

DISERTASI

MEKANISME PENCEGAHAN INFLAMASI SALURAN NAFAS YANG TERPAJAN UAP METIL METAKRILAT DENGAN PEMBERIAN 1,8-SINEOL

PENELITIAN EKSPERIMENTAL PADA MENCIT (MUS MUSCULUS)



SIANIWATI GOENHARTO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

DISERTASI

**MEKANISME PENCEGAHAN INFLAMASI SALURAN NAFAS YANG
TERPAJAN UAP METIL METAKRILAT DENGAN
PEMBERIAN 1,8-SINEOL**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL PADA MENCIT (MUS MUSCULUS)

SIANIWATI GOENHARTO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

**MEKANISME PENCEGAHAN INFLAMASI SALURAN NAFAS YANG
TERPAJAN UAP METIL METAKRILAT DENGAN
PEMBERIAN 1,8-SINEOL**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL PADA MENCIT (MUS MUSCULUS)

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka

Hari : Selasa
Tanggal : 30 Juni 2020
Pukul : 10.00 WIB

Oleh:

**SIANIWATI GOENHARTO
011617017318**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

**MEKANISME PENCEGAHAN INFLAMASI SALURAN NAFAS YANG
TERPAJAN UAP METIL METAKRILAT
DENGAN PEMBERIAN 1,8-SINEOL**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL PADA MENCIT (MUS MUSCULUS)

TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 30 JUNI 2020

Oleh
Promotor



Prof. Dr. I Ketut Suidiana Drs..M.Si.
NIP. 195507051980031005

Kopromotor



Dr. Sherman Salim, drg., M.S., Sp.Prof(K)
NIP. 195205261978031002

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai
oleh Panitia Penguji Ujian Tahap I (Tertutup)
pada tanggal 11 Nopember 2019**

Panitia penguji:

- Ketua : 1. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort. (K)
- Anggota : 2. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs.,M.Si.
3. Dr. Sherman Salim, drg., M.S., Sp.Pros.(K)
4. Prof. Dr. Edi Widjajanto, dr., MS.,Sp.PK.(K)
5. Prof. Dr. Siswandono, Apt, MS.
6. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes.
7. Dr. Daniel Maranatha, dr.,Sp.P.(K).

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
tentang Panitia Ujian Tahap Pertama (Tertutup)
Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran
Nomor: 381/UN3.1.1/KD/2019
Tanggal: 11 Nopember 2019

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, Pengasih dan Penyayang atas berkat dan karuniaNya sehingga penulisan disertasi ini dapat diselesaikan. Penelitian dan disertasi ini dapat dilaksanakan dan diselesaikan atas bimbingan, arahan, bantuan, saran dan perbaikan dari banyak pihak. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang tulus serta penghargaan setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs.,M.Si., atas kesediaan menjadi pembimbing akademik dan promotor yang dengan penuh kesabaran serta keikhlasan memberikan dorongan, dukungan, bimbingan, serta pemikiran dan inspirasi kehidupan yang sangat berharga selama saya menjalani program pendidikan doktor.

Dr. Sherman Salim, drg., M.S., Sp.Pros(K), atas kesediaan menjadi ko-promotor yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dengan penuh kesabaran, menyemangati dan memberikan dorongan hingga terselesaikannya disertasi ini.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Nasih, SE, MT, Ak, CMA atas kesempatan dan bantuan yang telah diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan pada Program Studi Ilmu Kedokteran jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Prof Dr Soetojo, dr., Sp.U (K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga , beserta para Wakil Dekan: Prof. Dr. David S.Perdanakusuma, dr.,Sp.BP-RE (K), Prof. Dr. Budi Santoso, dr, Sp.OG.(K), dan Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr.,MS., Sp.MK.(K) yang telah memberi kesempatan, dan fasilitas untuk mengikuti dan menyelesaikan program pendidikan doktor.

Prof. Dr. Widi Hidayat, SE., MSi, Ak.,CMA,CA selaku Dekan Fakultas Vokasi Universitas Airlangga, beserta para Wakil Dekan: Prof. Dr. Retna Apsari, MSi , Dr Ari Prasetyo, SE.,MSi dan Dr. Imam Susilo, dr.Sp.PA (K), FISCM yang telah memberikan kesempatan, dukungan dan fasilitas untuk mengikuti pendidikan jenjang doktor.

Prof. Dr. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp.PD-KR, FINASIM, selaku Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor, yang telah memberi kesempatan dan arahan yang sangat berharga dalam mengikuti studi di program pendidikan doktor.

Eny Inayati, drg, M.Kes selaku Ketua Departemen Kesehatan dan Sri Redjeki Indiani, drg., M.Kes selaku Koordinator Program Studi Teknik Gigi Fakultas Vokasi Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan dan dorongan untuk mengikuti pendidikan jenjang doktor.

Prof. Dr. Edi Widjajanto, dr., MS.,Sp.PK.(K), selaku penguji eksternal, yang telah bersedia menjadi penguji di tengah kesibukan beliau, yang telah membimbing dengan penuh kesabaran, memberi ilmu, mendukung dan mencari solusi bagi disertasi ini

Prof. Dr. Siswandono, Apt, MS., selaku penguji, yang telah membimbing dengan penuh kesabaran, membagikan ilmu yang sangat berharga, mendukung dan mencarikan solusi demi selesainya disertasi ini

Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes., selaku penguji, yang di tengah kesibukan beliau yang begitu padat, telah membimbing dengan penuh kesabaran, memberi ilmu, memberi banyak masukan , konsultasi statistik dan mencarikan solusi demi selesainya disertasi ini.

Dr. Daniel Maranatha, dr.,Sp.P.(K), selaku penguji, yang telah membimbing dengan penuh kesabaran, memberi ilmu, mendukung dan mencarikan solusi demi selesainya disertasi ini

Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort.(K), selaku penguji, yang telah membimbing dengan penuh kesabaran, memberi masukan yang berharga, mendukung dan selalu menyemangati demi selesainya disertasi ini

Prof. Dr. A. Retno Pudji Rahayu, drg.,M.Kes. dan Dr. Daniel Haryono Oetomo, drg., Sp. Ort. yang telah banyak membantu, memberi ide, memberi masukan dalam penyusunan disertasi ini

Dr Willy Sandhika, dr., MSi., Sp.PA.(K), Christina Destri Wiwis Wijayanti S.Si., M.Imun, Endah Sujani, S.Si, Ayundha Rizky F, S.KM yang telah banyak membantu dalam proses penelitian, terutama dalam pemeriksaan HPA dan imunohistokimia.

Seluruh staf pengajar Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu selama proses pendidikan.

Seluruh staf Program Studi Teknik Gigi: Sonya Harwasih, drg.,M.Kes, Rinda Mahalistiyan, drg.,M.Kes, Sri Wahjuni, drg.,M.Kes, Elly Rusdiana, drg.,M.Kes, Okti Setyowati, drg.,M.Kes, Endang Kusdaryanti, drg.,M.Kes, Sujati, drg.,M.Kes, Mia Laksmi Lita Rosa, drg.,M.Kes, Dwiyantri Feriana Ratwita, drg.,M.Kes, beserta seluruh tenaga kependidikan yang telah memberikan dukungan, pengertian yang dalam dan kerjasama yang baik selama saya menempuh pendidikan doktor.

Seluruh staf dan tenaga kependidikan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah banyak membantu dan melayani dengan sabar selama pendidikan yang saya tempuh.

Seluruh pegawai di laboratorium hewan coba, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah banyak membantu dalam proses penelitian

Seluruh staf di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah banyak membantu dalam pembuatan preparat penelitian

Teman-teman peserta Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga angkatan 2016, yang saling mendorong, membantu dan menyemangati, Terima kasih atas kekompakan dan pertemanannya.

Ucapan terima kasih, rasa hormat sebesar-besarnya bagi orang tua tercinta Bp. Goenharto (alm) dan Ibu Swandadari (alm), serta mertua tercinta Bp Januar Tjandra (alm) dan Ibu Ratna Handayani (alm) atas kasih sayang, doa dan cinta yang telah diberikan kepada saya.

Suami tercinta Henryadi Tjandra, serta anak & menantu tersayang Ryan Raditya Tjandra, drg, Sp Ort. - Anneke Paramita Adityatama, drg., Sp.Perio dan Ray Rinaldi Tjandra, B.A.(Hons) yang telah mendukung dan mendorong untuk mengikuti pendidikan doktor.

Saudara Gunawan Hartono, Drs Gunarso Wibowo, Ir Utami, Ir Honggowati, Liliany drg, SpKG beserta keluarga, terima kasih atas dukungan dan doa yang sudah dipanjatkan. Saudara ipar Hildawati Tjandra, Luciawati Tjandra dan Inneke Tjandra beserta keluarga, atas doa dan dukungannya selama saya menempuh pendidikan doktor.

.Semua pihak yang telah memberikan bantuan berupa apapun baik dalam pelaksanaan penelitian ataupun penulisan disertasi yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Semoga Tuhan Yang Maha Kasih senantiasa melimpahkan berkat dan anugerahNya kepada kita semua. Amin.

Surabaya, 30 Juni 2020

RINGKASAN

**MEKANISME PENCEGAHAN INFLAMASI SALURAN NAFAS YANG
TERPAJAN UAP METIL METAKRILAT
DENGAN PEMBERIAN 1,8-SINEOL**

Bahan akrilik, khususnya jenis *self curing* sampai saat ini masih banyak dipakai dalam kedokteran gigi. Bahan akrilik terdiri dari bubuk polimetil metakrilat dan cairan monomer metil metakrilat (MMA). Efek toksik akrilik lebih disebabkan oleh cairan monomer karena polimer bersifat lebih inert. Monomer MMA merupakan cairan yang mudah menguap dengan bau menyengat. Teknisi gigi yang bekerja dengan monomer akrilik dapat menghirup uap MMA, demikian juga orang yang berada di sekitarnya. Studi terdahulu menunjukkan bahwa MMA dapat menimbulkan efek negatif bagi kesehatan, diantaranya menyebabkan pneumonitis hipersensitiviti dan meningkatkan resiko asma, simtom nasal dan batuk. Rute paparan MMA yang paling penting adalah melalui inhalasi.

Setelah memasuki tubuh, molekul MMA berinteraksi dengan target nukleofilik dalam sel, sehingga terbentuk *reactive oxygen species* (ROS). Apabila jumlah ROS melebihi pertahanan antioksidan tubuh, maka stres oksidatif terjadi dan dapat menyebabkan penurunan viabilitas sel, Lipid peroksidasi sebagai indikator stres oksidatif sistemik dapat dinilai melalui pengukuran terhadap *malondialdehyde* (MDA), sedangkan detoksifikasi radikal bebas dilakukan oleh enzim antioksidan seperti *superoxide dismutase* (SOD) dan *catalase* (CAT).

Adanya dampak negatif pajanan uap monomer MMA memerlukan suatu tindakan pencegahan, salah satunya dengan pemberian bahan antioksidan. 1,8-Sineol, merupakan suatu oksida dan suatu eter, suatu bahan aktif mengandung antioksidan dan banyak dikandung oleh *Eucalyptus globulus*, terbukti mampu menghambat

produksi ROS, menurunkan aktifitas NF- κ B *in vitro*. menghambat TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, serta meningkatkan sitokin anti inflamasi IL-10.

Tujuan penelitian adalah menjelaskan mekanisme pencegahan inflamasi saluran nafas yang terpajan uap MMA dengan pemberian inhalasi 1,8-sineol, dengan menganalisis jumlah sel epitel yang mengekspresikan SOD, CAT dan MDA, serta jumlah sel makrofag yang mengekspresikan NF- κ B, IL-8, IL-10 serta jumlah neutrofil.

Penelitian *true experimental* laboratorium ini memakai sampel 30 ekor mencit, dibagi 5 kelompok yaitu kelompok kontrol normal (K0), kelompok kontrol negatif (K1) dan kelompok perlakuan yang diberi 1,8-sineol (P1, P2 dan P3). Mencit dimasukkan dalam kandang kaca yang berisi uap MMA 150 ppm dan telah dinebulasi uap 1,8 sineol (5 mg, 10 mg dan 15 mg), selama 120 menit. Setelah itu mencit diterminasi dan jaringan saluran nafas (paru) diambil. Pengamatan ekspresi SOD, CAT, MDA dilakukan pada epitel, sedangkan pengamatan NF- κ B, IL-8, dan IL-10 dilakukan pada makrofag; dengan pemeriksaan imunohistokimia, sesuai dengan petunjuk pelaksanaan pada kit imunohistokimia dengan metode indirek. Pengamatan inflamasi jaringan dilakukan pada preparat HE dengan menghitung banyaknya neutrofil pada lapangan pandang yang berukuran 200x200 mikro meter persegi. Data berdistribusi normal dianalisis dengan uji *Oneway Anova* dan yang tidak normal dengan uji Kruskal Wallis. Apabila data normal tetapi tidak homogen, maka dilakukan uji Brown-Forsythe dilanjutkan dengan uji Games Howell. Selain itu dilakukan uji *in silico* menggunakan program *Molegro Virtual Docker* (MVD) 5.5.

Penelitian *in silico* menunjukkan bahwa *Moldoc score* 1,8-sineol (-49,1236) lebih rendah dari ligan diklofenak/ COX-2 (-106,8010) , demikian juga *Moldoc score* 1,8-sineol (-42,7930), lebih rendah dari ligan TLR-2/ CAS_673 (-56,5640).

Pajanan MMA meningkatkan ekspresi SOD, MDA, IL-8 dan jumlah neutrofil secara bermakna ($p < 0,05$), tetapi ekspresi CAT tidak berbeda bermakna. Pajanan MMA juga menurunkan ekspresi IL-10 secara bermakna ($p < 0,05$). Pemberian 1,8-sineol 5 mg, 10, mg dan 15 mg mampu menurunkan SOD, CAT, MDA sehingga tidak berbeda dengan kelompok kontrol normal. Hanya pada dosis 15 mg, pemberian 1,8-sineol mampu menurunkan ekspresi NF- κ B sehingga menjadi tidak berbeda dengan kelompok kontrol normal. Pada dosis 5 mg dan 10 mg sudah terjadi penurunan ekspresi NF- κ B yang berbeda bermakna dengan kelompok kontrol MMA, tetapi juga masih berbeda bermakna dengan kelompok kontrol normal. Pemberian 1,8-sineol 10 dan 15 mg menurunkan ekspresi IL-8 sehingga menjadi berbeda bermakna dengan kontrol MMA, tetapi belum mencapai kondisi seperti kontrol normal. Pemberian 1,8-sineol 5 mg meningkatkan ekspresi IL-10, tetapi masih berbeda bermakna dengan kelompok kontrol normal. Pada dosis 10 mg dan 15 mg, terjadi peningkatan ekspresi IL-10 sehingga menjadi tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol normal. Pada pemberian 1,8-sineol 5 mg, 10 mg dan 15 mg sudah terjadi penurunan jumlah neutrofil, meskipun masih didapatkan perbedaan yang bermakna baik dengan K0 maupun K1 ($p < 0,05$).

Kesimpulan: 1,8-sineol mempunyai potensi anti inflamasi secara *in silico* dengan menghambat enzim COX-2 dan TLR-2 dan secara *in vivo* mampu meregulasi ekspresi SOD, CAT, menurunkan MDA, IL-8 serta meningkatkan IL-10 pada jaringan saluran nafas mencit yang terpajan uap MMA, khususnya pada dosis 15 mg. Mekanisme terjadinya inflamasi saluran nafas akibat pajanan MMA adalah melalui peningkatan MDA, penurunan IL-10, peningkatan NF- κ B, peningkatan IL-8 dan selanjutnya peningkatan neutrofil. Mekanisme efek pencegahan inflamasi saluran nafas akibat pajanan MMA dengan pemberian 1,8-sineol adalah melalui penurunan MDA,

penurunan IL-8 dan penurunan neutrofil atau melalui CAT dan kemudian penurunan MDA, penurunan IL-8 dan penurunan neutrofil.

Temuan baru pada penelitian ini adalah: (1) ada potensi anti inflamasi 1,8-sineol secara *in silico* (2) mekanisme terjadinya inflamasi saluran nafas akibat pajanan MMA dan (3) mekanisme efek pencegahan inflamasi saluran nafas akibat pajanan MMA dengan pemberian 1,8-sineol.

SUMMARY***PREVENTION MECHANISM OF AIRWAY INFLAMMATION THAT EXPOSED TO METHYL METHACRYLATE BY 1,8-CINEOLE INHALATION***

Self-curing acrylic is still widely used in dentistry. Acrylic material consists of poly methyl methacrylate powder and methyl methacrylate (MMA) liquid monomer. Toxic effects of acrylic are more caused by liquid monomers because polymers are more inert. MMA monomers are volatile liquids with a pungent odor. Dental technicians who work with acrylic monomers can inhale MMA vapor, as can people around them. Experimental and clinical previous studies have showed that MMA may cause a wide range of adverse health effects, such as hypersensitivity pneumonitis and increase the risk of asthma, nasal symptoms and coughing. The most important occupational exposure route of MMA is by inhalation.

After entering the body, MMA molecules interact with nucleophilic targets in cells, thus forming reactive oxygen species (ROS). If the amount of ROS exceeds the body's antioxidant defenses, oxidative stress occurs and can cause decreased cell viability. Lipid peroxidase as an indicator of systemic oxidative stress can be assessed through measurement of malondialdehyde (MDA), while free radical detoxification is carried out by antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT).

*The negative impact of MMA monomer vapor exposure requires a precautionary measure, one of which is by providing antioxidants. 1,8- cineole, an oxide and ether, an active ingredient that contains antioxidants and many of which are contained in *Eucalyptus globulus*, has been shown to inhibit ROS production, reduce*

the activity of NF- κ B in vitro, inhibits TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, and increases anti-inflammatory cytokines IL-10.

The purpose of this study is to explain the prevention mechanism of airway inflammation that exposed to MMA vapor by 1,8-cineole inhalation, by analyzing the number of epithelial cells expressing SOD, CAT and MDA, as well as the number of macrophage cells expressing NF- κ B, IL-8, IL-10 and neutrophil counts.

This research was a true experimental laboratory study. Samples of 30 mice were divided into 5 groups, namely the normal control group (K0), negative control group (K1) and the treatment group were given 1,8- cineole vapor (P1, P2 and P3). Mice were placed for 120 minutes in a glass cage containing 150 ppm MMA vapor that has been nebulated by 1.8-cineole vapor (5 mg, 10 mg dan 15 mg). After that, the mice were terminated and lung tissue was removed. Observation of the expression of SOD, CAT, MDA, NF- κ B, IL-8, and IL-10 was carried out by immunohistochemical examination, according to the implementation instructions on the immunohistochemical kit by the indirect method. Observation of tissue inflammation was carried out in the HE preparation by calculating the number of neutrophils in the field of view measuring 200x200 micro square meters. Normally distributed data were analyzed by the Oneway Anova test and abnormal distributed data was analyzed by the Kruskal Wallis test. If the data were normal but not homogeneous, then the Brown-Forsythe test was carried out followed by the Games Howell test. In addition, in silico tests were carried out using the Molegro Virtual Docker (MVD) 5.5 program

In silico study showed that 1,8-cineole Moldoc score (-49,1236) was lower than diclofenac / COX-2 (-106.8010) ligands, as well as 1,8- cineole Moldoc score (-42.7930) was lower than TLR-2 / CAS_673 (-56,5640) ligand.

MMA exposure significantly increased SOD, MDA, IL-8 and neutrophil counts ($p < 0.05$), but CAT expression was not significantly different. MMA exposure also significantly reduced IL-10 expression ($p < 0.05$). Administration of 1,8-cineole 5 mg, 10 mg and 15 mg can reduce SOD, CAT, MDA so that it was not different from K0 group. Only at a dose of 15 mg, 1,8-cineole was able to reduce the expression of NF- κ B so that it did not differ from K0 group. At doses of 5 mg and 10 mg there was a decrease of NF- κ B expression which was significantly different from the MMA control group, but it was also still significantly different from the normal control group. Administration of 10 and 15 mg 1,8-sineol could decrease IL-8 expression, which was significantly differed with both MMA control group and normal control group. Administration of 1,8-sineol 5 mg increased expression of IL-10, but was still significantly different from the normal control group. At doses of 10 mg and 15 mg, there was an increase in IL-10 expression so that it did not differ significantly from the normal control group. Administration of 1,8-cineole 5 mg, 10 mg and 15 mg has decreased the number of neutrophils, although significant differences were still found with both K0 and K1 ($p < 0.05$).

It is concluded that 1,8-cineole has been predicted to have anti-inflammatory potential by COX-2 and TLR-2 inhibition. 1,8-Cineole can regulate the expression of SOD, CAT, decrease MDA, IL-8 and increase IL-10 in lung tissue of mice exposed to MMA vapor, especially at a dose of 15 mg. The mechanism of airway inflammation due to MMA exposure is through MDA increase, IL-10 decrease, NF- κ B increase, IL-8 increase and subsequently an increase in neutrophils. The mechanism of the effect of 1,8-cineole on airway inflammation due to MMA exposure is through MDA decrease, IL-8 decrease and subsequently a decrease in neutrophil; or through CAT and then MDA decrease, IL-8 decrease and subsequently a decrease in neutrophil counts.

The new findings in this study are: (1) 1,8-cineole has anti-inflammatory potential in silico (2) the mechanism of airway inflammation due to MMA exposure and (3) the mechanism of airway inflammation prevention due to MMA exposure by 1,8-cineole.