

LAPORAN PENELITIAN HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL



- Judul : **PENGARUH GANGGUAN RITME SIRKADIAN
(PERUBAHAN RESPON IMUN SELULER) TERHADAP
KERUSAKAN ALVEOLI AKIBAT PAPARAN DEBU BATUBARA**
- Ketua : **Dr. dr. Nurdiana, M.Kes**
- Anggota : **1. Prof. dr. M. Aris Widodo, MS.Sp.FK. PhD
2. Qomariyatus Sholihah**

Dibiayai Oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Strategis Nasional, Nomor : 0174.0/023-04.2/XV/2009, tanggal 31 Desember 2008 dan berdasarkan SK Rektor Nomor : 160/SK/2009, tanggal 7 Mei 2009.

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
NOPEMBER 2009**

**HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN PENELITIAN HIBAH STRATEGIS NASIONAL**

1. Judul Penelitian : Pengaruh gangguan ritme sirkadian (perubahan respon imun seluler) terhadap kerusakan alveoli akibat paparan debu batubara
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap : Dr. dr. Nurdiana, M.Kes
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. NIP : 19551015 198603 2 001 Karpeg : No. E 107 856
 - d. Jabatan Struktural : Kepala Laboratorium Farmakologi
 - e. Jabatan fungsional : Staf Pengajar Fakultas Kedokteran UB
 - f. Bidang Keahlian : Farmakologi
 - g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran / Pendidikan Dokter
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Brawijaya Malang
 - i. Tim Peneliti

NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes	Farmakologi	Fakultas Kedokteran/Pendidikan Dokter	Universitas Brawijaya, Malang
2. Prof. dr. M. Aris Widodo, MS.Sp.FK. PhD	Farmakologi	Fakultas Kedokteran/Pendidikan Dokter	Universitas Brawijaya, Malang
3. Qomariyatus Sholihah	Ilmu Kesehatan Masyarakat	Fakultas Kedokteran	Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian :
- a. Jangka Waktu penelitian yang diusulkan : 1 (satu) tahun
 - b. Biaya Total yang diusulkan : Rp 99.956.000,-
 - c. Biaya yang disetujui tahun 2009 : Rp 100 000 000,-

Malang, 30 Nopember 2009



Mengetahui,
Pembantu Dekan I FKUB
[Signature]
Prof. DR. dr. Edi Widjanto, MS, Sp.PK (K)
NIP. 19500427 198002 1 001

Ketua Peneliti,

[Signature]
Dr.dr. Nurdiana, M.Kes
NIP 19551510 198603 2 001



Menyetujui,
Lembaga Penelitian dan
Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Brawijaya
Ketua,
[Signature]
Prof. Dr. Siti Chuzzaemi, MS
NIP. 19590514 198002 2 001

RINGKASAN

Batubara merupakan campuran karbon organik dan mineral inorganik seperti quartz, clays, karbonat dan pyrite. Campuran tersebut menyebabkan pembakaran batubara menghasilkan bahan-bahan berbahaya untuk pernafasan karena dapat membentuk sulfur dioksida, carbon dioksida, partikel-partikel halus dan nitrogen oksida. Sulfur dioksida dapat menyebabkan kerusakan saluran pernafasan karena mengiritasi dinding saluran dan menyebabkan saluran yang halus pada paru tertutup. Kerusakan paru tersebut umumnya disebabkan oleh partikel debu. Debu batubara juga ditengarai sebagai faktor penyebab pneumokoniosis. Pneumokoniosis akibat dampak lingkungan dinyatakan sebagai salah satu penyebab terpenting kegagalan fungsi respirasi di seluruh dunia. Sehubungan dengan periode latensi yang panjang, banyak penderita pneumokoniosis stadium awal yang tidak menunjukkan gejala apapun.

Berkaitan dengan aktivitas penambangan batubara di Indonesia, beberapa penelitian telah dilakukan terkait dengan tingkat kesehatan pernafasan. Penelitian tentang polusi udara akibat partikel PM10 di sekitar lingkungan rumah telah dilakukan di Kabupaten Banjar Kalimantan Selatan. Telah diketahui bahwa kualitas udara di sekitar lokasi tambang batubara tersebut, parameter kadar SO₂ dan NO₂, telah melampaui ambang baku mutu.

Pekerja tambang adalah orang yang secara langsung terpapar debu bata bara, sehingga merekalah yang mempunyai risiko paling besar untuk menderita gangguan paru-paru. Selain itu pekerja tambang terkait dengan kondisi kerja shift, yaitu kerja shift siang dan malam. Pada kondisi shift malam pekerja shift mengalami deviasi terhadap bentuk konvensional aktivitas manusia yang mengalami puncak pada siang hari dan sore. Deviasi dari waktu aktivitas harian tersebut menempatkan pekerja shift pada kondisi berlawanan dari fungsi alamiah manusia. Fungsi alamiah yang meliputi proses fisiologis (misal kecepatan metabolisme), proses psikologis (misal memori jangka pendek), dan proses sosial (misal interaksi dengan keluarga) semuanya diketahui bertambah dan berkurang secara ritmik sepanjang aktivitas harian. Bentuk ini dikenal sebagai ritme sirkadian. Gangguan terhadap ritme sirkadian dapat mengakibatkan desinkronisasi fungsi alamiah yang mungkin dapat mempengaruhi kondisi kesehatan tubuh.

Akibat paparan debu bata bara telah banyak diteliti dan dibuktikan, yang perlu dikaji lebih lanjut adalah bagaimana mencegah dan mengatasi terjadi gangguan akibat debu bata bara tadi pada tubuh kita, terutama pada paru-paru orang yang terpapar debu batu bara. Apalagi pada pekerja tambang batu bara yang bekerja sesuai *shift*, sehingga ritme sirkadiannya terganggu.

Ritme sirkadian sendiri dipengaruhi oleh melatonin. Melatonin adalah hormon yang mempunyai banyak efek, diantaranya sebagai antioksidan dan meningkatkan sistem imun. Pada penelitian ini akan diteliti apakah melatonin dapat mencegah dan memperbaiki kerusakan jaringan alveoli paru pada tikus yang dipapar debu bata bara dan dikondisikan dengan pola shift siang dan malam.

Pada penelitian ini diawali dengan penentuan konsentrasi paparan dan ukuran debu batu bara yang memberikan efek gangguan pada paru-paru tikus. Dalam hal ini adalah efek stres oksidatif dan pengaruhnya terhadap antioksidan. Serangkaian percobaan telah dilakukan dengan menggunakan hewan coba tikus jantan (4-6 bulan, berat badan 300-400 gr) yang dikelompokkan berdasar perlakuan lama paparan debu batu bara (ukuran ≤ 5 micron, 15 gram/m³), yaitu 2, 5 dan 10 menit, setiap jam, diulang sebanyak 6 kali, selama 3 hari. Hari ke 4, tikus dikorbankan, dilakukan pengukuran kadar malondealdehid (MDA) dengan menggunakan tes TBA dan Superoxid Dismutase (SOD) menggunakan NBT pada serum dan jaringan paru. Selain itu dilakukan

pengukuran tebal dinding alveoli tikus melalui sediaan histologis jaringan paru yang dicat dengan HE.

Hasil percobaan menunjukkan kadar MDA yang meningkat seiring dengan peningkatan lama waktu paparan debu bata bara, baik pada serum maupun jaringan paru. Data MDA berturut-turut adalah $0,77 \pm 0,07$ (kontrol) , $30,81 \pm 0,061$ (paparan 2 menit) , $09 \pm 0,161$ (paparan 5 menit) dan $01 \pm 0,22$ (paparan 10 menit) ng/ml untuk serum dan $0,51 \pm 0,103$; $0,8 \pm 0,080$; $94 \pm 0,05$ dan $0,84 \pm 0,03$ ng/gram untuk paru tikus.

Dari hasil pengukuran MDA menunjukkan bahwa debu bata bara merupakan radikal bebas yang menyerang tubuh tikus, terutama pada paru. Radikal bebas yang berasal dari debu batubara telah diteliti dan dilaporkan kebanyakan adalah hidrogen peroksida.

Hasil pengukuran SOD pada serum dan jaringan paru berturut-turut adalah sebagai berikut : pada serum $51,73 \pm 13,47$; $26,61 \pm 5,22$; $59,87 \pm 3,26$ dan $52,46 \pm 4,40$ unit/ml, sedangkan paru $69,71 \pm 7,13$; $54,93 \pm 9,60$; $62,01 \pm 5,65$ dan $68 \pm 4,03$ ng/100 gram. Pada penelitian ini didapatkan kadar SOD mula mula menurun dibandingkan kelompok kontrol pada lama paparan 2 menit. Akan tetapi pada lama paparan 5 dan 10 menit kadar SOD meningkat lagi. Dalam hal ini menunjukkan bahwa SOD pada awalnya menurun karena digunakan untuk memungut radikal bebas. Selanjutnya apabila paparan debu bata bara sebagai sumber radikal bebas lebih lama, maka kemungkinan terjadi kompensasi tubuh untuk meningkatkan antioksidan, dalam penelitian ini adalah SOD.

Pemeriksaan histologis pada jaringan paru adalah mengukur tebal dinding alveolus paru menggunakan program komputer di laboratorium PA FKUB. Hasil pengukuran tebal dinding alveoli berturut turut adalah $37,38 \pm 0,31$; $35,71 \pm 0,62$; $34,20 \pm 0,72$ dan $22,69 \pm 1,66$ μm .

Berdasarkan hasil pengukuran menunjukkan bahwa tebal dinding alveolus paru semakin menipis dengan meningkatnya lama paparan batu bara.

Kesimpulan sementara dari penelitian ini adalah bahwa debu batu bara bersifat radikal bebas, dapat meningkatkan MDA pada paru dan serum. Antioksidan SOD, merespon adanya radikal bebas, mula-mula terjadi penurunan kadar radikal bebas baik di paru maupun serum, diikuti dengan peningkatan pada menit ke 10. Kondisi paparan pada penelitian ini adalah paparan akut. Kemungkinan pada paparan selanjutnya akan terjadi penurunan SOD, karena peningkatan SOD pada paparan debu bara 5 menit dan 10 menit merupakan hasil kompensasi tubuh karena peningkatan radikal bebas.

Penelitian yang terkait dengan efek melatonin pada tikus yang terpapar debu batu bara dan terkait pula dengan ritme sirkadian tikus sebagai bagian dari penelitian ini sedang berlangsung. Pada akhir dari penelitian yang sedang berlangsung tersebut akan diukur kadar TNF α , IL-1 dan IL-6 pada *broncial alveolar lavage* (BAL) serta ketebalan dinding alveolus paru pada sediaan histologis.

SUMMARY

Coal is a mixture of organic carbon inorganic minerals such as quartz, clays, carbonate and pyrite. This mixture is what causes the release of substances that are harmful for the respiration during the combustion of coal by forming sulphur dioxide, carbon dioxide, dust particles and nitrogen oxide.

Sulphur dioxide causes respiratory tract damage by causing irritation to the respiratory wall and causing these delicate channels of the lungs to obstruct. This damage is mainly caused by dust particles. Coal dust is suspected to be predisposition in pneumoconiosis. Pneumoconiosis due to environmental factors is one of the major causes of respiratory failure around the world. The long latency period causes many early stage pneumoconiosis patients to show no symptoms at all.

In relation to the coal mining activities in Indonesia, a few researches are initiated to determine the level of respiratory health in these mines. Researches concerning air pollution due to PM10 particles around a household environment has been conducted in Kabupaten Banjar Kalimantan Selatan. It is known that the air quality surrounding a coal mine, using SO₂ and NO₂ concentration as a parameter, has exceeded the threshold of quality control.

Coal miners are people who are directly exposed to coal dust; they have the greatest risk of suffering from lung disorders. Coal miners also work in shifts (day and night shifts). During a night shift, the miner deviates from conventional human activity which is highest during noon and afternoon. Deviation of these daily activities causes the miner to have an opposite condition of its natural function. These natural functions include physiologic processes (such as metabolism speed), psychological process (such as, short term memory), and social processes (such as, family interaction), all known to increase and decrease rhythmically during daily activity. This form is known as the circadian rhythm. Disturbance to the circadian rhythm can cause a desynchronization of the natural function that can affect the health condition.

The cause coal dust exposure has been well known and proven; what needs more research is how to prevent and manage the changes that are caused by coal dust to our body, particularly to the lungs of a person that is exposed to coal dust. The problem increases in coal miners who work in shifts, further causing alterations to their circadian rhythm.

The circadian rhythm itself is affected by melatonin. Melatonin is a hormone possessing many different effects, among them, as an antioxidant and immunomodulator. This research will investigate whether melatonin can prevent and repair alveoli damage in the lungs of rats exposed to coal dust and conditioned to the patterns of day and night shifts.

This experiment is preceded by determining the concentration and size of coal dust that would give a negative effect to the condition of a rat's lung. In other words, to determine the degree of oxidative stress and its effect to antioxidants. A series of experiments has been conducted using male rats (aged 4-6 months, weight 300-400 g) which is grouped based on the time it is exposed to coal dust (size ≤ 5 micron, 15 gram/m³): 2, 5, and 10 minutes, every hour, repeated 6 times for three days. On the fourth day, the rat is sacrificed and malondialdehyde (MDA) and Superoxide dismutase (SOD) concentration is measured by TBA test and NBT on the serum and lung tissue, respectively. The thickness of the rat alveoli wall is measured by lung histology prepared coloured with HE.

The results of this experiment showed an increase in MDA parallel to an increase in coal dust exposure time, both in the serum and lung tissue. The MDA data in the serum is $0,77 \pm 0,07$ (control) , $30,81 \pm 0,061$ (2 minute exposure) , $09 \pm 0,161$ (5 minute exposure) dan $01 \pm 0,22$ (10 minute exposure) ng/ml for the serum, $0,51 \pm 0,103$; $0,8 \pm 0,080$; $94 \pm 0,05$ dan $0,84 \pm 0,03$ ng/gram for the lung tissue, respectively.

MDA measurement showed that coal dust is a free radical that attacks the rat's body, particularly in the lungs. These free radicals that originate from coals has been researched and reported to be mostly hydrogen peroxides.

SOD measurement in serum and lung tissues are as follows: in the serum for the control, 2, 5 and 10 minutes exposure are $51,73 \pm 13,47$; $26,61 \pm 5,22$; $59,87 \pm 3,26$ and $52,46 \pm 4,40$ unit/ml, respectively, and on the lung tissues for those groups are $69,71 \pm 7,13$; $54,93 \pm 9,60$; $62,01 \pm 5,65$ and $68 \pm 4,03$ ng/100 gram, respectively. In this research it is discovered that the SOD concentration of the 2 minute exposure group is initially lower when compared to the control group. After 5 and 10 minutes of exposure, however, the SOD concentration then increase. This shows that SOD initially decreases because it is used to scavenge free radicals. Prolonged exposure to coal dust as a free radical source causes the body to compensate by increasing antioxidants, in this case, SOD.

Histological examination in the lung tissues to measure alveoli wall thickness is done using a computer program in the pathology laboratory PA FKUB. The wall thickness of each group is $37,38 \pm 0,31$; $35,71 \pm 0,62$; $34,20 \pm 0,72$ dan $22,69 \pm 1,66$ μm , respectively.

Based on these measurements, it is discovered that the alveoli wall thickness of the lungs grow thinner parallel to increased coal exposure time.

A temporary conclusion of this experiment is that the coal dust is a free radical agent and causes an increase in MDA concentration in the serum and lung tissues. SOD antioxidants responds to these free radicals, initially by decreasing free radical concentration in the serum and the lung tissues, then followed by an increase in free radicals during the 10th minute of exposure. The condition of the exposure in this experiment is acute. Prolonged exposure is suspected to cause a decrease in SOD, due to the compensatory nature of the SOD increase as a bodily response to free radicals during the 5th and 10th minute of exposure of coal dust

Researches concerning melatonin effect on the rat exposed to coal dust and also related to circadian rhythm of the rat is a part of this research that is currently on going. By the end of this research TNF α , IL-1 dan IL-6 concentration by *bronchial alveolar lavage* (BAL) and the thickness of the lungs alveoli wall in histologic prepartes would be measured.

DAFTAR PUSTAKA

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR); 2002; Toxicological Profile for Beryllium; US Department of Health and Human Services.
- Badan Geologi (BG), 2007, Departemen Energi dan Sumber Daya Mineral Indonesia.
- Dalal NS, Shi X, Vallyathan V; 1988; Role of free radicals in the mechanisms of hemolysis and lipid peroxidation by silica: comparative ESR and cytotoxicity studies. *J Toxicol Environ Health* **29**:307-316
- Gevenois PA, Sergeant G, Maertelaer VD, Gouat F, Yernault JC, Vuyst D; 1998; Micronodules and emphysema in coal mine dust or silica exposure: relation with lung function; *Eur Respir J*; **12**: 1020–1024.
- Ghiasvand M, Heshmat R, Golpira R, Haghpanah V, Soleimani A, Shoushtarzadeh P, Tavangar SM, Larijani B., 2006, Shift working and risk of lipid disorders: A cross-sectional study. *Lipids in Health and Disease* **5**:9.
- Hamidi, -, Pajanan Debu dengan Kejadian Gangguan Pernafasan (Studi terhadap Bayi dan Balita yang tinggal di jalur Transportasi Batubara di Kecamatan Matarama Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan), Tesis S2 Kesehatan Masyarakat Universitas Indonesia (Abstrak).
- Huang C, Li J, Zhang Q, Huang X, 2002, Role of bioavailable iron in coal dust-induced activation of activator protein-1 and nuclear factor of activated T cells, *Am J Respir Crit Care Med* **27**:568-574.
- Kavakh IH, Sancar H., 2002, Circadian photoreception in human and mice. *Molecular Intervention* **8(2)**:484-92.
- Knutsson A, 2003, Health disorders of shift workers. *Occup Med (Lond)* **53(2)**:103-108
- Larsen J; 2004; Coal takes heavy human toll; Earth Policy Institute, USA
- Miller, GT, 1990, Living in the Environment: an introduction to environmental science, Belmont: Wadsworth
- Nadif RP, Auburtin G, Dusch M, Marc Porcher J, Marie Mur J, 1996, Blood Antioxidant enzymes as markers of exposure or effect in coal miners, *Occupational and Environmental Medicine*, **53** :41-45
- Nicholson PJ, D'Auriat DAP, 1999, Shift work; health, the working time regulations and health assessments, *Occup. Med.* **49**: 127-137
- Nugroho SB, 2001, Pengaruh Kegiatan Penambangan Batubara Terhadap Kualitas Udara Ambien, Tesis S2 PPS Universitas Indonesia (abstrak).
- Orem WH, Finkelman RB, 2004, Coal formation and geochemistry. In *Treatise on Geochemistry Volume 7*. Edited by: Mackenzie FT. San Diego, Elsevier Inc. pages 191-222.
- Organiscak JA, Page SJ; 1998; Investigation of coal properties and airborne respirable dust generation; Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention; National Institute for Occupational Safety and Health; Pittsburgh, USA
- Pinho RA, Silveira PCL, Silva LA, Streck EL, Dal-Pizzol F, Moreira JCF: N-Acetylcysteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environ Res* 2005;99:355–360.
- Razi F, 2004, Pengaruh Debu Batubara terhadap Paru Pekerja Tambang Bagian Penggalian BWE System di PT "X", Tesis S2 Ilmu Pengobatan Universitas Indonesia (abstrak).
- Ross MH, Murray J, 2004, Occupational respiratory disease in mining, *Occup Med* **54** : 304-10
- Rylander R, Haglind P, Butcher BT, 1983, Reactions during work shift among cotton mill workers, *Chest* **84**:403-407
- Sharifian A, Farahani S, Pasalar P, Gharavi M, Aminian O, 2005, Shift work as an oxidative stressor, *Journal of Circadian Rhythms* **3**:15.
- Smith KR, Veranth JM, Kodavanti UP, Aust AE, Pinkerton KE, 2006, Acute Pulmonary and Systemic Effects of Inhaled Coal Flay Ash in Rats : Comparison to Ambient Environmental Particles, *Toxicological science* **93** (2), 390-399
- Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Esquifino AI, Pandi-Perumal SR, Miller SC, 2005, Melatonin, immune function and aging, *Immunity & Ageing* **2** (17): 1-10.
- Zheng H, Patel M, Hryniewicz K, Katz SD., 2006, Association of extended shift work, vascular function and inflammatory markers in internal medicine residents: a randomized control trial. *JAMA* **249(6)**:1049-1050.
- Zock JP, Heederik D, Brunekreef B., 1999, Influence of shift work and host factors on endotoxin-related acute peak flow changes, *Am J Respir Crit Care Med* **159**:137–142

