan pelepasan sel-sel dan mediator inflamasi pada area perivaskular dan belum menyebabkan kerusakan endotel yang menimbulkan kebocoran ke daerah vaskular (Locke *et al*, 2007; Kianmehr *et al*, 2016). Hal ini diperkuat dengan penelitian Cai *et al* (2016) yang mengidentifikasi bahwa konsentrasi IL-13 serum akan mengalami peningkatan yang signifikan pada kondisi asma berat (Cai *et al*,

2016). Penelitian lainnya oleh Joseph *et al* (2004) yang menunjukkan bahwa konsentrasi IL-13 serum mengalami peningkatan yang signifikan ketika proses

inflamasi terjadi pada kondisi kronik persisten menahun (Joseph *et al*, 2004). Pada penelitian ini, sensitisasi OVA diberikan selama 8 minggu dan memperoleh hasil yang searah dengan kadar IL-13 serum (data tidak ditampilkan), bahwa tidak terdapat peningkatan yang signifikan kadar IL-13 serum pada kelompok mencit yang disensitisasi OVA dan paparan partikel debu batu bara jika dibandingkan dengan kelompok lainnya.

Proses inflamasi asma alergik pada penelitian ini belum terjadi secara sistemik serta lama waktu paparan dan dosis batu bara belum mampu menyebabkan akumulasi konsentrasi IL-13 dan produksi ROS ($\bullet\text{OH}$ dan $\bullet\text{O}_2$) di serum, sehingga mempengaruhi aktivitas SOD serum. Mekanisme ini diperkuat dengan hasil penelitian Bajpai *et al* (2017), yang menjelaskan bahwa proses inflamasi berulang dan berlangsung lama pada COPD menyebabkan penurunan yang signifikan pada SOD serum jika dibandingkan dengan kelompok sehat (Bajpai *et al*, 2017). Selain itu, Kaur *et al* (2013) mengidentifikasi paparan debu

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

6.2. Konsentrasi 8-OHdG Serum

Kerusakan oksidatif yang sering diamati adalah kerusakan oksidatif lipid yang ditandai oleh peningkatan MDA dan kerusakan oksidatif DNA yang ditandai oleh peningkatan konsentrasi 8-OHdG (Cho *et al.*, 2010; Fenga *et al.*, 2017). Hasil dari penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi 8-OHdG serum pada kelompok mencit yang diberi paparan partikel debu batu bara jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok yang disensitisasi OVA. Peningkatan tersebut sebagai akibat dari kemampuan senyawa yang terkandung pada batu bara dalam memproduksi ROS melalui 2 mekanisme baik secara langsung maupun tidak langsung melalui mekanisme inflamasi. Senyawa seperti Fe akan menghasilkan $\bullet\text{OH}$ melalui reaksi Fenton, yang akan menstimulasi peningkatan produksi ROS dan menyebabkan kerusakan oksidatif DNA (Chon *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2011). Selain itu, PAH yang terdapat pada batu bara menimbulkan lesi pada basa DNA sehingga menghambat mekanisme DNA repair oleh protein DNA repair (Rad51 dan Ku70) (Chan *et al.*, 2016; Matzenbacher *et al.*, 2016). Hal ini juga diperkuat dengan hasil penelitian Matzenbancher *et al* (2016) yang menjelaskan bahwa senyawa PAH yang terdapat pada debu batu bara PM₁₀ menyebabkan peningkatan kerusakan oksidatif DNA di PBMC dari individu yang terpapar debu batu bara (Matzenbacher *et al.*, 2016).

Hasil penelitian ini menyebutkan bahwa terdapat peningkatan konsentrasi 8-OHdG pada kelompok yang disensitisasi OVA jika dibandingkan dengan kontrol.

Peningkatan ini disebabkan adanya aktivasi dari IL-13 yang merupakan sitokin inflamasi yang akan menstimulasi aktivasi STAT6, kemudian menginduksi pelepasan eosinofil, sel mast, limfosit B, fibroblas, dan sel-sel inflamasi lain pada model mectis asma alergik. Selain itu, aktivasi IL-13 dapat meningkatkan produksi ROS ($\bullet\text{O}_2$) yang menyebabkan kerusakan oksidatif, serta dapat berinteraksi langsung dengan DNA sehingga menimbulkan modifikasi pada basa DNA (8-hydroxydeoxyguanosine) dan menginduksi kerusakan rantai DNA (Medoff *et al.*, 2008; Munitz *et al.*, 2008; Akdis *et al.*, 2011; Gou *et al.*, 2015). Sejalan dengan penelitian Chapman *et al* (2014) yang mengidentifikasi adanya over ekspresi IL-13 menyebabkan kerusakan oksidatif DNA yang ditandai oleh peningkatan 8-oxoguanine pada tikus transgenik asma alergik (Chapman *et al.*, 2014).

Disisi lain, peningkatan yang lebih tinggi dari konsentrasi 8-OHDG ditunjukkan pada kelompok mectis yang disensitisasi OVA dan diberi paparan partikel debu batu bara jika dibandingkan dengan kelompok lainnya. Secara statistik, peningkatan konsentrasi 8-OHDG tersebut tidak berbeda secara signifikan pada masing-masing kelompok. Hasil tersebut, tidak berbeda jauh dengan hasil IL-13 dan aktivitas SOD serum yang diperoleh. Hal ini mungkin terkait dengan lamanya waktu paparan dan dosis debu batu bara, serta proses inflamasi belum mampu menyebabkan jumlah ROS yang diproduksi menimbulkan stres oksidatif yang memicu terjadinya kerusakan oksidatif secara sistemik.

Chapman *et al* (2014) dan Aguirre *et al* (2017) menjelaskan peningkatan reaksi inflamasi alergik saluran pernapasan menyebabkan peningkatan kerusakan oksidatif DNA di jaringan paru dan cairan BAL tikus yang diinduksi akut alergen, dan terdapat kerusakan oksidatif DNA yang ditandai dengan peningkatan 8-oxoG saat proses inflamasi sudah terjadi secara kronik persisten (Chapman *et al*, 2014; Aguirre *et al*, 2017). Tidak hanya reaksi inflamasi, lamanya waktu paparan batu

seluler. Beberapa penelitian lain telah menjelaskan bahwa paparan akut debu batu bara menyebabkan kerusakan membran seluler dengan peningkatan kadar MDA dan akumulasi H_2O_2 tetapi tidak diikuti dengan peningkatan kerusakan oksidatif DNA (Ricardo *et al.*, 2004; Bayermann *et al.*, 2008; Jomova *et al.*, 2011).

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Kania *et al* (2011) menjelaskan bahwa paparan batu bara selama 14 hari belum mampu meningkatkan MDA serum, tetapi menyebabkan peningkatan yang signifikan dari MDA jaringan paru dan cairan bronkoalveolar tikus (Kania *et al*, 2011). Hasil berbeda dijelaskan pada penelitian Armutcu *et al.* (2007) yang mengidentifikasi adanya peningkatan konsentrasi MDA serum pada tikus yang diberikan paparan debu batu bara selama 14 hari (24 jam perhari) (Armutcu *et al.*, 2007). Perbedaan tersebut terjadi karena dosis yang diberikan pada penelitian ini adalah $12,5 \text{ mg/m}^3/\text{jam/hari}$.

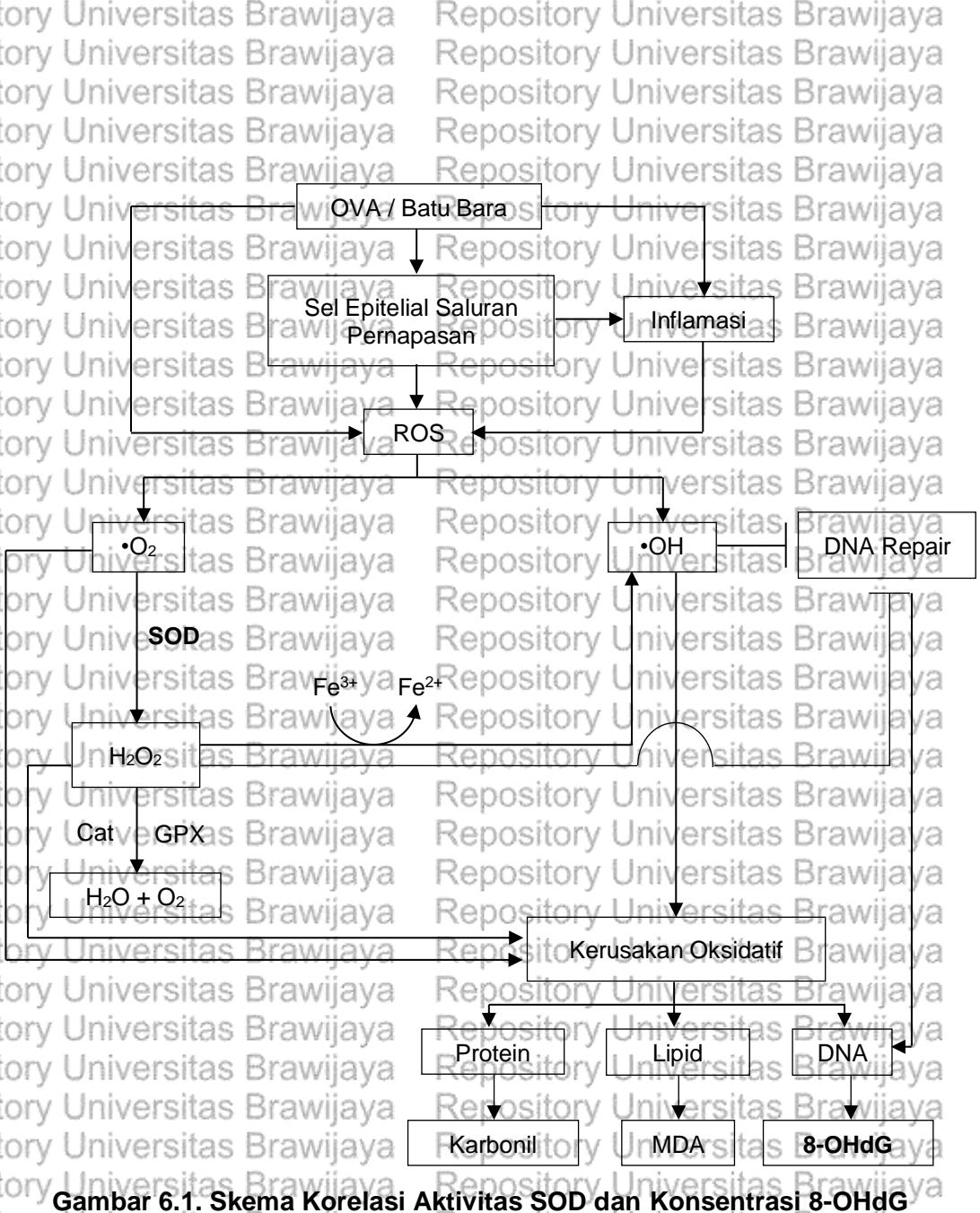
6.3. Korelasi Aktivitas SOD dan Konsentrasi 8-OHdG Serum

Hasil uji korelasi menunjukkan terdapat korelasi sangat lemah negatif dan tidak signifikan antara aktivitas SOD dan konsentrasi 8-OHdG serum. Hal tersebut menjelaskan bahwa terdapat hubungan yang berkebalikan, yakni jika terjadi penurunan aktivitas SOD maka konsentrasi 8-OHdG mengalami peningkatan dan sebaliknya. Hasil ini didukung oleh penelitian lain yang menjelaskan adanya peningkatan kerusakan oksidatif yang diikuti dengan penurunan aktivitas antioksidan (SOD) pada paru tikus (Park *et al*, 2009). Korelasi antara aktivitas SOD dan 8-OHdG disajikan pada bagan

6.1

Aktivitas SOD ditentukan dari banyaknya produk radikal yang dihasilkan di dalam tubuh. Studi *in vivo* dan *in vitro* menjelaskan bahwa nano partikel dan particulate matter menyebabkan reaksi inflamasi dan stimulasi produksi ROS. Akumulasi alergen dan polutan udara di sel epitelial saluran pernapasan menyebabkan aktivasi makrofag alveolar dan sitokin inflamasi yang menstimulasi proses inflamasi dan produksi ROS (Li *et al.*, 2008; Liou *et al.*, 2017). ROS yang terbentuk pada reaksi alergi akibat alergen dan polutan berupa senyawa radikal ($\cdot O_2$ dan $\cdot OH$) yang akan direspon tubuh untuk mengaktifasi antioksidan endogen

48



lini pertama yaitu SOD untuk mendegradasi produk tersebut menjadi senyawa non radikal seperti O_2^- dan H_2O_2 (Bayersmann *et al.*; 2008; Byers *et al.*, 2012). Antioksidan enzimatik (SOD) merupakan produk enzim yang berperan sebagai *scavanger* radikal bebas (Kaya *et al.*, 2012). Sehingga semakin banyak jumlah ROS yang terbentuk, maka tubuh akan menstimulasi SOD untuk menetralisir reaksi oksidasi, kemudian menyebabkan penurunan aktivitas SOD (Matough *et al.*, 2012; Barlow *et al.*, 2013). Penurunan aktivitas SOD mengakibatkan peningkatan produksi ROS yang menyebabkan stres oksidatif dan jika dibiarkan dapat menimbulkan kerusakan oksidatif baik pada lipid, protein maupun DNA (Cho *et al.*, 2010). Kerusakan oksidatif DNA merupakan salah satu akibat dari banyaknya radikal ($\bullet O_2^-$ dan $\bullet OH$) yang sangat reaktif dan dapat berinteraksi langsung dengan memodifikasi basa DNA, serta dipengaruhi oleh keparahan stres oksidatif (Westbrook *et al.*, 2009; Matzenbacher *et al.*, 2016). Dittmar *et al* (2008) dan Chan *et al* (2016) menjelaskan bahwa semakin rendah aktivitas SOD maka semakin tinggi kerusakan oksidatif DNA yang ditandai dengan peningkatan kadar 8-OHdG pada paru tikus dengan alergik pernapasan (Dittmar *et al*, 2008; Chan *et al*, 2016).



7.1 Kesimpulan

1. Paparan partikel debu batu bara pada mencit model asma dapat menurunkan aktivitas SOD serum namun tidak bermakna.
2. Terdapat kerusakan oksidatif DNA yang ditandai dengan peningkatan 8-OHdG serum pada mencit model asma yang diberi paparan partikel debu batu bara namun peningkatan tersebut tidak bermakna.
3. Terdapat korelasi negatif lemah antara aktivitas SOD serum dengan 8-OHdG serum pada mencit model asma namun tidak bermakna.
4. Paparan partikel debu batu bara selama 4 minggu belum mampu menyebabkan penurunan aktivitas SOD serum dan peningkatan 8-OHdG serum pada mencit model asma.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengamatan serial berdasarkan waktu untuk mengetahui profil kerusakan oksidatif dan inflamasi pada mencit model asma.
2. Perlu dilakukan sensitiasi kronik ovalbumin untuk mengetahui progresivitas kerusakan baik secara seluler maupun molekuler.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan pajanan subkronik partikel debu batu bara untuk mengetahui sejauh mana dampak partikel debu batu bara hingga menyebabkan oksidasi DNA.

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7

DAFTAR PUSTAKA

- Aguirre L.A., Hao W., Pan L.J., Li X., Molina A.S.I., Bacsi A., Radak Z., Sur S., Brasier A.R., Ba X., boldogh I. 2017. Pollen-induced oxidative DNA damage response regulates miRNAs controlling allergic inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 313: L1058-L1068.
- Akdis M., Burgler S., Crameri R., et al. 2011. Interleukins from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 127: 701-721.
- Altin R., Kart L., Tekin I., Armutcu F., And Omel T. 2004. The presence of promatrix metalloproteinase-3 and its relation with different categories of coal worker's pneumoconiosis. *Mediator Inflammation.* 44-46: 451-462.
- Armutcu F., Gun B.D., Altin R., Gurel A. 2007. Examination of lung toxicity, oxidant/antioxidant status, and effect of erdosteine in rats kept in coal mine ambiance. *Environ Toxicol Pharmacol.* 24: 106-113.
- Badan Geologi Indonesia. 2013. Sumberdaya batu bara Indonesia sampai dengan 2012.
- Badang Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS). 2013. Jakarta: Kementerian Republik Indonesia.
- Bajpai J., Prakash V., Kant S., Verma A.K., Srivastava A., Bajaj D.K., Ahmad M.K., Agarwal A. 2017. Study of oxidative stress biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease and their correlation with disease severity in north Indian population cohort. *Lung India.* 34(4): 324-329.
- Bannister J.V., and Calabrese L. 1987. Assay for superoxide dismutase. *Meth. Biochem. Anal.* 32: 279-312.
- Barlianto, W., Kusuma, M.S.C., Karyono, S., Mintaroem, K. 2009. Pengembangan Model Mencit Alergi dengan Paparan Kronik OVA. *Jurnal Kedokteran Brawijaya.* XXV(1): 1-5.
- Barlow J.L., Peel S., Fox J., Panova V., Hardman C.S., Camelo A., Bucks C., Wu X., Kane C.M., Neill D.R., et al. 2013. IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing neutrophiles (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132: 933-941.
- Barnes P.J. 2003. Pathophysiology of Asthma. *Eur Respir Mon.* 23: 84-113.
- Bates J.H.T., Rincon M., Irvin C.G. 2009. Animal model of asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 297: L401-L410.
- Bayersmann D., Hartwig A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 82: 493-512.

- Repository Universitas Brawijaya
Bishopp A., Sathyamurthy R., Manney S., Webster C., Krishna M.T., Mansur A.H. 2017. Biomarker of oxidative stress and antioxidants in severe asthma - a prospective case-control study. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 118: 445-451.
- Borda M., Elsetinow A., Schoonen M., Strongin D. 2001. Pyrite-induced hydrogen peroxide formation as a driving force in the evolution of photosynthetic organisms on an early Earth. *Astrobiology.* 1(3): 283-288.
- Bortey-Sam, N., Ikenaka, Y., Akoto, O., Nakayama, S.M.M., Asante, K.A., Baidoo, E., Obirikorang, C., Mizukawa, H., Ishizuka M. 2017. Association between human exposure to heavy metals/metalloid and occurrences of respiratory disease, lipid peroxidation and DNA damage in Kumasi, Ghana. *Environmental Pollution.* 235: 163-170.
- Busse W. 2011. Asthma diagnosis and treatment: filling in the information gaps. *J Allergy Clin Immunol.* 128: 740-749.
- Byers D.E., Alexander-Brett J., Patel A.C., Agapov E., Dang-Vu G., Jin X., Wu K., You Y., Alevy Y., Girard J.P., et al. 2013. Long-term IL-33-producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. *J. Clin. Investig.* 123: 3967-3982.
- Cai F., Hornauer H., Peng K., Schofield C.A., Scheerens H., Morimoto A.M. 2016. Bioanalytical challenges and improved detection of circulating levels of IL-13. *Bioanalysis.* 8(4): 323-332.
- Castranova V., Porter D., Millecchia L., Ma J.Y., Hubbs A.F., Teass A. 2002. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: Time course of pulmonary reactions. *Mol Cell Biochem.* 234-235(1-2): 177-184.
- Chan T.K., Loh X.Y., Peh H.Y., Tan W.N.F., Tan D., Li N., Tay I.J.J., Wong F., Engelward B.P. 2016. House dust mice-induced asthma causes oxidative damage and DNA double-strand breaks in the lungs. *J Allergy Clin Immunol.* 138: 84-96.
- Chang C.L., Marra G., Chauhan D.P. 2002. Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283(1): C148-C154.
- Cheng C.W., Chen L.Y., Chou C.W., Liang J.Y. 2015. Investigation of riboflavin photolysis via coloured light in the nitro blue tetrazolium assay for superoxide dismutase activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 148: 262-267.
- Chapman A.M., Malkin D.J., Camacho J., Schiestl R.H. 2014. IL-13 overexpression in mouse lungs triggers systemic genotoxicity in peripheral blood. *Mutation Research.* 769: 100-107.
- Cho, Y.S., Moon, H. 2010. The role of oxidative stress in pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2(3):183-187.

- Repository Universitas Brawijaya
Chon C.A., Laffer R., Simon S.R., O'Riordan T., and Schoonen M.A.A. 2006. Role of pyrite in formation of hydroxyl radicals in coal: possible implication for human health. *Particle and Fiber Toxicology*. 3: 16.
- Cohen R.A., Patel A., Green F.H. 2008. Lung disease caused by exposure to coal mine and silica dust. *Semin. Respir. Crit Care Med.* 29, 651-661.
- Cohn C.A., Pak A., Schoonen M.A.A., Strongin D.R. 2005. Quantifying hydrogen peroxide in iron-containing solutions using leuco crystal violet. *Geochem Trans.* 6(3): 47-52.
- Comhair S.A., Thomassen M.J., Erzurum S.C. 2000. Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% O₂ or cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23: 350-354.
- Comhair S.A., Xu W., Ghosh S., Thunnissen F.B., Almasan A., et al. 2005. Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic air-way remodeling and reactivity. *Am J Pathol.* 166: 663-674.
- Corradi M, Folesani G, Andreoli R, Manini P, Bodini A, et al. 2003. Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am J Resp Crit Care Med.* 167; 395-399.
- Dickinson J.D., Alevy Y., Malvin N.P., Patel K.K., Gusten S.P., Holtzman M.J., Stappenbeck T.S., Brody S.L. 2016. IL13 activates autophagy to regulate secretion in airway epithelial cells. *Autophagy*. 12(2): 397-309.
- Dickinson J.D., Sweeter J.M., Warren K.J., Ahmad I.M., De Deken X., Zimmerman M.C., Brody S.L. 2018. Autophagy regulates DUOX1 localization and superoxide production in airway epithelial cells during chronic IL-13 stimulation. *Redox Biology*. 14: 272-284.
- Ditmars M., Knuth M., Beineke M., Epe B. 2008. Role of oxidative DNA damage and antioxidant enzymatic defence system in human aging. *The Open Anthropology Journal*. 1: 38-45.
- Donbak, L., Rencuzogullari, E., Yavuz, A., and Topaktas, M. 2005. The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 588: 82-87.
- Fallahi M., Keyhanmanesh R., Khamaneh A.M., Saadatlou M.A.E., Saadat S., Ebrghimi H. 2016. Effect of Alpha-Hederin, the active constituent of Nigella sativa, on miRNA-126, IL-13 mRNA levels and inflammation of lungs in ovalbumin-sensitized male rats. *Avicenna J Phytomed.* 6(1):77-85.
- Fatturachman, D., Barlianto, W., and Mintaroem, K. 2012 Pengaruh sel limfosit T regulator CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ dan Transforming Growth Factor (TGF) β terhadap airway remodeling bronkiolus paru pada model mencit asma. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 27(2): 71-6.

- Federer W.T. 1977. *Experimental Design Theory And Application, Third Edition.* Oxford and IBH Publishing Co: New Delhi.
- Fenga C., Gangemi S., Teodoro M., Rapisarda V., Golokhvast K., Anisimov N.Y., Docea A.O., Tsatsakis A.M., Costa C. 2017. 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to low-dose benzene. *Jurnal Toxicology Report.* 4: 291-95.
- Fujijati. 2018. Efek paparan partikel particulate matter (PM) Debu batu bara ukuran $<5\mu\text{m}$ terhadap remodeling paru mencit disensitisasi ovalbumin. Unpublished.
- Ghosh S, Masri F, Comhair S, Andreadis A, Swaidani S, et al. 2003. Nitration of proteins in murine model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 167: A889.
- GINA (2015) Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma.
- Gour N., Wills-Krap M. 2015. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine.* 75: 68-78.
- Greenfeder S., Umland S.P., Cuss F.M., Chapman R.W., Egan R.W. 2001. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir Res.* 2: 71-79.
- Guerrero-Castilla A., Olivero-Verbel J., Marrugo-Negrete J. 2014. Heavy metals in wild house mice from coal-mining areas of Colombia and Expression of genes related to oxidative stress, DNA damage and exposure to metals. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 762: 24-29.
- Hasegawa T., Uga H., Mori, Kurata H. 2017. Increased serum IL-17A and Th2 cytokine levels in patients with severe uncontrolled asthma. *Eur Cytokine Betw.* 28: 8-18.
- Hesterberg T.W., Long C.M., Bunn W.B., Sax S.N., Lapin C.A., Valberg P.A. 2009. Non-cancer health effects of diesel exhaust: a critical assessment of recent human and animal toxicological literature. *Crit Rev Toxicol.* 39(3):195–227.
- Holgate S.T., Polosa R. 2006. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet.* 368: 780-793.
- Huang X., Li W., Attfield M.D., Nadas A., Frenkel K., Finkelman R.B. 2005. Mapping and prediction of coal workers' pneumoconiosis with bioavailable iron content in the bituminous coals. *Environ. Health Perspect.* 113: 964–968.
- Huang, X. and Finkelman, R.B. 2008. Understanding chemical properties of macerals and minerals in coal and its potential application for occupational lung disease prevention. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 11(1):45-46.
- Huertas J.I., Huertas M.E., Izquierdo S., Gonzalez E.D. 2012. Air quality impact assessment of multiple open pit coal mines in northern Colombia. *J Environ Econ Manag.* 93: 121-129.

- Ighodaro O.M., Akinloye O.A. 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J Med.* 1-7.
- Jarikre T.A., Ohore G.O., Oyagbemi A.A., Emikpe B.O. 2017. Evaluation of oxidative stress in caprine bronchoalveolar lavage fluid of pneumonic and normal lungs. *International Journal of Veterinary Science and Medicine.* 5: 143-147.
- Jomova K., Valko. 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 283: 65-87.
- Joseph J., Benedict S., Al-sowaidi S., Joseph M., Zoubeidi T. 2004. Serum interleukin-13 levels are elevated in mild and moderate persistent asthma. *Journal of Asthma, Allergy, and Immunology.* 4(2): 1-7.
- Junior S.A., Possamai F.P., Budni P., Backers P., Parisotto E.B., Rizelio V.M., Torres M.A., Colepicolo P., Filho D.W. 2009. Occupational airborne contamination in south Brazil: 1, Oxidative stress detected in the blood of coal miners. *Ecotoxicology.* 18: 1150-1157.
- Kania N., Setiawan B., Widiadjanto E., Nurdiana, Widodo M.A., Kusuma H.M.S.C. 2014. Subchronic inhalation of coal dust particulate matter 10 induces bronchoalveolar hyperplasia and decreases MUC5AC expression in male Wistar rats. *Experimental and Toxicology Pathology.* 66: 383-389.
- Kania, N., Setiawan, B., Nurdiana, Widodo, M.A., and Kusuma, H.M.S.C. 2012. Peroxidative index as novel marker of hydrogen peroxide involvement in lipid peroxidation from coal dust exposure. *Oxid Antioxid Med Sci.* 1(3): 209-215.
- Kania, N., Setiawan, B., Nurdiana, Widodo, M.A., and Kusuma, H.M.S.C. 2011. Lung histopathology changed in coal dust exposure with model equipment. *MKB.* 43: 127-133.
- Kasaian, M.T., Marquette, K., Fish, S., Declercq, C., Agostinelli, R., Brennan, A., Lee, J., Fitz, L., Brooks, J., Vugmeyster, Y., Cook, T.A., Williams, C.M.M., Lofquist, A., TchistiakOVA, L. 2013. An IL-4/IL-13 dual antagonist reduces lung inflammation, airway hyperresponsiveness, and IgE production in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 49(1): 37-46.
- Kaur S., Gill M.S., Gupta K., Manchanda K.C. 2013. Effect of occupation on lipid peroxidation and antioxidant status in coal-fired thermal plant workers. *Int J Appl Basic Med Res.* 3(2): 93-97.
- Kay A., Phipps S., and Robinson D.S. 2004. A role for eosinophils in airway remodeling in asthma. *Trends in immunology.* 25(9): 477-482.
- Kaya Y., Cebi A., Soylemez A., Demir H., ALP H.H., Bakan E. 2012. Correlations between oxidative damage, oxidative stress and coenzyme Q10 in Patients with Coronary Artery Disease. *Int J Med Sci.* 9(8): 621-626.

- Repository Universitas Brawijaya
Kianmehr M., Ghorani V., Boskabady M.H. 2016. Animal model of asthma, various method and measured parameters: a methodological review. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 15(6): 445-465.
- Killeen K., Skora E. 2013. Pathophysiology, Diagnosis, and Clinical Assessment of Asthma in the Adult. *Nurs Clin N Am.* 48: 11-23.
- Kleniewska P., Pawliczak R. 2017. The Participation of Oxidative Stress in Pathogenesis of Bronchial Asthma. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 94: 100-108.
- Krishnamurthy P., Wadhwani A. 2012. Antioxidant enzymes and human health. *Antioxidant enzyme. InTech.*
- Kumar R.K., Herbert C., Foster P.S. 2008. The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Curr Drug Targets.* 9: 485-494.
- Lee J.S., Shin J.H., Hwang J.H., Baek J.E., and Choi B.S. 2014. Malondialdehyde and 3-Nitrotyrosine in exhaled breath condensate in retired elderly coal miners with chronic obstructive pulmonary disease. *Safety and Health Work.* 5(2): 91-96.
- Lee M.W., Chen M.L., Lung S.C.C., Tsai C.J., Yin X.J., Mao I.F. 2010. Exposure assessment of PM_{2.5} and urinary 8-OHdG for diesel exhaust emission inspector. *Science of the Total Environment.* 408: 505-510.
- Li R., Zhao L., Zhang L., Chen M., Dong C., Cai Z. 2017. DNA damage and repair, oxidative stress and metabolism: biomarker responses in lungs of rats exposed to ambient atmospheric 1-nitropyrene. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 54: 14-20.
- Liou S.H., Wu W.t., Liao H.Y., Chen C.Y., Tsai C.Y. 2017. Global DNA methylation and oxidative stress biomarkers in workers exposed to metal oxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials.* 331: 329-335.
- Liu, L., Poon, R., Chen, L., Frescura, A., Montuschi, P., Ciabattoni, G., Wheeler, A., and Dales, R. 2009. Acute effect of air pollution on pulmonary function, airway inflammation, and oxidative stress in asthmatic children. *Environmental Health Perspective.* 117(4): 668-674.
- Locke N.R., Royce S.G., Wainwright J.S., Samuel C.S., Tang M.L. 2007. Comparison of airway remodeling in acute, subacute, and chronic models of allergic airways disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 36: 625-632.
- Loft S., Moller P. 2006. Oxidative DNA damage and human cancer: need for cohort studies. *Antioxid Redox Signal.* 8: 1021–1031.
- Lu X., Wang C., Liu B. 2015. The role of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam Meretrix meretrix. *Fish & Shellfish Immunology.* 42: 58-65.
- Ma Y., Ge A., Zhu W., Liu Y., Ji N., Zha W., Zhang J., Zeng X., Huang M. 2016. Morin attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by modulating



- Repository Universitas Brawijaya
oxidative stress-responsive MAPK signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 4: 1–13.
- Mak J.C.W., Ho S.P., Ho A.S.S., Law B.K.W., Cheung A.H.K., Ho J.C.M., Ip M.S.M., and Chan-Yeung M.M.W. Sustained Elevation of Systemic Oxidative Stress and Inflammation in Exacerbation and Remission of Asthma. *JSRN Allergy.* 561831. 1-6.
- Makris D., Tzanakis N., Damianaki A. 2008. Microsatellite DNA instability and COPD exacerbations. *Eur Respir J.* 32(3): 612-618.
- Maslan J., Mims J.W. 2014. What is Asthma? Pathophysiology, Demographics, and Health Care Costs. *Otolaryngol Clin N. Am.* 47: 13-22.
- Matough F.A., Budin S.B., Hamid Z.A., Louis S.R., Alwahaibi N., Mohamed J. 2012. Palm vitamin E reduce oxidative stress, and physical and morphological alterations of erythrocyte membranes in streptozocin-induced diabetic rats. *Oxid Antioxid Med Sci.* 1(1): 59-68.
- Matzenbaccher C.A., Garcia A.L.H., dos Santos M.S., Nicolau C.C., Premoli S., Correa D.S., de Souza C.T., Niekraszewicz L., Dias J.F., Delgado T.V., Klkreuth W., Grivicich I., da Silve J. 2016. DNA damage induced by coal dust, fly, and bottom ash from coal combustion evaluated using the micronucleus test and comet assay *in vitro*. *Journal of Hazardous Materials.* 182(16): 1-8.
- Medoff B.D., Thomas S.Y., Luster A.D. 2008. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annu Rev Immunol.* 26: 205–232.
- Mo, J., Wang, L., Au, W., Su, M., 2014. Prevalence of coal workers' pneumoconiosis in China: A systematic analysis of 2001–2011 studies. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 217: 46-51.
- Munitz A., Brandt E.B., Mingler M., Finkelman F.D., Rothenberg M.E. 2008. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 7240–7245.
- Omland, O., Würtz, E.T., Aasen, T.B., Blanc, P., Brisman, J., Miller, M.R., 2014. Occupational chronic obstructive pulmonary disease: a systematic literature. *Scand. J. Work Environ. Health.* 40(1):19-35.
- Park C.S., Kim T.B., Lee K.Y., Moon K.A., Bae Y.J., Jang M.K., Cho Y.S., Moon H.B. 2009. Increased oxidative stress in the airway and development of allergic inflammation in a mouse model of asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology.* 103: 238-247.
- Petsonk E.L., Rose C., Cohen R., 2013. Coal mine dust lung disease: new lessons from an old exposure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187: 1178-1185.
- Pinho R.A., Silveria P.C.L., Silva L.A., Steck E.L., Dal-Pizzol F., Moreira J.C.F. 2005. N-acetylsisteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environ Res.* 99: 355-360.

- Rael E.F., Lockey R.F. 2011. Interleukin-13 signaling and its role in asthma. *WAO Journal.* 4: 54-64.
- Ricardo, A.P., Fernanda, B., Michael, A., Maro, L.C., Frota, Jr., Cristine, R., et al. 2004. Lung oxidative response after acute coal dust exposure. *Elsevier.* 96(3): 290-297.
- Riedl M.A., Nel A.E. 2008. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 8: 49-56.
- Rohr P., Kvítka K., da Silva F.R., Menezes A.P.S., Porto C., Sarmento M., Sarmento M., Decker N., Reyes J.M., Allgayer M. da C., Furtado T.C., Salvador M., Branco., da Silva J. 2013. Genetic and oxidative damage of peripheral blood lymphocytes in workers with occupational exposure to coal. *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 402: 1-6.
- Sahiner U.M., Birben E., Erzurum S., Sackesen C dan Kalayci O. 2011. Oxidative Stress in Asthma. *WAO Journal.* 4: 151-158.
- Sethi G.S, Naura A.S. 2018. Progressive increase in allergen concentration abrogates immune tolerance in ovalbumin-induced murine model of chronic asthma. *International Immunopharmacology.* 60: 121-131.
- Setiawan B., Kania., Yuwono A., Paramita D. 2011. Efek inhalasi debu batu bara terhadap stres klorinatif dan kerusakan endotel. *J Indon Med Assoc.* 61: 253-257.
- Suhartono E. 2016. Toksisitas Oksigen Reaktif dan Antioksidan. Dibidang Kedokteran dan Kesehatan. Yogyakarta: Gosyen Publishing.
- Tzortzaki E.G., Minakou K., Neofytou E., Tsikritsaki K., Samara k., Avgousti M., Amargianitakis V., Gousiou A., Menikaou S., Siafakas N.M. 2012. Oxidative DNA damage and somatic mutations: a link to the molecular pathogenesis of chronic inflammatory airway diseases. *CHEST.* 141(5): 1243-1250.
- Umit, M.S., Esra, B., Serpil, E., Cansin, S., and Omer, K. 2011. Oxidative stress in asthma. *WAO Journal.* 4: 151-158.
- Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C. 2009. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C.* 27: 120-39.
- Westbrook A.M., Wei B., Braun J., Schiestl R.H. 2009. Intestinal mucosal inflammation leads to systemic genotoxicity in mice. *Cancer Res.* 69: 4827-4834.
- Wood L.G., Gibson P.G., Garg M.L. Biomarkers of Lipid Peroxidation, Airway Inflammation and Asthma. *Eur Respir J.* 21: 177-186.
- World Health Organization (2017). <http://www.who.int>

Yano T., Shoji F., Baba H., Koga T., Shiraishi T., Orita H., Kohno H. 2009. Significance of the urinary 8-OHdG level as an oxidative stress marker in lung cancer patients. *Lung Cancer*.63: 111-114.

Yuan C., Lee Y., Hsu G.W. 2012. Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *J Biomed Sci*. 19:51

Zervou M.I., Tzortzaki E.G., Makris D. 2006. Differences in microsatellite DNA level between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 28(3): 472-478.

Zimet Z., Bilban M., Malovrh M., Korosec P., Poljsak B., Osredkar J., and Silar M. 2016. 8-isoprostanate as oxidative stress marker in coal mine workers. *Biomed Environ Sci*. 29(8): 589-593.

Zontek T., Ogle B.R., Hollenbeck S., Jankovic J.T. 2017. A comparison of occupational exposure limits and their relationship to reactive oxide species. *J. Chem. Health Safety*. 937: 1-7.

Zosky G.R., Sly P.D. 2007. Animal models of asthma. *Clinical and Experimental Allergy*. 37: 973-988.

Zou J., du PreCarroll X., Wang D., Li C., Yuan B., and Leeper-Woodford, S. 2011. Alterations of serum biomarkers associated with lung ventilation function impairment in coal worker's: A cross-sectional study. *Environmental Health*. 10: 83.

Lampiran 1. Data Penelitian**A. Aktivitas SOD Serum**

SAMPEL	KELOMPOK			
	Kontrol	Batu Bara	OVA	OVA + Batu Bara
1	69.21	70.19	60.9	57.33
2	62.87	70.81	60.54	63.85
3	66.62	69.65	61.79	51.17
4	66.53	59.92	68.67	57.78
5	60.28	62.87	60.01	53.76
6	59.38	53.94	65.99	60.81
Rerata	64.15	64.56	62.98	57.45

B. Konsentrasi 8-OHdG Serum

SAMPEL	KELOMPOK			
	Kontrol	Batu Bara	OVA	OVA + Batu Bara
1	3.254	2.420	3.428	3.123
2	2.559	4.113	2.847	3.077
3	3.861	3.026	2.907	2.978
4	2.175	2.889	3.022	3.326
5	3.504	2.483	3.066	3.521
6	2.769	4.204	3.274	4.158
Rerata	3.020	3.189	3.091	3.364

Lampiran 2. Analisis Data**A. Aktivitas SOD**Uji Normalitas Data: Uji *Shapiro-Wilk*

Res

B. Konsentrasi 8-OHdGUji Normalitas: *Shapiro-Wilk***Tests of Normality**

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OHdG Kontrol	.155	6	.200*	.976	6	.930
Batu Bara	.249	6	.200*	.846	6	.145
OVA	.211	6	.200*	.939	6	.650
OVA + Batu Bara	.211	6	.200*	.858	6	.184

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

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas: *Levene's Test***Test of Homogeneity of Variances**

OHdG

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.888	3	20	.024

Uji Non-Parametrik: Kruskal-Wallis**Test Statistics^{a,b}**

	OHdG
Chi-Square	2.007
df	3
Asymp. Sig.	.571

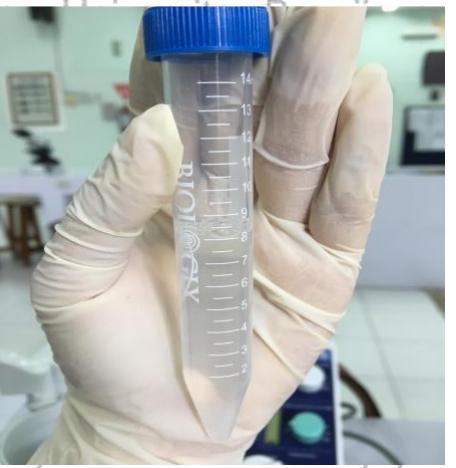
a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

C. Korelasi Aktivitas SOD dan Konsentrasi 8-OHdG SerumUji Korelasi: *Spearman's rho***Correlations**

Spearman's rho	SOD	Correlation Coefficient	N	SOD	OHdG
		Sig. (2-tailed)			
		N			
Spearman's rho	OHdG	Correlation Coefficient			
		Sig. (2-tailed)			
		N			

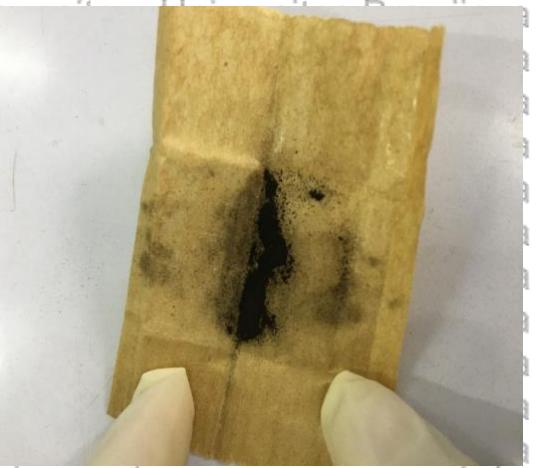
Lampiran 3. Dokumentasi Penelitian



ovalbumin TCI



Mencit Balb/C Betina



Partikel Debu Batu Bara 12,5mg



A photograph of the product packaging for the "Mouse 8-OHdG ELISA Kit". The box is white with blue and orange text. At the top, it says "Luminescence ELISA" and "Mouse 8-OHdG ELISA Kit". Below that is the catalog number "Cat.No E0187Mo". To the right is an illustration of an orange pipette dispensing a drop of orange liquid. In the center, it says "Sandwich ELISA Kit" and "2-8°C". There are two small icons: one showing a test tube with a checkmark and another showing a test tube with an X. Below these are the numbers "171010" and "181009". At the bottom left is a small icon of a person reading a book, followed by the text "Read the instruction for use". The website "www.bt-laboratory.com" is printed at the bottom. The Luminescence logo is at the very bottom.

Mouse 8-OHdG ELISA Kit
Cat. No E0187Mo



Bahan pemeriksaan SOD Metode NBT



Obat Anestesi



Coal Dust Exposure Chamber



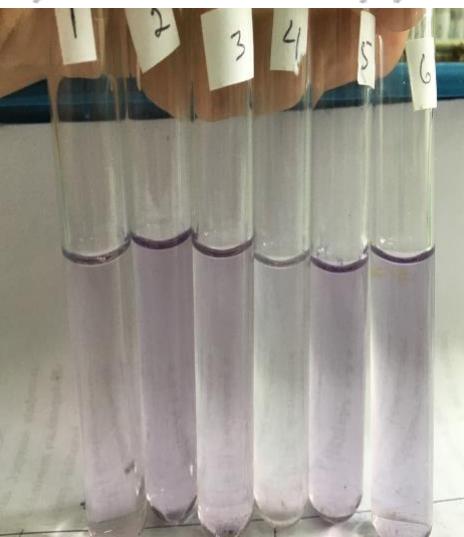
Inhalasi OVA: Nebulizer Omron NU-017



Anestesi pre-pembedahan



Pembedahan



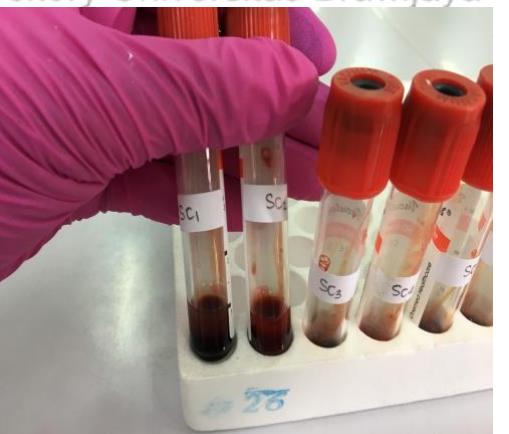
Hasil Inkubasi Metode NBT



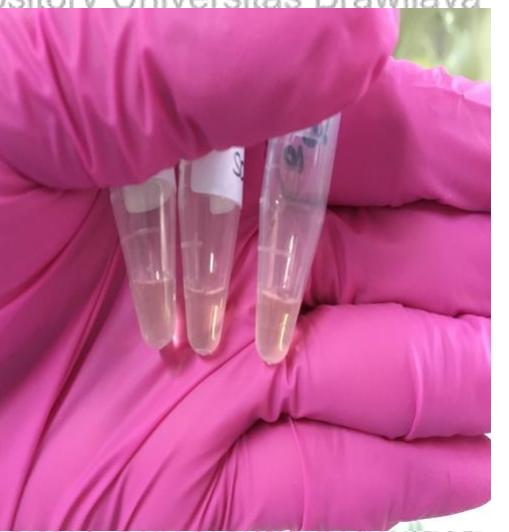
Pengambilan Darah Jantung



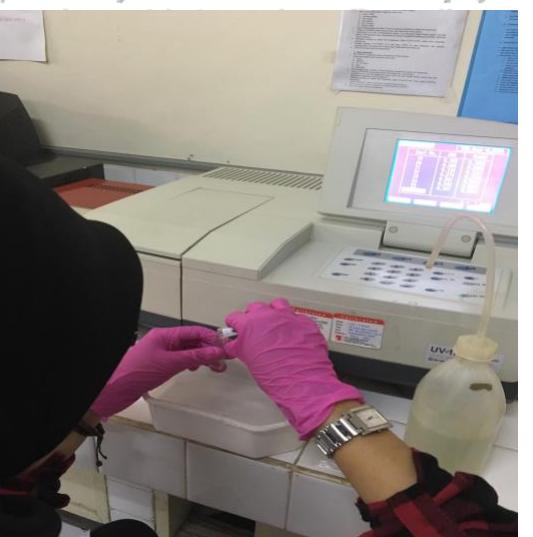
Proses Pemisahan Serum



Darah Jantung dalam Tabung Serum



Serum Sampel



Pemeriksaan Absorbansi SOD



Pemeriksaan 8-OHdG, Metode ELISA *Microplate ELISA*

Lampiran 4. Journal Accepted

**The Indonesian
Biomedical Journal**

Print ISSN: 2085-3297, Online ISSN: 2355-9197

Secretariat of The Indonesian Biomedical Journal

Prodia Tower 9th Floor, Jl. Kramat Raya No.150, Jakarta, 10430, Indonesia

Phone.+62-21-3144182, email: secretariat@inabj.org

Website: <https://inabj.org>

C E R T I F I C A T E O F A C K N O W L E D G M E N T

No : 001/AC.01/IBJ/I/2019

The board of Indonesian Biomedical Journal awarding this certificate to:

**Windy Yuliana Budianto, Husnul Khotimah,
Eko Suhartono**

as recognition of an ACCEPTED paper entitled

**"Effect of Coal Dust Exposure on the SOD Activity and the
Oxidative DNA Damage in Asthma Mice Model"**

that will be published in The Indonesian Biomedical Journal.

Jakarta, January 11, 2019

Managing Editor



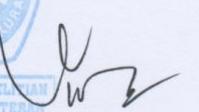
Dr. Anna Meiliana



Repository Universitas Brawijaya
Lampiran 5. Etik Penelitian

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository
Repository
Repository
Repository
Repository
Repository
Repository

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS LAMBUNG MANGKURAT BANJARMASIN- INDONESIA THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH MEDICAL FACULTY UNIVERSITY OF LAMBUNG MANGKURAT BANJARMASIN - INDONESIA</p>	
<p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE)</p>	
<p>No.895/KEPK-FK UNLAM/EC/VIII/2018</p>	
<p>Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Dengan Memperhatikan Hak Asasi Manusia dan Kesejahteraan Dalam Penelitian Kedokteran, Setelah Mempelajari Dengan Seksama Rancangan Penelitian Yang Diusulkan, Dengan Ini Menyatakan Bawa Penelitian Dengan :</p>	
<p><i>The Committee of Medical Research Ethics of Medical Faculty, Lambung Mangkurat University, with regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled:</i></p>	
<p>JUDUL: <i>Title</i></p>	
<p>Efek Paparan Partikel Debu Batu Bara Terhadap Aktivitas SOD Dan Kerusakan Oksidatif DNA Pada Model Mencit Dengan Asma <i>Effect Of Coal Dust Exposure On SOD Activity And Oxidative DNA Damage In Asthmatic Mice Model</i></p>	
<p>NAMA PENELITI <i>Name of the Investigator</i></p>	
<p>: Windy Yuliana Budianto, Ns NIM. 176070100111002</p>	
<p>UNIT / LEMBAGA <i>Name of Institution</i></p>	
<p>: Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedoteran Universitas Brawijaya Malang Master of Science in Biomedic Faculty of Medicine, Brawijaya University, Malang</p>	
<p>DINYATAKAN LAIK ETIK <i>Approved for ethical clearance</i></p>	
<p>Banjarmasin, 1 Agustus 2018 Komisi Etik Penelitian, <i>The Ethical Comitte Research</i></p>	
  <p>Dr. dr. Ika K. Oktaviyanti, M.Kes., Sp. PA NIP. 19681012 199702 2 001</p>	

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya
Repository Universitas Brawijaya

Repository
Repository
Repository
Repository
Repository



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia

Telp. (0341) 5516111 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755

<http://www.fk.ub.ac.id>

e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

SURAT KETERANGAN

Nomor : 673 /UN10.F08.08/PN/2018

Berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal (BPJ) Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah berikut :

Judul : Efek Paparan Partikel Debu Batu Bara Terhadap Penurunan Aktivitas SOD
Dan Kerusakan Oksidatif DNA Yang Ditandai Dengan Peningkatan 8-OHDG
Pada Mencit Model Asma

Penulis : Windy Yuliana Budianto, S.Kep., Ns

NIM : 176070100111002

Jumlah Halaman : 49

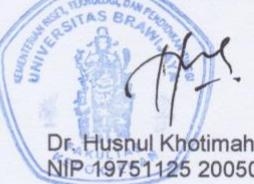
Jenis Artikel : Tesis (Program Studi Magister Ilmu Biomedik)

Kemiripan : 5 %

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

10 DEC 2018

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,



Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M.Kes
NIP.19751125 200501 2 001