

DISERTASI

PENGARUH PARTIKEL Pb YANG TERKANDUNG DALAM GAS BUANG MOTOR BAHAN BAKAR PREMIUM TERHADAP RESPONS IMUN MUKOSAL SALURAN PERNAPASAN

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL PADA MENCIT BALB/ C DENGAN
PARADIGMA IMUNOPATOBIOLOGIS**



SUDARSO



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

**PENGARUH PARTIKEL Pb YANG TERKANDUNG DALAM
GAS BUANG MOTOR BAHAN BAKAR PREMIUM TERHADAP
RESPONS IMUN MUKOSAL SALURAN PERNAPASAN**

**PENELITIAN EKSPERIMENTAL PADA MENCIT BALB/ C DENGAN
PARADIGMA IMUNOPATOBIOLOGIS**

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
dan telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari Selasa
Tanggal 26 Pebruari 2002
Pukul 10.00 WIB.



Oleh :

SUDARSO
NIM. 099813118 D

Lembar Pengesahan

Disertasi ini telah disetujui

Tanggal 14 Maret 2002

Oleh

Promotor



Prof. Eddy Pranowo Soedibyo, dr, MPH
NIP 130 162 027

Ko Promotor I



Prof. Dr. Pitono Soeparto, dr, SpA(K)
NIP. 130 206 153

Ko Promotor II



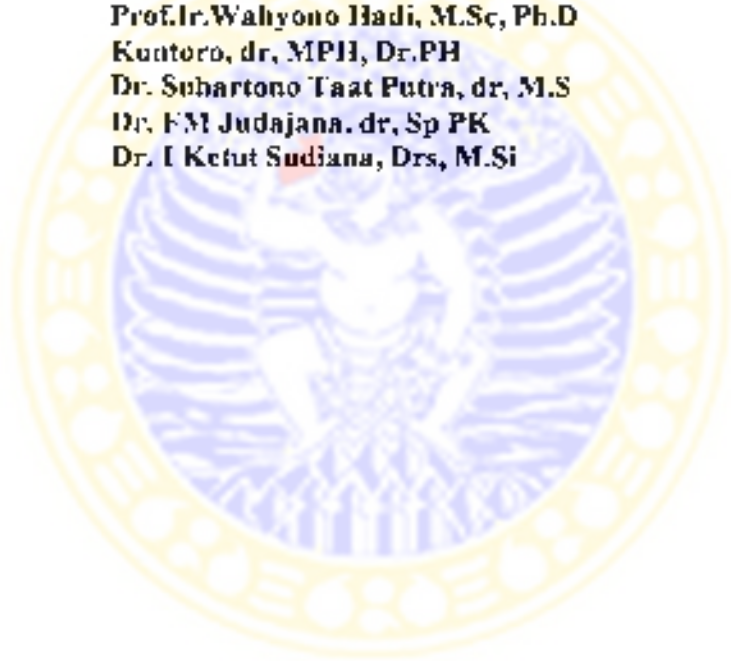
Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS
NIP. 130 934 628

**Telah dinjil pada ujian Doktor Tahap I (Tertutup)
Tanggal 12 Desember 2001**

PANITIA PENGUJI DISERTASI TAHAP I

Ketua : Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr, SpP(K)

**Anggota : Prof. Eddy Pranowo Soedibyo, dr, MPH
Prof. Dr. H. Pitono Suparto, dr, SpA(K)
Prof. Ir. Wahyono Hadi, M.Sc, Ph.D
Kuntoro, dr, MPH, Dr. PH
Dr. Subartono Taat Putra, dr, M.S
Dr. FM Judajana, dr, Sp PK
Dr. I Ketut Suidiana, Drs, M.Si**



**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 11461/JO3/PP/2001
Tanggal: 21 Desember 2001**

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya panjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan limpahan hidayah kepada saya, sehingga saya mendapat petunjuk dan kekuatan lahir serta bathin untuk menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi ini.

Pada kesempatan ini, perkenankanlah saya menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang setulusnya kepada yang terhormat:

Prof. Edy Pranowo Soedibyo, dr, MPH atas kesediaan beliau menjadi Promotor, dalam kesibukan beliau yang sangat padat, masih berkenan meluangkan waktu untuk membimbing, memberi petunjuk dan dorongan moral, dan dengan penuh kesabaran. Beliau dengan penuh kebapaan menumbuhkan rasa percaya diri dan semangat atas ilmu pengetahuan yang saya tekuni, sehingga saya tumbuh semangat dan percaya diri diikuti dengan segala usaha dan doa.

Prof. Dr. Priono Soeparto, dr, SpA(K), atas kesediaan beliau menjadi Ko Promotor I. Beliau banyak memberikan pengetahuan imunologi mukosal, mulai dari kerangka dasar, sampai memberikan referensi yang tepat untuk penulisan disertasi ini. Di tengah kesibukan yang padat, beliau masih berkenaan meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan penelitian yang saya lakukan. Beliau selaku Pimpinan GRAMIK (Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran) Fakultas kedokteran Unair-RSUD Dr. Soetomo, yang mengizinkan saya menggunakan semua fasilitas di Laboratorium Patobiologi.

Dr. Subartono Taat Putra, dr, MS, atas kesediaan beliau menjadi Ko Promotor II, Beliau dengan sabar dan tak kenal waktu membimbing saya, baik bersifat substansial ke ilmunan, maupun dorongan moral, sehingga saya mempunyai semangat dan motivasi terus, dan mempunyai kepercayaan diri. Di samping hal tersebut, beliau selalu memberi kesempatan mengikuti seminar Psikoneuroimunologi-imunopatobiologi, sehingga sangat berguna dalam membuka wawasan yang luas terhadap ilmu yang saya tekuni.

Pemerintah Republik Indonesia, khususnya Departemen Pendidikan Nasional, khususnya Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, yang memberikan bantuan beasiswa BPPS, yang sangat bermanfaat bagi penyelesaian studi-S-3 ini.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr Med Puruhito, dr, SpB/TKV, Prof. H. Soedarto, dr, DTM&H, Ph.D, mantan Rektor Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Pendidikan Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr H. Muhammad Amin, dr, SpP(K), Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr H. Soedijono Tirtowidardjo, dr, SpTHT(K), mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaff, dr, MS, SpPA, FIAC, selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran S-3 Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah membantu dalam kelancaran proses pelaksanaan ujian kualifikasi, ujian proposal dan disertasi

Prof. Wahyono Hadi, Ir, M.Sc, Ph.D, Guru Besar Teknik Lingkungan Institut Teknologi 10 Nopember Surabaya (ITS), sebagai konsultan, yang dengan sabar memberi saran dan pemecahan teknis, disamping memberi dorongan moral tiada henti kepada saya, agar menyelesaikan disertasi ini.

Widodo JP, dr, MS, MPH, Dr PH, konsultan bidang metodologi, yang dengan teliti membimbing saya dengan penuh kesabaran.

Kuntoro, dr, MPH, Dr.PH, yang telah membimbing dalam metodologi dan mengartikan hasil analisis statistik.

Dr. I Ketut Suidiana, Drs, M.Si, sebagai konsultan, yang dengan penuh ketekunan, kesabaran, memberi bekal ilmu dan teknologi laboratorium imunologi, konsep dasar imunologi serta membantu sebagai pengamat ke 2 dalam penelitian ini, dan memberi dorongan moral kepada saya.

Staf pengajar Program pascasarjana Universitas Airlangga di Semester I, II, dan III tahun 1998/1999, Prof. H Bambang Rahino Setokoesome, dr, Prof.Purnomo Suryohudoyo, dr; Prof.Edy Pranowo Soedibyo, dr, MPH; Prof. Dr. Pitono Soeparto, dr, SpA(K), Prof. Dr. Josep Glinka, SVD; Prof. Dr. Koento Wibisono, Widodo JP, dr, MS, MPH, Dr(PH); Fuad Amsyari, dr, MPH, PhD;Dr.Suhartono Taat Putra, dr, MS; Siti Pariani, dr,MS, PhD; Prof.Dr M.Zainuddin, Apt, Prof.Dr. Samanu, drh, MS; Prof. Soetandyo Wignyosoebroto, MPA; Dr. L.Dyson, Drs, MA; Prof. Rachmat Santoso, dr, SpPA; Prof. Dr. Konthen, dr, SpPD, Prof. Dr. Yoes Priyatna Dachlan, dr, M.Sc;Prof.H.Santoso,dr; Dr. I Ketut Suidiana, Drs, M.Si, Prof.Dr. Thomas Kardjito, dr, SpP; Prof.H. Soeprapto As, dr, DPH; Dr FM Judayana, dr, SpPK(K); Dr Irwan Setiabudi, dr,

SpFK(K); Dr.Edy Bagus Wasito, dr, MS, yang telah memberi bekal berbagai ilmu pengetahuan yang sangat berguna bagi pelaksanaan penelitian dan penulisan disertasi ini. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada Ibu Titin, Dra dan staf, yang memberi pengajaran Bahasa Jepang.

Perkenan pula pada kesempatan ini saya menyampaikan ucapan rasa terima kasih kepada:

Prof.Dr.H. Rochiman Sasmita, drh, MS, MM selaku Koordinator Kopertis Wilayah VII Propinsi Jawa Timur, yang telah memberi rekomendasi untuk mengikuti pendidikan S-3 di Pasasajana Universitas Airlangga.

Prof. Yudono Soewarno, Ir, Rektor Institut Teknologi Pembangunan Surabaya (ITPS) yang memberi kesempatan pada awal pendidikan saya dan memberi ijin saya mengambil pendidikan S-3 di Pasca Sarjana Unair.

Prof. H.Bambang Rahino Setokoesome, dr, selaku Rektor Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, yang telah bersedia memberi bimbingan.

Kepala Pusat Veterinaria Farma Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Produksi Peternakan Surabaya, khususnya Kepala Bagian Tata Usaha, Hardono, drh.

Imam Surjanto, Drh, M.Kes, Kepala Instalasi Kandang Hewan Coba Pusvetma Surabaya, yang dengan sabar dan teliti membantu saya dalam pelaksanaan penelitian, mulai paparan sampai pembedahan hewan. Terima kasih kepada Bpk Sutjipto dan Bpk Supardi yang memelihara hewan coba mencit mulai persiapan sampai pelaksanaan penelitian selesai.

Kepada guru saya sewaktu di SDN 43, SMPN 6, SMAN 1 di Surakarta, yang telah mendidik saya dengan penuh disiplin, kesabaran sebagai bekal untuk ke jenjang pendidikan yang lebih tinggi.

Edy Wahyu Pudjiyanto, Ir, Plh Kepala Balai Teknik Kesehatan Lingkungan Surabaya, yang memberi ijin meminjamkan alat dan melakukan pengukuran sampel udara oleh staf, selama 30 hari.

Bapak Afan, petugas Laboratorium Institut Teknologi 10 Nopember Surabaya (ITS), yang secara rutin membantu teknis dalam teknologi paparan, sehingga paparan gas buang sesuai tujuan penelitian, dan Khambali, ST, MPPM, yang membantu dalam menyiapkan bahan kimiawi dalam penelitian ini

Seluruh teman di Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga angkatan tahun 1998/1999, yang selalu memberi bantuan mulai perkuliahan, sampai penulisan disertasi ini.

Semua pihak yang telah membantu saya, sehingga dimungkinkan disertasi ini dapat diselesaikan. Semoga Allah SWT membalas semua budi baik yang telah diberikan kepada saya dalam penyelesaian disertasi ini.

Akhirnya pada kesempatan ini saya sampaikan rasa hormat dan kasih sayang kepada

Kedua orang tua saya, Ayahanda Moestamat Sastrodiharjo(Alm), Ibunda Oemi Salamah (Alm), yang telah mendidik saya dengan tulus dan penuh doa, sehingga saya bisa mengikuti pendidikan sampai ke jenjang doktor, walaupun beliau berdua tidak sempat menyaksikan keberhasilan saya. Semoga Allah SWT

RINGKASAN

Kondisi udara akan mempengaruhi kondisi kesehatan pernapasan yang menghirup, terutama masyarakat kota, karena faktor adanya pencemaran udara (Stoldt, 1974; Fuggle RF, 1992; Ray BT, 1995; Aditama, 2001). Salah satu penyebab utama pencemaran udara di kota adalah asap kendaraan bermotor yang mengandung partikel Pb, yang membahayakan kesehatan (Bailey, 1978; Palar, 1994; KPBB, 2001). Kondisi tersebut diatas dapat menjadi salah satu pemicu dalam menurunkan respons infeksi akut saluran pernapasan. Fakta menunjukkan, bahwa di daerah perkotaan di wilayah Propinsi Jawa Timur, seperti di Surabaya jumlah penderita penyakit infeksi saluran pernapasan lebih tinggi dibanding di daerah lain (Din. Kes. Prop. Jatim, 2000; Din. Kes. Kota Surabaya, 2000). Sebagai pintu awal masuk gas buang ke dalam tubuh adalah saluran pernapasan, dan pula induksi awal pada saluran pernapasan dapat mempengaruhi sistem imun mukosal. Partikel Pb selain ada yang menginduksi sistem imun mukosal, karena diameter partikel dapat langsung masuk ke alveoli (Chanlett, 1979; Lu, 1995). Sejauh ini, pengaruh paparan partikel Pb melalui inhalasi terhadap mekanisme berupa imunopatobiogenesis respons imun mukosal saluran pernapasan belum terungkap dengan jelas.

Nilai ambang konsentrasi partikel Pb di udara adalah $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (PP 41, 1999), namun di wilayah Jawa Timur nilai ambang batas lebih tinggi, yaitu sebesar $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (SK. Gub. Jatim No. 129, 1996). Di Surabaya, konsentrasi

partikel Pb melebihi ambang batas $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$, bahkan ada yang melebihi ambang batas $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$, yaitu dalam kisaran $>2\mu\text{g}/\text{m}^3$ sampai $80,95 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (BTKL, 1996; Sarudji, 1998, Purwanto, 2001). Potensi paparan Pb di udara, akan selalu meningkat, melihat fakta jumlah kendaraan bermotor yang cenderung meningkat rerata per tahun 5-9 %, baik di Jakarta ataupun di Surabaya (Direktorat LL Kepolisian RI, 1999; Bappeda dan BPS Surabaya, 1999), sedangkan konsumsi bensin di Indonesia 95,47 % adalah bensin jenis premium, yang mengandung Pb (Nukman, 2001). Sumber paparan Pb selain dari kendaraan bermotor, adalah industri pertambangan peleburan sekunder, incenerator, batubara yang mengandung Pb rendah, kegiatan industri yang menghasilkan besi dan baja, dan pemakaian cat. Partikel Pb konsentrasi $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ terbukti mengganggu fungsi makrofag alveolar (Bingham, 1973), dan pada konsentrasi $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ menimbulkan kerusakan makrofag alveolar, berupa fungsi fagositosis tertekan (Zelikoff, 1993). Pengungkapan mekanisme respons imun mukosal saluran pernapasan dalam konsentrasi rendah pada kisaran $>2 - <10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ akan memberikan gambaran kondisi sebelum terjadinya gejala klinis, untuk tindakan pencegahan.

Beberapa penelitian Pb dilakukan dengan pendekatan toksisitas, yang melihat gangguan yang sistemik dan merusak, namun ada penelitian yang melihat pengaruh respons imun pada saluran pencernaan dan menimbulkan gangguan imunologi sistemik (Mustaina, 1998; Blakely, 1981; Razani, 1999; Heoy, 1998). Pada penelitian ini, peneliti ingin melihat pengaruh yang terjadi dengan konsentrasi yang diduga akan menimbulkan induksi awal sebelum kejadian

gangguan klinis, berdasar konsentrasi ambang batas yang dianjurkan 2 ug/m^3 dan konsentrasi kejadian gangguan fungsi sel makrofag alveolar 10 ug/m^3 atau dalam kisaran $>2 \text{ ug/m}^3 - < 10 \text{ ug m}^3$. Kondisi mukosal saluran pemapasan, tidak mempunyai struktur dan fungsi berbeda dengan mukosal saluran pencernaan dalam respons imun lokal (Bienenstock, 1999), oleh sebab itu peneliti dalam penelitian ini mengabstraksikan kemungkinan akan terjadi di mukosal saluran pernapasan, dengan paradigma imunopatobiologis dengan konsep Pb sebagai stresor, dengan tujuan untuk menjelaskan imunopatobiogenesis respons imun mukosal saluran pemapasan, guna melihat respons imun lokal yang tidak lazim atau menyimpang karena sel imunokompeten yang mengalami stress akibat paparan partikel Pb tersebut.

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimen di hewan dengan rancangan yang digunakan adalah *the post test only control group design*. Alasan menggunakan rancangan disain ini adalah karena semua karakteristik antar unit populasi sama atau homogen dalam hal ini adalah populasi mencit Balb/c dengan karakteristik yang sama, dan untuk kelompok perlakuan dan kontrol memperoleh perlakuan periode waktu yang sama yaitu 30 hari. Paparan berasal dari sumber gas buang motor berbahan bakar premium yang sama dengan pengaturan debit gas, agar mendapatkan konsentrasi partikel Pb dalam kisaran $>2 \text{ ug/m}^3 - < 10 \text{ ug/m}^3$. Untuk kelompok kontrol di hilangkan partikel Pb dengan dilewatkan larutan Ca(OH)_2 25%.

Variabel penelitian untuk mengamati respons imun mukosal saluran pemapasan, adalah sel T- CD4 (ST-CD4), sel T- CD8(ST-CD8), sel T penghasil-

IL-2 (STpIL-2), sel Tpenghasil- IL-4(STpIL-4), sel plasma penghasil – IgA (SPIgA), dan deposit Pb di makrofag alvaeolar. Diharapkan dari beberapa variabel tersebut dapat menggambarkan pola respons imun mukosal saluran pernapasan dan keberadaan partikel Pb di makrofag alvaeolar akibat paparan partikel Pb yang terkandung dalam gas buang berbahan bakar premium.

Pengujian hipotesis untuk menjawab tujuan penelitian, dengan uji homogenitas, uji normalitas, uji beda antar - kelompok, dan analisis diskriminan untuk menentukan kelompok yang mempunyai peran variabel yang bermakna, dan pembuatan pola respons imun mukosal saluran pernapasan bagi variabel tersebut.

Dari hasil penelitian , paparan partikel Pb dalam kisaran $>2 \text{ ug/m}^3$ - $<10 \text{ ug/m}^3$, menyebabkan respons imun mukosal saluran pernapasan, khususnya di daerah BALT, mengarah ke respons imun seluler, dengan dibuktikan, bahwa variabel yang berperan bermakna adalah ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2. Kondisi tersebut secara teoritis, ada indikasi kecenderungan menuju ke DTH(*Delayed Type Hypersensitivity*) Disamping hal tersebut ada suatu aktifitas gangguan keseimbangan imunopatobiologik sel Th1 dan sel sel Th2, yang menunjukkan regulasi yang tidak normal, sesuai paradigma Th1/Th2. Diketahui pula, bahwa deposit partikel Pb cukup bermakna pada kelompok perlakuan, hal ini membuktikan, bahwa dengan konsentrasi partikel Pb di udara $>2 \text{ ug/m}^3$ - $<10 \text{ ug/m}^3$, waktu paparan 3 jam/hari selama 30 hari sudah menunjukkan adanya partikel Pb yang bermakna pada makrofag alvaeolar, karena sifat partikel Pb

yang dapat terdeposit kumulatif, maka dimungkinkan dapat mempunyai kecenderungan terjadinya fibrosis dalam paru .

Disarankan, dalam penelitian berikutnya, dapat dilakukan penelitian dengan hewan coba dengan paparan partikel Pb di daerah padat lalu lintas atau yang mempunyai resiko adanya paparan partikel Pb yang tinggi, sebagai penelitian eksperimental lapangan. Di samping hal tersebut, penggunaan paradigma imunopatobiologis dalam mempelajari pengaruh zat pencemar merupakan studi yang bisa dikembangkan dalam bidang kedokteran, khususnya yang terkait dengan bidang kesehatan lingkungan. Di sarankan agar hasil temuan penelitian ini dapat membeni masukan kebijakan, khususnya bagi pemerintah daerah Propinsi Jawa Timur terutama dalam hal penetapan nilai ambang batas partikel Pb udara.

ABSTRACT

Air quality can be significant threat for health, particularly among urban population, due to presence of air pollution (Stoldt, 1974; Fugle RF, 1992; Ray BT, 1995; Aditma, 2001). One of primary causes of urban air pollution is emission from motor vehicles that contain Pb particles, which is hazardous for health (Bailey, 1978; Palar, 1994; KPBB, 2001). Such condition may be triggering factor in exacerbating response of acute infection in respiratory tract. Because respiratory tract is the initial entry port of the emissions into human body and initial induction also occurs there, mucosal immune system can be affected. In addition to causing induction of mucosal immune system, due to its diameter, Pb particles may directly enter the alveoli. However, the influence of Pb particles exposure by inhalation of mucosal immune response mechanism of respiratory tract remains unclear.

Threshold of Pb particle in air is 2 ug/m^3 . However, the threshold in East Java was high, i.e., 60 ug/m^3 . In Surabaya the concentration of Pb particle at range between $>2 \text{ ug/m}^3$ and $80,85 \text{ ug/m}^3$. Pb particle concentration of 10 ug/m^3 is found to impair the function of alveolar macrophage and at the concentration of 30 ug/m^3 it produces damage in those cell, resulting in depression of phagocytic function. Disclosing mucosal immune response mechanism of respiratory tract to low Pb concentration of $>2 - <10 \text{ ug/m}^3$ may characterize condition prior to the occurrence of clinical symptoms which is valuable for protective measures.

Some studies on Pb were undertaken using toxicity approach by observing systemic and damaging disorders, and some other studies focused on the influence of immune response on alimentary tract revealing systemic immunologic disorder. This

study, however, identified identified the effects estimated to produce initial induction before the occurrence of clinical symptoms in allowed concentration of $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ or between $>2- <10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in which alveolar macrophage functions are impaired. Normal respiratory tract mucosal has no difference structure and function from intestinal tract mucosal in local immune response. Therefore, the author in this study abstracted the possibilities that may occur in respiratory tract mucosal by means in immunopathobiological paradigm using the concept of Pb as a stressor in order to disclose the mucosal immune response mechanism of respiratory tract to demonstrate abnormal local immune response due to stress immunocompetent cell caused by Pb particles exposure.

This study is an experimental animal study using post test only control group design. This design was used because all characteristics among population units, Balb/c mice, were similar or homogeneous, and both treatment and control groups were subjected to the same treatment period, i.e., 30 days, so that the effect of maturation was minimized. Result of this study showed that the exposure of Pb particles between $>20 \mu\text{g}/\text{m}^3 - < 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ resulted in mucosal immune response, as it was proved that the strongest variables were T cell CD4, T cell CD8, and T cell IL-2. Such condition theoretically may indicates DTH (Delayed Type Hypersensitivity). The presence of Pb particle in treatment group was significant, indicating that Pb particles concentration $>2 \mu\text{g}/\text{m}^3 - < 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in air with duration of exposure 3 hours/day for 30 days had result in the presence of Pb particle deposits. This condition tendency make fibrosis, especially the cumulative characteristic or persistent of Pb particle.

Keywords: Pb particles, stress immunocompetent cells, respiratory mucosal immune response, immunopathobiology.

DAFTAR ISI

Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Lembar Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terimakasih	vi
Ringkasan	xiv
Abstract	xix
DAFTAR ISI	xxi
DAFTAR TABEL	xxv
DAFTAR GAMBAR	xxvi
DAFTAR LAMPIRAN	xxvii
DAFTAR SINGKATAN	xxviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Paradigma Immunopatobiologis Yang Berkonsep <i>Stress Cell</i>	10
2.2 Karakteristik Partikel Pb dan Keberadaan Pb di Udara	11

	2.3	Pengaruh Pb Terhadap Kesehatan	15
	2.4	Imunogen, Antigen, Hapten dan Antibodi	18
	2.5	Beberapa Komponen Sel dan Respons Imun	20
	2.6	Respons Imun Mukosal	28
	2.7	Beberapa Komponen Mediator Terlarut Pada Sistem Imun	36
	2.8	Respons Imun Mukosal Saluran Pemasasan	43
	2.9	Pengaruh Pb Melalui Inhalasi Terhadap Respons Imun	45
	2.10	Sistem Imun Mencit	47
BAB	3	KERANGKA KONSEP PENELITIAN DAN HIPOTESIS PENELITIAN	49
	3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	49
	3.2	Hipotesis Penelitian	51
BAB	4	METODE PENELITIAN	52
	4.1	Rancangan Penelitian	52
	4.2	Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel	53
	4.3	Klasifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel	55
	4.4	Bahan Penelitian	57
	4.5	Instrumen Penelitian	58
	4.6	Lokasi dan Waktu Penelitian	59
	4.7	Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	60
	4.8	Prosedur Pemrosesan Jaringan	66

	4.9	Metode Pewarnaan	69
	4.10	Pemeriksaan Suhu dan Kelembaban	72
	4.11	Cara Analisis data	73
BAB	5	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS	77
	5.1	Hasil Pengukuran Variabel Penelitian	77
	5.1.1	Hasil pengukuran variabel kendali	77
	5.1.2	Hasil pengukuran variabel pengganggu	78
	5.1.3	Hasil pengukuran variabel bebas, konsentrasi Pb $\mu\text{g}/\text{m}^3$ udara	79
	5.1.4	Hasil penghitungan makrofag alveolar yang mengandung partikel Pb	80
	5.1.5	Hasil pemeriksaan imunohistokimia dan histokimia	81
	5.2	Hasil Uji Statistik Variabel Penelitian	83
	5.2.1	Uji normalitas data	83
	5.2.2	Uji pengamat ke 1 dan ke 2	83
	5.2.3	Uji beda antar kelompok sampel	84
	5.2.4	Analisis diskriminan	87
	5.2.5	Pembuatan pola respons imun mukosal saluran pernapasan	88
BAB	6	PEMBAHASAN	92
	6.1	Respons Imun Mukosal Saluran Pernapasan Akibat Paparan Partikel Pb Melalui Inhalasi	94
	6.2	Keberadaan Partikel Pb Di Makrofag Alveolar	100

BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	105
DAFTAR PUSTAKA		108
LAMPIRAN		116



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1	Mineral dan Makanan Mencit . 65
Tabel 4.2	Antibodimnoklonal dan Biotin Yang Dipakai 69
Tabel 5.1	Uji Homogenitas Berat Badan Mencit Awal Penelitian Pada Kelompok Perlakuan (P) dan Kelompok Kontrol (K) 77
Tabel 5.2	Uji Homogenitas Usia Mencit Awal Penelitian Pada Kelompok Perlakuan (P) dan Kelompok Kontrol (K) 78
Tabel 5.3	Konsentrasi Pb Udara Paparan Pada Kelompok Perlakuan 80
Tabel 5.4	Hasil Uji Normalitas Variabel Pb Alv, ST-CD4,ST-CD8,STpIL-2,STpIL-4 dan SPIgA. 83
Tabel 5.5	Hasil Uji Beda Pengamat 1 dan 2 Untuk Variabel Tergantung ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2, STpIL-4 , SPIgA dan Pb di Makrofag alvaeolar Pada Kelompok Perlakuan. 84
Tabel 5.6	Hasil Uji Beda Pengamat 1 dan 2 Untuk Variabel Tergantung ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2, STpIL-4 , SPIgA dan Pb di Makrofag alvaeolar Pada Kelompok Kontrol 84
Tabel 5.7	Uji Beda T –Pb di Sel Makrofag alvaeolar Pada Kel-Perlakuan dan Kontrol 85
Tabel 5.8	Beda Komponen Respons Imun Mukosal Saluran Pemapasan ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2 ,STpIL-4, SPIgA pada Kelompok Perlakuan dan Kontrol Dengan Uji Anova-Univariat 85
Tabel 5.9	Rekapitulasi Analisis Diskrimanan Variabel Pembeda Terkuat Respons Imun Mukosal Saluran Pemapasan (<i>Summary tabel</i>) 87

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	49
Gambar 4.1 Rancangan disain penelitian .	52
Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian	61
Gambar 4.3 Lokasi BALT	63
Gambar 5.1 Grafik Rerata Variabel Respons Imun ST(CD4, CD8), STp(IL-2,IL-4), dan SPIgA	86
Gambar 5.2 Grafik Pola Variabel Yang Berperan Bermakna Dalam Respons Imun Mukosal Saluran Pernapasan	88
Gambar 5.3 Sediaan Sampel Dengan Deposit Pb di Makrofag Alveolar (warna biru keabu-abuan gelap, pembesaran 400x)	89
Gambar 5.4 Sel TCD4 Dengan Antibodimonoklonal CD4 Dengan Sitolasma Berwarna Kuning Kecoklatan di Mukosal Saluran Pernapasan Dengan Pembesaran 400x.	89
Gambar 5.5 Sel TCD8 Dengan Antibodimonoklonal CD8 Dengan Sitoplasma Berwarna Kuning Kecoklatan di Mukosal Saluran Pernapasan Dengan Pembesaran 400x	90
Gambar 5.6 Sel T Penghasil IL-2 Dengan Antibodimonoklonal IL-2 Dengan Sitoplasma Berwarna Kuning Kecoklatan di Mukosal Saluran Pernapasan Dengan 400x	90
Gambar 5.7 Sel T Penghasil IL-4 Dengan Antibodimonoklonal IL-4 Dengan Sitoplasma Berwarna Kuning Kecoklatan di Mukosal Saluran Pernapasan Dengan Pembesaran 400x	91
Gambar 5.8 Sel T Penghasil Ig-A Dengan Antibodimonoklonal IgA Dengan Sitoplasma Berwarna Kuning Kecoklatan di Mukosal Saluran Pernapasan Dengan pembesaran 400x	91
Gambar 6.1 Gambaran Morfologi Paru Mencit Yang Diteliti	102

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN		Halaman
Lampiran 1	Uji coba konsentrasi Pb ambien setelah gas buang dihilangkan dengan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 10%, 25%, dan 50 %	116
Lampiran 2	Alat century flow meter dan grafik konversi gas buang.	117
Lampiran 3	Rancangan <i>Box Model</i> untuk paparan partikel Pb	118
Lampiran 4	Uji coba debit gas buang motor berbahan bakar premium terhadap kandungan Pb	123
Lampiran 5	Pengukuran kadar timbal /Pb di udar ambien secara spektrofotometri	124
Lampiran 6	<i>Sampling Suspended Solid</i> dengan <i>Low Volume Sampler</i>	128
Lampiran 7	Berat badan mencit dan uji homogenitas	131
Lampiran 8	Uji homogenitas usia mencit awal penelitian	132
Lampiran 9	Uji beda T suhu lokasi penelitian	133
Lampiran 10	Uji beda T kelembaban lokasi penelitian	134
Lampiran 11	Rekapitulasi konsentrasi Pb ambien ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) selama 30 hari	135
Lampiran 12	Uji beda T Pb di makrofag alveolar	137
Lampiran 13	Uji distribusi normal untuk Pb di sel makrofag alveolar, STp IL-4, STp IL-2, ST- CD8, ST-CD4, SPiG A	138
Lampiran 14	Uji anova untuk variabel ST-(CD4, CD8), STp (IL-2,IL-4) dan SPiG A	145
Lampiran 15	Analisis diskriminan .	147
Lampiran 16	Uji untuk menentukan pola respons imun mukosal saluran pemapasan	153
Lampiran 17	Uji beda pengamat ke 1 dan ke 2 untuk variabel penelitian	155
Lampiran 18	Etika Penelitian (Ethical Clearance) Hewan coba dari Pusvetma.	168

DAFTAR SINGKATAN

APC	:	<i>Antigen Presenting Cells</i>
BALT	:	<i>Bronchus Associated Lymphoid Tissue</i>
BTKL	:	<i>Balai Teknik Kesehatan Lingkungan</i>
CD	:	<i>Cluster Differentiation</i>
DNA	:	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTH	:	<i>Delayed Type Hypersensitivity</i>
GALT	:	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
GMSF	:	<i>Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
IFN	:	<i>Interferon</i>
IgA	:	<i>Immunoglobulin A</i>
IL	:	<i>Interleukin</i>
MALT	:	<i>Mucosal Associated Lymphoid Tissue</i>
MHC	:	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NALT	:	<i>Nasal Associated Lymphoid Tissue</i>
Pb	:	<i>Plumbum</i>
RNA	:	<i>Ribonucleic acid</i>
ST-CD4	:	<i>Sel T dengan marker CD4</i>
ST-CD8	:	<i>Sel T dengan marker CD8</i>
SP _{IgA}	:	<i>Sel Plasma penghasil IgA</i>
ST _{p-IL2}	:	<i>Sel T penghasil Interleukin-2</i>
ST _{p-IL4}	:	<i>Sel T penghasil Interleukin-4</i>
TCR	:	<i>T Cell Receptor</i>
TGF	:	<i>Transforming Growth Factor</i>
Th	:	<i>Sel T helper</i>
TNF	:	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.

Kondisi udara akan mempengaruhi kondisi kesehatan pernapasan yang menghirup, terutama masyarakat kota, karena faktor adanya pencemaran udara (Stoldt, 1974; Xu x, 1991; Fuggle RF, 1992; Ray BT, 1995; Aditama, 2001). Salah satu penyebab utama pencemaran udara di kota adalah asap kendaraan bermotor yang mengandung partikel Pb, yang membahayakan kesehatan (Bailey, 1978; Palar, 1994; KPBB, 2001). Sebagai pintu awal masuk gas buang ke dalam tubuh adalah saluran pernapasan, dan pula induksi awal pada saluran pernapasan, dapat mempengaruhi sistem imun mukosal. Partikel Pb selain ada yang menginduksi sistem imun mukosal, karena diameter partikel dapat langsung masuk ke alveoli (Chanlett, 1979; Lu, 1995). Kondisi tersebut diatas dapat menjadi salah satu pemicu menurunkan respons infeksi akut saluran pernapasan. Fakta menunjukkan, bahwa di daerah perkotaan di wilayah Propinsi Jawa Timur, seperti di Surabaya jumlah penderita penyakit infeksi saluran pernapasan lebih tinggi dibanding daerah lain (Din. Kes. Prop. Jatim, 2000; Din. Kes. Kota Surabaya, 2000). Sejauh ini, pengaruh paparan partikel Pb melalui inhalasi terhadap imunopatobiogenesis respons imun mukosal saluran pernapasan belum terungkap dengan jelas.

Pembatasan konsentrasi partikel Pb di udara adalah $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (PP 41, 1999), namun di wilayah Jawa Timur ambang batas lebih tinggi, yaitu sebesar 60



$\mu\text{g}/\text{m}^3$ (SK. Gub.Jatim No. 129, 1996). Di Surabaya konsentrasi partikel Pb melebihi ambang batas $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$, bahkan ada yang melebihi ambang batas $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$, yaitu dalam kisaran $>2\mu\text{g}/\text{m}^3$ sampai $80,95 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (BTKL, 1996; Sarudji, 1998; Purwanto, 2001). Potensi paparan Pb di udara, akan selalu meningkat, melihat fakta jumlah kendaraan bermotor yang cenderung meningkat rerata per tahun 5-9 %, baik di Jakarta maupun di Surabaya (Direktorat LL Kepolisian RI, 1999; Bappeda dan BPS Surabaya, 1999), sedangkan konsumsi bensin di Indonesia 95,47 % adalah bensin jenis premium, yang mengandung Pb (Nukman, 2001). Sumber paparan Pb selain dari kendaraan bermotor, adalah industri pertambangan peleburan sekunder, incenerator, batubara yang megandung Pb rendah, kegiatan industri yang menghasilkan besi dan baja, serta pemakaian cat. Partikel Pb konsentrasi $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ terbukti mengganggu fungsi sel makrofag alveolar (Bingham, 1973), dan pada konsentrasi $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ menimbulkan kerusakan sel makrofag alveolar, berupa fungsi fagositosis tertekan, dengan indikasi peningkatan TNF α (Zelikoff, 1993). Pengungkapan mekanisme imunopatobiologis respons imun mukosal saluran pernapasan dalam konsentrasi rendah pada kisaran $>2 - <10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ akan memberikan gambaran kondisi sebelum terjadinya gejala klinis, untuk tindakan preventif.

Sejauh ini beberapa penelitian lebih melihat suatu fakta konsentrasi Pb di udara atau di lapangan dengan indikator klinis, seperti berupa kandungan Pb di darah (Sarudji, 1998; Winarko, 1999). Penelitian partikel Pb dengan

konsentrasi terendah pernah diteliti adalah konsentrasi $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ yang terbukti mengganggu fungsi makrofag alveolar (Bingham, 1973), dan pada konsentrasi $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ menimbulkan kerusakan makrofag alveolar, berupa fungsi fagositosis tertekan, dengan indikasi peningkatan TNF α (Zelikoff, 1993). Beberapa penelitian Pb dilakukan dengan pendekatan toksisitas, yang mencermati gangguan sistemik dan merusak. Penelitian demikian menyebabkan imunopatogenesis awal, sebelum gejala klinis timbul, tetap merupakan kejadian yang belum jelas. Pada penelitian ini, peneliti ingin melihat pengaruh yang terjadi pada konsentrasi yang diduga akan menimbulkan induksi awal respons imun mukosal di saluran pernapasan, serta mengungkap proses kejadian dari perubahan imunopatobiologi sebelum kejadian gangguan klinis berdasar konsentrasi ambang batas yang dianjurkan $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dan konsentrasi $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ atau dalam kisaran $>2 \mu\text{g}/\text{m}^3 - < 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Pengaruh paparan partikel Pb terhadap respons imun mukosal telah dibuktikan, pada saluran pencernaan, seperti penurunan respons imun mukosal saluran pencernaan akibat Pb asetat (Mustaina, 1998), dan dalam sistem imunologi sistemik terjadi hambatan perkembangan sel penghasil antibodi dan titer serum antibodi (Blakely & Archer, 1981). Di sisi lain adanya pengaruh gangguan fungsi sel T dan sel B akibat Pb dalam menstimulasi terjadinya proliferasi limfosit dengan mengaktifkan interaksi sel T dan sel B (Razani, 1999), dan juga mengganggu keseimbangan rasio Th1 dan Th2 dengan cara menghambat Th1 dan meningkatkan Th2 (Heoy, 1998). Kondisi mukosal saluran pernapasan, tidak mempunyai struktur dan fungsi berbeda dengan

mukosal saluran pernapasan dalam respons imun lokal (Bienenstock, 1999), oleh sebab itu peneliti dalam penelitian ini mengabstraksikan kemungkinan akan terjadi di mukosal saluran pernapasan.

Konsentrasi Pb di udara ambien yang berpotensi terinhalasi dalam saluran pernapasan, merupakan pertimbangan yang mendasar untuk segera mengungkap pengaruh Pb terhadap mekanisme respons imun pada mukosal saluran pernapasan. Respons imun mukosal saluran pernapasan akibat partikel Pb, akan memberi gambaran lokal, sebagai kondisi dini pre klinis. Pengungkapan pengaruh pada mukosal saluran pernapasan, akan dapat menggambarkan suatu kondisi lokal, dan hal ini dapat dilihat dalam suatu jaringan, sehingga berdasar pertimbangan tersebut dilakukan pemeriksaan dengan imunohistokimia. Pemeriksaan untuk melihat perubahan sistem imun lokal yang tidak lazim atau menyimpang karena sel imunokompeten yang mengalami stres akibat paparan partikel Pb.

Pengungkapan tersebut diharapkan sebagai suatu bentuk pengembangan ilmu kedokteran di bidang pencemaran, melalui pendekatan imunopatobiologis dengan konsep sel yang stres (*stress cell*). Di samping hal tersebut, beberapa penelitian laboratorium yang telah dilakukan menggunakan paparan Pb melalui inhalasi dengan bahan Pb murni (Bingham, 1973; Zelikoff, 1993), tidak menggunakan bahan berasal dari partikel yang terkandung dalam gas buang motor berbahan bakar premium, sehingga penelitian tersebut tidak menggambarkan keadaan yang sebenarnya. Peneliti menggunakan suatu cara paparan menggunakan gas buang motor bakar berbahan premium dengan

berdasarkan ekstrapolasi permodelan suatu pencemaran udara (Masters, 1974; Soedomo, 1999) untuk selanjutnya dilakukan eksperimen pada hewan coba. Lama paparan 3 jam/ hari, berdasar jam puncak kepadatan lalu lintas, serta waktu 30 (tiga puluh) hari. Waktu 30 hari berdasarkan rerata atas kejadian deposit partikel Pb di alveoli setelah paparan selama 15 hari sampai dengan 40 hari (Kaminski, 1977).

Partikel Pb sebagai logam berat, yang mempunyai kemampuan berikatan dengan protein (Fullmer, 1990), sebagai ikatan kompleks. Ikatan kompleks akan terikat oleh molekul besar, sehingga dapat memodulasi respons imun, berupa stimulasi terjadinya proliferasi limfosit dengan mengaktifkan interaksi sel T dan sel B (Razani, 1999). Di samping partikel Pb yang terinhalasi akan mempengaruhi respons imun mukosal saluran pernapasan, dimungkinkan terdeposit di makrofag alveolar, secara kumulatif. Cara yang dilakukan dalam penelitian adalah melakukan abstraksi, sintesis dan ekstrapolasi dari perubahan produk yang dihasilkan oleh sel imunokompeten yang stres oleh partikel Pb dengan menggunakan hewan coba mencit. Modulasi respons imun mukosal saluran pernapasan dapat terjadi, karena (1) keberadaan partikel Pb yang akan masuk ke alveolar melalui sel M yang mempengaruhi sel makrofag alveolar dan kemungkinan menimbulkan deposit, (2) partikel Pb akan menginduksi mukosal, sel Thelper-CD4, sel Th1, sel Th2, sehingga memicu aktivitas sel B dalam menghasilkan IgA. Konsekuensi pemakaian kajian konsep *stress cell* di mukosal saluran pernapasan, adalah sumber variabel didapatkan dari perubahan morfofungsi di mukosal tersebut, yang akan dipakai untuk uji hipotesis.

Pendekatan dan konsep yang dipakai ini akan mengembangkan hipotesis, dan dilakukan pembuktian hipotesis, serta hasil yang didapat dipakai untuk memecahkan masalah penelitian.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ada perbedaan respons imun mukosal saluran pernapasan pada mencit Balb/c yang terpapar gas buang motor berbahan bakar premium yang mengandung partikel Pb konsentrasi berkisar $> 2 - < 10 \text{ ug/m}^3$ dengan yang terpapar gas buang motor bahan bakar premium yang tidak mengandung partikel Pb selama 3 jam/hari dalam waktu 30 hari ?
2. Apakah ada perbedaan jumlah makrofag alveolar yang mendeposit Pb pada mencit Balb/c yang terpapar gas buang motor berbahan bakar premium yang mengandung partikel Pb konsentrasi berkisar $> 2 - < 10 \text{ ug/m}^3$ dengan yang terpapar gas buang motor bahan bakar premium yang tidak mengandung partikel Pb selama 3 jam/hari dalam waktu 30 hari ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menjelaskan imunopatobiogenesis respons imun mukosal saluran pernapasan mencit Balb/c yang terpapar gas buang motor berbahan bakar premium yang mengandung partikel Pb konsentrasi berkisar $> 2 - < 10 \text{ ug/m}^3$ selama 3 jam/hari dalam waktu 30 hari ?

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan perbedaan jumlah sel imunokompeten yaitu sel T-CD4 , sel T-CD8 , sel Tpenghasil (p) IL-2, sel T penghasil (p) IL-4, , sel plasma penghasil (p) IgA pada mencit yang terpapar gas buang motor berbahan bakar premium yang mengandung partikel Pb konsentrasi berkisar $> 2 - < 10 \text{ ug/m}^3$ dengan yang terpapar gas buang motor bahan bakar premium yang tidak mengandung partikel Pb selama 3 jam/hari dalam waktu 30 hari.
2. Membuktikan perbedaan jumlah makrofag alveolar yang mendeposit Pb pada mencit Balb/c yang terpapar gas buang motor berbahan bakar premium yang mengandung partikel Pb konsentrasi berkisar $> 2 - < 10 \text{ ug/m}^3$ dengan yang terpapar gas buang motor bahan bakar premium yang tidak mengandung partikel Pb selama 3 jam/hari dalam waktu 30 hari.
3. Membuat pola diskriminan respons imun mukosal saluran pernapasan pada mencit Balb/c yang terpapar gas buang motor berbahan bakar premium yang mengandung partikel Pb konsentrasi berkisar $> 2 - < 10 \text{ ug/m}^3$ selama 3 jam/hari dalam waktu 30 hari.
4. Menjelaskan imunopatobiogenesis respons imun mukosal saluran pernapasan akibat paparan partikel Pb yang terkandung dalam gas buang motor bahan bakar premium melalui inhalasi dengan konsentrasi berkisar $> 2 - < 10 \text{ ug/m}^3$ selama 3 jam/hari dalam waktu 30 hari.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Dapat menjelaskan kerentanan terhadap gangguan infeksi saluran pernapasan akut ataupun gangguan saluran pernapasan lainnya bila individu tersebut berada pada daerah yang mempunyai potensi adanya gas buang yang mengandung partikel Pb.
2. Mendapatkan bukti ilmiah, berupa penemuan imunopatobiogenesis respons imun mukosal saluran pernapasan dan deposit Pb di sel makrofag alveolar akibat paparan Pb melalui inhalasi dengan konsentrasi berkisar $>2 - <10 \text{ ug/m}^3$, lama paparan 3 jam/hari, selama 30 hari, sehingga dapat dipakai sebagai dasar melakukan tindakan preventif udara tercemar Pb yang didasarkan pada kajian respons imun mukosal saluran pernapasan.
3. Penelitian ini dapat dipakai sebagai model dalam penelitian pengaruh zat pencemar udara lain dengan pendekatan imunopatobiologis yang berkonsep *stress cell*, yaitu mempelajari sistem imun yang tak lazim sehingga mengubah respons imun mukosal saluran pernapasan akibat sel imunokompeten yang mengalami stres oleh zat pencemar tersebut. Pendekatan model inhalasi dalam penelitian adalah paparan udara ambien, model yang lebih tepat, karena menggambarkan kondisi nyata di alam.
4. Memberi masukan pada pemerintah daerah Propinsi Jawa Timur untuk mengkaji ulang suatu nilai ambang batas partikel Pb ambien di

udara sebesar 60 ug/m^3 , yang sekarang tertuang SK.Gubernur
Propinsi Jawa Timur No. 129 Tahun 1996.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Paradigma imunopatobiologis yang berkonsep stress cell

Suatu kejadian penyakit, pada gangguan ekstrim adalah kejadian kerusakan pada organ tubuh, ditunjukkan gejala yang nampak, yang dipelajari dalam Patologi. Dengan perkembangan ilmu kedokteran, dikenal adanya Patobiologi, ilmu yang melihat perubahan biologik tidak lazim yang terjadi pada tubuh sebagai akibat interaksi dengan lingkungan (Hilli, 1980, Constatinides P, 1994, Putra, 1997). Dari aspek kronologis, sebenarnya Patobiologi posisinya mempelajari sebelum patogenesis yang baku, dengan kajian akibat interaksi dengan lingkungan.

Kondisi lingkungan dengan berbagai parameter yang dikandung adalah merupakan faktor luar, yang apabila dapat masuk ke dalam mekanisme perkembangan aktifitas sel dapat mengakibatkan perubahan mekanisme dengan beberapa akibat yang ditimbulkan. Perkembangan berikut, patobiologi yang terkait dengan sistem imun, dengan menempatkan kelainan sistem imun sebagai penyebab maupun akibat dari proses patobiologis merupakan kajian imunopatobiologis (Putra ST, 1997). Kajian terdahulu terkait dengan sistem imun, dan dalam perkembangan imunologi yang semakin cepat, suatu proses biologi yang terjadi dalam sistem imun sangat tergantung atas produk yang dihasilkan oleh suatu sel imunokompeten, dan hasil ini terkait akibat kondisi yang berbeda pula yang dialami oleh sel tersebut (Janeway CA, 1999).

Pertimbangan tersebut dapat sebagai dasar, bahwa sel termasuk sel imunokompeten akan berperilaku berbeda, bila mengalami kondisi yang berbeda sehingga sel menghasilkan produk lain. Kondisi inilah yang di analogikan terjadinya suatu stres pada sel, sehingga kajian imunopatobiologi dengan konsep *stress cell* dipakai dalam mempelajari aktivitas sel imunokompeten dengan produk yang dihasilkan ketika mengalami stres oleh suatu penyebab stres atau stresor. Mengetahui mekanisme kejadian tersebut adalah dengan mengungkap imunopatobiogenesis, yaitu proses kejadian dari perubahan imunobiologi yang merugikan akibat suatu perlakuan yang diberikan (Putra, 1990)

Paradigma imunopatobiologis dapat digunakan secara luas yang menggambarkan suatu kajian terhadap sistem imun yang tidak lazim atau menyimpang (Putra, 1997). Dapat disimpulkan paradigma imunopatobiologis yang berkonsep *stress cell* adalah kajian keilmuan yang mempelajari sistem imun yang tidak lazim atau menyimpang, yang menempatkan kelainan sistem imun, baik sebagai penyebab atau sebagai akibat dari proses patobiologis dengan berbasis pada perubahan perilaku sel imunokompeten yang mengalami stres. (Putra, 1997). Atas pertimbangan tersebut, maka daerah penelitian ini lebih ditekankan dalam mengungkap mekanisme sebelum kejadian penyakit atau sebelum kajian Patologi.

2.2 Karakteristik Partikel Pb Dan Keberdaan Di Udara

Terminologi partikel digunakan sebagai bahan yang terdispersi baik padat maupun cair, yang teragregasi secara individual menjadi lebih besar dari

molekul tunggal yang membentuknya biasanya berdiameter 0,0002 μm , namun diameter molekul agregasi tersebut lebih kecil dari 500 μm (Masters, 1974).

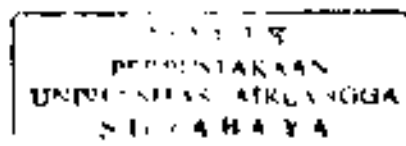
Pb atau Plumbum dan juga disebut timbal secara fisik berwarna kebiruan atau perak yang keabuan (WHO, 1995). Sifat Pb yang lunak mengakibatkan dipakai sebagai bahan dasar, karena kemudahan dalam membentuk. Nomor atom Pb adalah 82, berat atom 207,19 dan dengan berat jenis 11,34, serta mempunyai titik didih pada tekanan atmosfer 1.740 derajat celsius (WHO, 1977, WHO, 1995)

Partikel Pb yang terinhalasi berdasarkan penelitian rerata berdiameter 0,25 μm , dan diantaranya yang berdiameter lebih kecil dari 0,16 μm berjumlah 25 %, dan yang berdiameter lebih besar dari 0,43 μm jumlahnya 25 % (WHO, 1977) Salah satu sumber Pb di udara adalah bahan *tetraethyllead* atau $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ yang mempunyai berat molekul 323,44 dengan titik didih pada tekanan atmosfer 200 derajat Celcius (Weast, 1974). Bahan *tetraethyllead* dipakai sebagai bahan tambahan pada bahan bakar minyak, khususnya bagi kendaraan bermotor, guna meningkatkan oktan, untuk mencegah terjadinya *knocking* (Bailey, 1978).

Paparan Pb terhadap manusia terjadi karena kegiatan yang dilakukan dan kondisi lingkungan sewaktu manusia berada, secara umum keberadaan Pb atau timbal tersebut berasal dari beberapa bahan

a Batuan

Keberadaan Pb secara alamiah terdapat di alam dengan konsentrasi 13 mg/kg (WHO, 1977). Sumber potensi utama adalah batu bekuan dan batu metamorfose yang mempunyai konsentrasi



berkisar 10 –20 mg/kg (Turekian, 1961). Potensi Pb di lingkungan disamping oleh keberadaannya di alam, namun juga oleh produk yang menggunakan Pb sebagai bahan dasar yang dibuat oleh manusia

b Tanah

Keberadaan Pb di tanah umumnya secara langsung akibat pengaruh dari lingkungan yang tercemar dan masuk atau mengendap di permukaan tanah. Disamping hal tersebut secara alamiah adanya Pb di tanah yang berlokasi jauh dari aktifitas manusia mempunyai konsentrasi sekitar 5-25 mg/kg (Swaine, 1965).

c. Air

Analisis yang dilakukan pada air tanah Pb terdeteksi dengan konsentrasi yang bervariasi 1 sampai dengan 60 µg/liter (WHO, 1977). Keberadaan Pb di air permukaan sangat bervariasi, karena sebagian besar akibat pencemaran. Konsentrasi Pb di air laut relatif lebih rendah dari air tanah, menurut Chow pada air di permukaan laut Bermuda, yang bebas dari pengaruh cemaran di sekitarnya mempunyai konsentrasi rerata 0.07 µg/liter (Chow, 1968) Disamping hal tersebut keberadaan Pb pada air dengan kedalaman 1000 m di Atlantik tengah mempunyai konsentrasi 0,03-0,04 µg/liter.

d. Udara

Secara alamiah dari perkiraan data geochemical pada udara murni telah diteliti oleh Paterson (1965) yang dikutip oleh World Health Organization, bahwa konsentrasi Pb berkisar $0,0006 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Pemakaian bahan aditif *tetraethyllead* pada bahan bakar minyak kendaraan bermotor, maka kontribusi Pb di udara mempunyai potensi semakin tinggi (Bailey, 1978; WHO, 1995). Potensi keberadaan Pb di udara relatif lebih bersifat mudah meluas, khususnya di daerah dekat sumber pencemaran Pb, termasuk di daerah perkotaan. Keberadaan konsentrasi yang relatif cukup tinggi sejalan dengan semakin besar jumlah sumber penghasil Pb. Baku mutu udara ambien nasional untuk Pb sesuai dengan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 41 tahun 1999 tanggal 26 Mei 1999 adalah $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ udara dalam periode 24 jam, sedangkan SK. Gubernur Propinsi Jawa Timur No. 129 tahun 1996, nilai ambang batas Pb adalah $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ udara.

Konsentrasi Pb di udara ambien khususnya di kota besar pada lokasi jalan raya mempunyai konsentrasi relatif cukup tinggi. Di Surabaya, data BTKL pemantauan tahun 1996, di Bungurasih terdeteksi $6,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dan di Joyoboyo $16,8 \mu\text{g}/\text{m}^3$. disamping itu berdasarkan penelitian Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan di beberapa jalan dalam saat tertentu konsentrasi Pb rerata sebesar $80,95 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Sarudji, 1998). Dalam penelitian bulan Mei 2001 – Juli tahun 2001, kondisi udara yang mengandung partikel Pb di 3 (tiga) tempat

yang padat kendaraan bermotor berkisar antara $7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ – $77 \mu\text{g}/\text{m}^3$, dengan rerata antara $12,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $30,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$, dan prediksi untuk 12 ruas jalan di Kota Surabaya , konsentrasi ambien $45,45 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Purwanto, 2001) .

2.3 Pengaruh Pb Terhadap Kesehatan.

Pengaruh partikel yang ada dalam udara mempunyai pengaruh terhadap kesehatan saluran pernapasan, seperti antara lain :

1. partikel asbes, yang dapat mengakibatkan fibrosis di paru dan potensial terjadi kanker paru ;
2. partikel cadmium, dapat menyebabkan kerusakan paru/ emphysematous, dan juga penyakit gangguan faal ginjal,
3. partikel beryllium, dapat mengakibatkan penyakit akut pneumoni, maupun yang bersifat kronis yaitu *chronic granulomatous disease*;
- 4 partikel chrom, yang dapat mengakibatkan antara lain iritasi mukosa, faringitis, perforasi hidung dan kanker (Goldsmith & Friberg, 1977);

Timbal (*Plyumbum*=Pb) adalah partikel yang keberadaan di udara, terutama oleh bahan gas buang kendaraan bermotor yang menggunakan bahan bakar mengandung Pb. Timbal merupakan racun yang bersifat kumulatif, serta timbal secara luas dapat mempengaruhi beberapa organ tubuh, dan sistem organ, melalui perubahan subseluler dan pengaruh perkembangan sistem syaraf (WHO, 1995) Timbal terikat kuat dengan banyak senyawa, seperti asam amino, haemoglobin, beberapa enzim yang lam, RNA dan DNA, sehingga dapat mengganggu banyak alur metabolisme Secara sistemik dampak Pb sangat

beraneka ragam antara lain hipertensi, sintesis darah dan kerusakan sistem syaraf otak (WHO, 1995).

Persenyawaan timbal masuk dalam tubuh melalui saluran pemapasan, saluran pencernaan atau melalui kulit. Timbal yang masuk melalui saluran pencernaan, akan terserap dalam mukosal saluran cerna, dan penyerapan akan banyak dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain usia dan faktor makanan atau nutrisi. Pada anak ada kecenderungan kemampuan penyerapan relatif lebih tinggi (WHO, 1977; Mahaffee, 1985). Khusus bagi anak mempunyai resiko lebih besar dalam mendapat masukan melalui pencernaan, di daerah yang tercemar udara Pb, karena perilaku dalam kebiasaan memasukkan jari, sehingga rerata Pb dapat masuk dengan konsentrasi 0,6 – 6 µg/hari (Thomas, 1997). Pada orang dewasa, timbal dapat masuk melalui makanan rerata 300 µg per hari (WHO, 1977, WHO, 1995). Dalam sistem peredaran darah, konsentrasi timbal dalam darah maksimal 40 ug/100 ml darah untuk anak dan dewasa 50 µg/100 ml darah (WHO, 1977)

Pengaruh nyata keberadaan senyawa Pb yang terinhalasi melalui saluran pemapasan sebagian besar akan terserap di alveoli paru. Tingkat penyerapan dipengaruhi oleh konsentrasi senyawa, dengan dipengaruhi oleh faktor ukuran partikel dan, kelarutan partikel yang diekspresikan oleh suhu udara dan kelembaban (Zelikoff, 1993). Diameter Pb kurang dari 2 µm mempunyai potensi untuk masuk dalam paru secara total (Chanlett, 1979). Disamping itu Lu mengatakan, bahwa senyawa Pb dengan bentuk uap, gas dan beberapa partikel dengan ukuran 0.01-10 µm akan diserap melalui saluran pemapasan (Lu, 1995).

Dalam konsentrasi inhalasi Pb yang lebih besar menunjukkan menurunnya sel makrofag alveolar yaitu dengan konsentrasi Pb 100-200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (WHO, 1977). Partikel Pb dengan ukuran 0,1-1,0 μm mempunyai potensi untuk mengendap terutama di alveoli ataupun pada sistem tracheobronchial. Efektifitas penyerapan timbal melalui paru sangat besar yaitu lebih dari 90 % dan partikel akan tetap berada di paru (Goyer, 1986). Deposit partikel Pb di alveoli dan sel makrofag alveolar terjadi setelah paparan selama 15 hari sampai dengan 40 hari (Kaminski, 1977).

Dalam penelitian Winarko kadar Pb pegawai terminal Joyoboyo Kotamadya Surabaya terdeteksi cukup bervariasi berkisar 7,062 $\mu\text{g}/100$ ml darah - 277, 138 $\mu\text{g}/100$ ml darah, dengan rerata 128,096 $\mu\text{g}/100$ ml darah, sedangkan proporsional 85,42 % tidak normal (Winarko, 1999). Ada suatu korelasi antara Pb di udara dengan Pb di darah, yaitu untuk setiap 1 μg Pb/ m^3 udara, meningkatkan kandungan Pb dalam darah sebesar 1-2 $\mu\text{g}/100$ ml darah (WHO, 1977), dengan demikian maka melihat konsentrasi Pb dalam darah, dapat diprediksi besar potensi partikel Pb di ambien.

Pada perkembangan terakhir pemakaian indikator konsentrasi Pb dalam darah pada suatu eksperimen di hewan coba ternyata kurang tepat, bila akan melihat pengaruh Pb yang masuk melalui inhalasi. Indikator yang tepat adalah dengan melihat pengaruh di lokal paru atau saluran pernapasan (Zelikoff, 1993). Pemeriksaan Pb di jaringan paru, khusus di sel makrofag alveolar dan pengaruh di mukosal saluran pernapasan diharapkan dapat mengungkap lebih jauh terhadap pengaruh Pb inhalasi. Pertimbangan tersebut menjadi dasar, bahwa

dalam suatu eksperimen hewan coba untuk pemeriksaan respons imun mukosal saluran pernapasan akibat paparan Pb melalui inhalasi, maka pemeriksaan imunohistokimia merupakan cara yang tepat.

2.4 Imunogen, Antigen, Hapten Dan Antibodi.

Substansi imunogen, antigen, hapten dan antibodi berhubungan erat dengan respons imun, dan mereka mempunyai peran dan fungsi yang berbeda. Suatu substansi yang masuk dalam tubuh disebut imunogen bila mampu merangsang respons imun, baik respons imun selular maupun respons imun humoral atau keduanya (Kresno, 1996). Bagian dari antigen yang bereaksi dengan antibodi atau dengan reseptor spesifik pada limfosit T disebut epitop. Imunogen yang paling poten umumnya merupakan makromolekul protein, polisakarida, polipeptida atau polimer sintetik misalnya polivinilpirolidon (PVP).

Substansi lain adalah antigen, yaitu substansi yang mampu bereaksi dengan antibodi, dan diproduksi atas rangsangan imunogen, tanpa mempertimbangkan apakah antigen itu sendiri bersifat imunogen, dengan arti, bahwa semua imunogen adalah antigen, tetapi tidak semua antigen adalah imunogen (Kresno, 1996; Parslow, 1997; Goldsby, 2000).

Substansi yang bukan imunogen atau yang tidak bersifat imunogenik bila diikat oleh protein pembawa (*carrier protein*) yang bersifat imunogenik akan membentuk suatu kompleks yang dapat merangsang sistem imun, dan mampu memproduksi antibodi terhadap molekul tersebut disebut hapten. Hapten dapat bereaksi dengan antibodi yang diproduksi, walaupun bukan imunogenik, seperti

bahan kimia, logam berat Hapten bila berikatan dengan protein pembawa, maka hapten dapat mempengaruhi sistem imun dan sering berfungsi sebagai determinan imunodominan (Goldsby, 2000)

Untuk menjadikan substansi bersifat imunogen ditentukan oleh beberapa faktor (Parslow, 1997; Kresno, 1996, Jakson, 1985):

1. harus bersifat asing, dan sifat asing dapat pula terjadi bila ada perubahan konfigurasi substansi yang sebenarnya semula bukan merupakan substansi asing;
2. berat molekul substansi potensial berukuran cukup besar dengan BM >100.000, dan untuk molekul kecil seperti asam amino, monosakarida, serta hampir sebagian substansi yang lebih kecil dari BM 10.000 umumnya tidak imunogenik ;
- 3 susunan molekul harus kompleks;
4. cara masuk substansi ke dalam tubuh serta besarnya dosis akan menentukan respons imun yang timbul;
5. faktor genetik individu yang terpapar pada antigen juga menentukan respons imun;

Suatu respons imun terjadi terkait pula dengan keberadaan antibodi, khususnya yang bersifat respons imun humoral. Antibodi secara struktur kimia adalah suatu protein (dalam hal ini adalah immunoglobulin), terdiri dari 2 (dua) rantai berat dan 2 (dua) rantai ringan, yang mengenal secara khusus epitop antigen, serta mempunyai peran pembersihan antigen (Goldsby, 2000) Immunoglobulin merupakan substansi pertama yang diidentifikasi sebagai

molekul dalam serum yang mampu menetralkan sejumlah mikroorganisme penyebab infeksi. (Kresno, 1996). Inunoglobulin merupakan molekul yang dibentuk oleh sel B dalam 2 bentuk yang berbeda , yaitu sebagai reseptor permukaan untuk antigen, dan sebagai antibodi yang disekresikan ke dalam cairan ekstraseluler

Antibodi dapat berfungsi sebagai adaptor yang mengikat antigen melalui *binding sites* yang spesifik, dan merupakan jembatan yang menghubungkan antigen dengan beberapa sel sistem imun atau mengaktivasi komplemen (Hammerling , 1976; Goldsby, 2000). Antibodi melaksanakan fungsi proteksi dengan menetralkan antigen secara langsung, namun sering dibantu oleh sistem efektor lain, misalnya komplemen, sel fagosit dan sel sitotoksik .

2.5 Beberapa Komponen Sel dan Respons Imun Umum.

Ada 2 (dua) kelompok atau grup sel yang menjalankan respons imun yaitu limfosit dan sel penyaji antigen (*antigen presenting cells*) (Goldsby., 2000). Limfosit adalah salah satu dari beberapa tipe sel darah putih yang diproduksi dalam sumsum tulang oleh proses hematopoiesis. Limfosit ini meninggalkan sumsum tulang untuk bersirkulasi dalam darah dan sistem limfatik, serta kembali menempati beberapa organ limfoid. Limfosit mempunyai 2 populasi besar, yaitu limfosit B atau sel B dan limfosit T atau sel T.

a. Limfosit B.

Limfosit B akan menjadi matang atau matur dalam sumsum tulang, dan ketika meninggalkan sumsum tulang tersebut setiap sel

mengekspresi suatu reseptor pengikat antigen yang unik pada membran. Reseptor sel B inilah yang ada dalam suatu membran guna mengikat molekul antibodi. Ketika sel B awal atau *naive cell* yang sama sekali belum pernah ketemu suatu antigen tertentu, maka pada awal akan terjadi pertemuan antigen dengan antibodi. Pertemuan ini menyebabkan sel terbagi dua dengan cepat, dan turunan dari sel ini berdeferensiasi dalam bentuk sel memori, dan sel B efektor atau sel plasma. Sel B memori mempunyai jangka waktu hidup yang lama, yang selanjutnya akan terus terekspresikan di membran sebagai pengikat antibodi yang sama seperti sebelumnya. Sel plasma tidak hanya mengekspresikan membrane pengikat antibodi, namun juga memproduksi antibodi dalam bentuk yang disekresi. Sel plasma hanya hidup dalam beberapa hari, tetapi mereka mensekresi dalam jumlah yang besar selama waktu tertentu. Diperkirakan satu sel plasma dapat mensekresi lebih dari 2000 molekul antibodi per detik (Goldsby, 2000). Antibodi yang tersekresi inilah merupakan molekul utama dalam imunitas humoral.

b. Limfosit T

Limfosit T muncul di sumsum tulang, tetapi tidak seperti limfosit B yang matang atau matur dalam sumsum tulang, tetapi limfosit T bermigrasi ke kelenjar timus untuk menjadi matang. Selama proses pematangan dalam timus, limfosit T mengekspresikan molekul

pengikat antigen yang unik yang disebut reseptor T pada membran. Tidak seperti antibodi yang terikat dalam membran limfosit/sel B, dapat mengenali antigen secara sendirian, namun limfosit T dapat mengenali hanya antigen yang lebih dahulu terikat oleh suatu protein yang berada di membran sel yang disebut molekul MHC (*Major Histocompatibility Complex*). Molekul MHC disebut sebagai molekul yang mempresentasikan antigen (*antigen presentation*) dalam bentuk glikoprotein polimeric, yang ditemukan di membran. Molekul MHC mempunyai 2(dua) tipe besar, yaitu molekul MHC kelas I, dan molekul MHC kelas II. Molekul MHC kelas I yang diekspresikan oleh hampir seluruh sel yang mempunyai nukleus yang berisi rantai protein berat yang dikaitkan dengan protein varian kecil yang disebut mikroglobulin. MHC kelas II berisi rantai glikoprotein dan yang diekspresikan hanya oleh sel penyaji antigen (*antigen presenting cells=APC*). Sel T/ limfosit T yang masih naive bertemu dengan antigen dan berbarengan dengan suatu molekul MHC yang berada dalam sel, maka sel T berproliferasi dan berdeferensiasi menjadi sel T memori dan berbagai sel efektor sel T. Sub populasi sel T terbagi menjadi 2(dua), yaitu sel T helper (Th) dan sel T sitotoksik (Tc). Di samping hal tersebut ada tipe sel T ke tiga yang sering disebut sebagai sel T supresor (Ts), dan nampaknya sel Ts diterima sebagai sel yang tak berbeda dengan sub populasi sel Th dan sel Tc

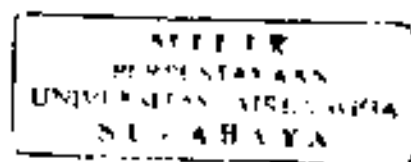
(Goldsby, 2000). Sel Th dan sel Tc dapat dibedakan satu dengan lainnya atas keberadaan glikoprotein membran CD4 atau CD8 yang berada pada permukaan sel, dengan penjelasan sebagai berikut:

1. CD4, ditampilkan oleh sel T yang umumnya berfungsi sebagai sel T helper (Th);
2. CD8, ditampilkan oleh sel T yang umumnya berfungsi sebagai sel T cytotoxic (Tc);

Setelah sel Th mengenal dan berinteraksi dengan suatu kompleks molekul MHC kelas II dan antigen, sel segera diaktivasi menjadi suatu sel efektor yang sekresinya berupa faktor pertumbuhan berbagai macam yang disebut sebagai sitokin. Sekresi sitokin memainkan peranan yang penting dalam mengaktivasi sel B/ limfosit B, sel T, makrofag dan beberapa sel yang terlibat dalam respons imun.

c. Sel penyaji antigen (*Antigen Presenting Cells-APC*).

Sel Th perlu menjaga keteraturan aktivasinya, dengan ini diharapkan sel Th hanya mengenal antigen yang ditampilkan bersama dengan molekul MHC kelas II yang berada dalam permukaan APC. Sel APC ini merupakan sel yang spesifik, termasuk makrofag, limfosit B, dan sel dendritik yang dibedakan menjadi 2 (dua) sifat. Pertama, mereka mengekspresikan molekul MHC kelas II pada membran. Kedua, mereka dapat mengirimkan semacam sinyal ko-stimulator yang penting bagi aktivasi sel Th.



Aktivitas dan peran sel imunokompeten tersebut terkait dengan respons imun. Respons imun dari suatu sistem imun adalah suatu respons yang bersifat kolektif dan terkoordinasi yang diberikan oleh beberapa sel yang bertanggung jawab terhadap sistem imun akibat oleh keberadaan substansi asing yang masuk dalam tubuh dapat diamati baik secara seluler maupun humoral (Kott, 1985; Subowo, 1993; Abbas, 1997; Goldsby, 2000).

Sistem yang ada dalam tubuh mempunyai dua macam ketahanan tubuh yaitu ketahanan tubuh yang bersifat alamiah atau *natural/innate immunity* dan ketahanan tubuh yang bersifat didapat atau *adaptive/acquired immunity* (Stites, 1997; Goldsby, 2000). Ketahanan yang bersifat alamiah dimiliki oleh tubuh sejak lahir, dan respons imun terjadi terhadap zat asing walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar oleh zat tersebut, dan sifatnya tidak spesifik (Kresno, 1996). Ketahanan tubuh adaptif adalah respons imun yang bersifat spesifik karena respons yang didapat, dan timbul terhadap antigen tertentu, dimana tubuh pernah terpapar oleh antigen tertentu tersebut sebelumnya (Kresno, 1996; Janeway, 1999).

Khusus ketahanan tubuh adaptif yang bersifat spesifik meliputi spesifitas, memori dan diskriminasi *self* dan *non self* (Abbas., 1994). Pada awal aktivitas dimulai dengan makrofag atau beberapa sel yang masuk dalam APC (*antigen presenting cell*) dan beberapa sel lain yang mendapatkan infeksi oleh mikroorganisme. Lebih lanjut antigen diproses sehingga dapat mempresentasikan diri melalui MHC (*Major Histocompatibility Complex*) yang cocok ke permukaan sel, sehingga mampu dikenali oleh beberapa sel imunokompeten yang lain

(Goldsby, 2000). Hubungan antara kompleks antigen dan MHC dengan permukaan sel, dalam hal ini reseptor yang dimiliki oleh beberapa sel imunokompeten, menyebabkan suatu induksi pada beberapa sel imunokompeten tersebut sehingga berproliferasi, berdiferensiasi. Dalam respons imun yang bersifat spesifik tersebut melibatkan beberapa sel imunokompeten yaitu makrofag, limfosit T, limfosit B, imunoglobulin, limfokin dan sitokin (Goodman, 1991; Nijkamp, 1999).

Sistem imun tersebut disusun oleh dua unsur, yang pertama, unsur organ berupa organ limforetikuler yang berbentuk (*capsulated*) dan jaringan limfoid tidak berbentuk (*diffuse*). Unsur kedua, adalah unsur seluler yang terdiri dari sel limfosit, sel asesoris dan sel epitelial atau endotel. Seluruh sel yang berperan di dalam sistem imun juga disebut sebagai sel imunokompeten, yang berasal dari sel induk pluripoten, yang selanjutnya berdiferensiasi melalui 2 (dua) jalur. Jalur yang pertama, adalah jalur limfoid yang akan membentuk limfosit dan subsetnya, dan jalur ke dua adalah jalur mieloid yang membentuk sel fagosit dan beberapa sel lain (Roitt, 1993; Janeway, 1999; Nijkamp, 1999). Di samping hal tersebut, organ dan jaringan limfoid dapat diklasifikasi dalam 2 (dua) klasifikasi, yaitu organ limfoid primer (sentral), dan organ limfoid sekunder (perifer).

Klasifikasi pertama adalah organ limfoid sentral yaitu sumsum tulang (*bone marrow*) dan timus (*thymus*). Pada organ limfoid primer atau sentral, maka sel imunokompeten mengalami diferensiasi, serta proliferasi dan pematangan menjadi suatu sel yang mempunyai peran spesifik, sehingga disebut sel limfoid fungsional. Untuk mendapatkan suatu sifat yang toleran terhadap antigen yang

disebut sebagai *self antigen*, dan kemampuan mengenal yang *non self antigen*, maka di dalam organ limfoid primer atau sentral tersebut sel limfosit memperoleh spesifitas reseptor antigen. Proses selanjutnya, limfosit dari organ primer atau sentral akan bermigrasi ke organ limfoid perifer dan sistem limfatik (Roitt, 1994; Stites, 1997; Janeway, 1999)

Klasifikasi ke dua adalah organ limfoid perifer berupa 3 (tiga) organ utama, yaitu pertama, berupa organ limfoid berbentuk dan mempunyai fungsi sistemik, yang terdiri dari 2 (dua) organ, yaitu limpa yang terdiri dari 2 (dua) organ, yaitu limpa dengan fungsi menangkap antigen berasal dari sirkulasi darah. Selain limpa, maka organ kelenjar getah bening yang berfungsi menangkap antigen dari tempat jaringan yang mengalami infeksi. Organ limfoid perifer yang satu lagi adalah jaringan limfoid tak berbentuk. Jaringan tersebut terbentuk akibat adanya infiltrasi sel limfoid ke lamina propia yang mempunyai peran serta fungsi melindungi antigen yang akan masuk ke mukosa yang selanjutnya disebut sebagai *Mucosal Associated Lymphoid Tissue (MALT)* (Stites, 1997; Janeway, 1999). Tidak berentuknya jaringan limfoid ini mempunyai konsekuensi tidak ada organisasi yang baik, tetapi terdiri dari pengelompokan sel retikulum, makrofag, monosit dan sel plasma dalam bentuk semacam anyaman yang disebut sabut retikulum

Menurut jenis sel yang terlibat dalam respons imun, maka respons imun dibagi menjadi 2(dua):

a. **Respons imun seluler**

Respons imun yang terjadi dan dijalankan oleh limfosit sendiri yang tersensitisasi (*sensitized*) spesifik dan disebut sebagai imunitas seluler.

b. **Respons imun humoral**

Respons imun yang ditandai oleh produk sel beberapa jaringan limfosit yang disebut sebagai antibodi (*humoral immunity*) (Belanti, 1985; Goldsby, 2000).

Dalam respons imun seluler terjadi proliferasi dan diferensiasi dari limfosit T menjadi sub-populasi sel T antara lain T-helper, T-sitotoksik atau T supresor, dengan setiap sel mempunyai kemampuan dalam menjalankan fungsi imunologik. Pada respons imun humoral berhubungan dengan proliferasi dan perubahan limfosit B menjadi sel plasma yang mensekresi antibodi ke dalam sirkulasi. Produk antibodi inilah berikatan dengan antigen yang masuk untuk membentuk suatu ikatan kompleks yang dapat mengaktifasi beberapa komplemen dan mampu merusak ikatan kompleks yang dimaksud.

Disamping ke dua bentuk respons imun diatas, maka peranan komponen sel dalam respons imun ditentukan oleh adanya interaksi kedua respons imun tersebut. Limfosit T yang mendapat rangsangan dan teraktifasi oleh zat asing yang disebut antigen menyebabkan sel T berdiferensiasi menjadi sel T helper dan sel T sitotoksik atau T supresor. Proses selanjutnya sel T helper segera berdiferensiasi menjadi Th1, Th2, Th3 (Weiner, 1997; Janeway, 1999).

Sel Th1 mengeluarkan atau mensekresi interleukin -2 atau IL-2 yang selanjutnya akan merangsang makrofag, kondisi ini menjadikan bentuk respons imun seluler. Th2 mensekresi beberapa sitokin yaitu IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10 yang akan memberi rangsangan terhadap sel B untuk menjadikan sel plasma sebagai antibodi, kondisi inilah menjadikan bentuk respons imun humoral (Sigal, 1994; Reeves, 1996). Th3 merupakan sel T yang relatif berbeda dengan Th-1/Th-2. Karakteristik Th3 yang unik adalah dihasilkannya TGF β oleh T-CD4 namun sifat proliferasinya lambat, tetapi dapat membantu produk Ig A, dengan IL-4 sebagai faktor diferensiasinya, namun dengan jumlah yang kecil. Th3 terjadi pada respons imun mukosal terutama karena antigen yang disajikan secara oral (Weiner, 1997; Janeway, 1999). Aktivitas sel Th3 ini dimungkinkan terjadi juga pada mukosal saluran pernapasan, dengan analogi bahwa adanya kesamaan karakteristik mukosal walaupun lokasinya berbeda (Bienenstock; 1999).

2.6 Respons Imun Mukosal

Sistem imun mukosal secara kuantitas merupakan bagian yang predominan atau paling berpengaruh dan paling banyak dalam keseluruhan sistem limfoid (Sutes, 1997). Sistem imun mukosal, seperti yang dijelaskan sebelumnya, disusun oleh jaringan limfoid yang tersebar di mukosal gastrointestinal, saluran pernapasan dan urogenital. Karakteristik jaringan limfoid tersebut diberi nama menurut sifat kekhususan dalam memproteksi mukosal, seperti yang memproteksi saluran mukosal gastrointestinal disebut *Gut Associated Lymphoid Tissue* (GALT), dan yang memproteksi mukosal saluran pernapasan ada dua

sistem limfoid, yaitu *Nasal Associated Lymphoid Tissue* (NALT) dan *Bronchial Associated Lymphoid Tissue* (BALT) (Stites, 1997; Ogra, 1999, Bienenstock, 1999). Dalam menjalankan proteksinya, maka efektor yang utama di sistem MALT, GALT dan NALT serta BALT adalah sIgA yang secara langsung disekresi ke mukosal traktus (Stites, 1997; Janeway, 1999; Bienenstock.; 1999).

2.6.1 Anatomi dan morfologi sistem imun mukosal.

Sistem imun mukosal secara anatomis dan morfologik dibagi 2 bagian utama, pertama, jaringan limfoid yang terorganisasi/kumpulan jaringan limfoid mukosa dengan kandungan folikel mukosal seperti *Gut Associated Lymphoid Tissue* (GALT), *Nasal Associated Lymphoid Tissue* (NALT) dan *Bronchus Associated Lymphoid Tissue* (BALT), yang termasuk dalam *Mucosa Associated Lymphoid Tissue* (MALT). Kedua, jaringan limfoid difus yang tersebar luas di dalam lamina propia mukosal, terdiri dari *Intraepithelial lymphocyte* (IEL) dan *Lamina propia lymphocyte* (Dermot, 1984 ; Stites, 1997).

1. Kumpulan jaringan limfoid mukosal

Kumpulan jaringan limfoid ini menerima antigen melalui epitel, hal ini berbeda dengan sistem limfoid sistemik yang menerima antigen melalui sirkulasi limfatik atau darah. Karakteristik lain pada kumpulan jaringan limfoid mukosal ini adalah antigen masuk melalui epitel yang disebut *M cells* (*Membranous/microfold cells*) yang terletak pada deretan epitel yang melapisi kumpulan jaringan limfoid. Jaringan limfoid mukosal yang terorganisasi tersusun oleh .

a. Sel M

Sel M merupakan sel epitel yang rata/ pipih dengan karakteristik adanya bulu getar yang sangat sedikit, karena tidak berkembang. Sel M ini mempunyai lapisan tipis *glycocalyx*, sitoplasma yang kaya dengan vesikel pinositosis tetapi tidak mengandung enzim proteolitik serta tidak mengekspresikan MHC kelas II. Antigen akan berjalan melalui permukaan sel dengan proses sebagai berikut:

1. antigen pada awalnya terikat di permukaan sel M;
2. antigen dimasukkan ke dalam vesikel pinositosis,
3. vesikel kemudian berjalan ke tubuh sel;
4. antigen terlepas dalam bentuk yang tidak terdegradasi ke dalam daerah di bawah epitel atau sub epitel.

b. Area kubah atau *Area dome*

Area kubah adalah suatu area dibawah epitel kumpulan jaringan limfoid mukosal yang mempunyai banyak sel dengan beberapa sel MHC kelas II, makrofag, sel dendritik dan sel B. Disamping itu dalam area dome juga mengandung sel T, dimana sel T diketahui terdiri banyak kandungan CD4+ dan sebagian kecil CD8+, termasuk juga pada mukosal NALT (Stites, 1997; Bienenstock, 1999) Beberapa sel tersebut

mampu sebagai sel penyaji antigen atau *Antigen Presenting Cells*.

c. Sel T yang berada di folikel.

Selain di area dome, sel T juga tersebar di folikel, termasuk di senter germinal atau germinal centers, akan tetapi sebagian besar berada di area interfolikel. Keberadaan sel T CD4 lebih terdistribusi meluas di seluruh folikel mukosal, dan sel T CD8 banyak ditemukan di area interfolikel. Sel T di folikel mukosa ini memproduksi 2(dua) tipe sitokin yang bervariasi tergantung kondisi imunitas, yaitu Th-1 dan Th-2.

d. Sel B yang berada di folikel

Folikel terletak di bawah area dome yang terdiri dari senter germinal yang banyak mengandung sel B yang menghasilkan IgA dalam permukaan atau surface IgA(sIgA). Kumpulan jaringan limfoid serta sistem imun mukosal adalah tempat pengembangan sel B IgA, hanya dalam hal ini tidak menjadikan tempat terakhir guna menjadi sel plasma IgA. Kejadian ini disebabkan sebelum terjadi sel plasma, maka sel B telah meninggalkan daerah ini.

2. Jaringan limfoid mukosal difus atau tersebar

Jaringan ini mempunyai 2(dua) bagian yaitu *limfosit lamina propia* atau *lamina propia lymphocytes (LPLs)* dan *limfosit intra epitel* atau *intraepithelial lymphocytes (IELs)*.

a. *Limfosit lamina propia (LPLs)*

Populasi limfosit dalam lamina propia terdiri sel B, sel T, sel dendrit, makrofag, sel mast. Populasi tersebut jumlahnya sangat dinamis tergantung lingkungan dari antigen, dan juga besarnya lingkungan itu sendiri yang terinfeksi. Populasi sel B terutama dalam bentuk yang sudah berdiferensiasi menjadi sel plasma. Komposisi sel LPL terutama adalah sel CD4 berkisar 60-70 % (Stites, 1997). Pada manusia sel T CD4 memberikan ekspresi petanda sel memori yang tidak berproliferasi, hal ini menunjukkan adanya respons terhadap rangsangan antigen, namun berfungsi menjadi perantara membantu aktivasi dengan mensekresi limfokin. Pada mencit, populasi limfosit lamina propia yang menghasilkan IgA adalah sekitar 40 %. Disamping itu 25 % populasi limfositnya memberi ekspresi petanda sel T, khususnya sel Th2 CD4. Diperkirakan 80 % limfosit dan sel plasma memproduksi IgA, oleh sebab itulah lamina propia merupakan tempat utama produksi IgA. Sementara itu IgA dari sel B di kumpulan jaringan limfoid terorganisir mengalami diferensiasi menjadi sel plasma. Populasi sel B dan sel T dalam lamina propia relatif seimbang.

b. *Limfosit intra epitel (IELs)*

IELs adalah populasi limfosit yang terletak diantara sel epitel

permukaan mukosal dan diatas membran basalis. Perkiraan 1 (satu) IEL untuk setiap 4 – 6 sel epitel. Dilihat dari fenotipe dan morfologis berbeda dengan lamina propia, sebagai contoh sebagian besar IEL adalah sel T CD8, dimana pada tikus (mice) terdapat 90 %, pada manusia antara 50-80 % (Stites, 1997). Prosentase yang besar dari sel T CD8, maka diperkirakan IELs adalah sel sitolitik yang mempunyai fungsi benteng awal dalam pertahanan mukosal

Secara umum dapat disimpulkan, bahwa kumpulan jaringan limfoid yang menyusun sistem imun mukosal terdiri dari folikel mukosa dan jaringan limfoid difus. Di dalam ke dua jaringan limfoid tersebut mengandung antara lain; limfosit B dan limfosit T. Limfosit B banyak mengandung sIgM+, sIg A, sIg G, sedangkan limfosit T mengandung limfosit T CD4+ dan limfosit T CD8+ (Stites, 1997). IgD+ secara fungsi fisiologis tidak diketahui, dan keberadaannya relatif labil dan terdegradasi oleh suhu panas dan enzim proteolitik (Stites, 1997).

Perbedaan sistem imun mukosal dengan sistem imun sistemik memberikan gambaran yang sangat penting yaitu (Sigal, 1994; Sanderson, 1999):

1. struktur khusus yang dibentuk dalam sistem imun mukosal berupa jaringan limfoid terorganisir, merupakan tempat dimulainya induksi imun mukosal;
2. kemampuan sel T dengan sifat regulasi spesifik dan kemampuan efektor (Mc.Ghee, 1993; Stites, 1997);

3. ada *mucosal homing*, yaitu suatu sistem lintasan jalan sel dalam mukosal yang pada awalnya sel di induksi di folikel mukosal kemudian mengalami resirkulasi dan melakukan migrasi ke jaringan limfoid yang tersebar di mukosal epitel *Mucosal homing* menunjukkan karakteristik sistem imun mukosal, dengan kemampuan berbagai sel yang dibentuk folikel mukosal. Berbagai sel tersebut dapat membatasi dan memfokuskan respons imun mukosal di jaringan mukosal (Strober 1994; Stites, 1997);
4. imunoglobulin yang berperan adalah secretory IgA, karena dominan dan sifat yang resisten terhadap proteolisis (Stites, 1997, Sanderson, 1999).

Pertimbangan diatas menjadikan sistem imun mukosal menjadi sistem imun yang spesifik dan merupakan karakteristik tersendiri untuk dikaji

2.6.2 Fungsi sistem imun mukosal

Sifat proteksi terhadap suatu zat patogen atau zat asing yang membahayakan dan sifat toleran terhadap zat antigen lainnya di permukaan mukosal merupakan bentuk fungsi kebersamaan dalam sistem imun mukosal (Sanderson, 1999). Fungsi kebersamaan inilah yang merupakan faktor dukungan menjadikan sistem imun mukosal berfungsi utama dalam pertahanan tubuh di permukaan mukosal.

Dalam sistem imun mukosal yang terjadi pada saluran pencernaan, saluran urogenitalis, dan saluran pernapasan, mempunyai sifat umum yang sama, yaitu sebagai pertahanan awal, tetapi masing - masing mempunyai sifat

kekhususan sesuai dengan lokasi mukosal dan peranan yang dijalankan. Sebagai contoh, di mukosal saluran pemapasan ada hal yang cukup mempunyai peran penting, yaitu peran beberapa faktor protektif yang bersifat *innate immunity*.

Atas beberapa pertimbangan tersebut, maka agar fungsi sistem imun mukosal berjalan optimal, maka upaya melakukan pencegahan masuknya suatu antigen merupakan hal yang penting. Apabila antigen terpaksa masuk, maka harus segera diungkap mekanisme kemungkinan adanya perubahan respons imun di mukosal tersebut, sehingga diharapkan dapat berguna mencegah terjadinya akibat yang lebih kompleks terhadap respons imun tubuh.

2.6.3 Peran makrofag dalam respons imun

Di samping populasi limfosit, banyak sel lain yang mempunyai peranan dalam respons imun, yaitu fagosit mononuklear, yang terdiri dari monosit dan makrofag, serta granulosit yang disebut sebagai beberapa sel *polymorphonuclear*(PMN). PMN ini terdiri atas beberapa sel neutrofil, eosinofil dan basofil. Beberapa sel lain yang juga berperan dalam respons imun adalah mastosit dan trombosit. Sel fagosit mononuklear makrofag, merupakan fagosit profesional yang terpenting (Bellanti, 1985).

Makrofag merupakan sel matang dari monosit yang menetap di jaringan, dan di paru sebagai makrofag alveolar. Masa hidup makrofag dapat mencapai beberapa bulan bahkan tahunan dibanding sel PMN yang lain yang hanya beberapa hari saja. Peran makrofag selain dalam pertahanan dan pengawasan juga dalam pengenalan pertama dan dalam pemrosesan antigen, suatu

langkah yang mungkin perlu untuk menginduksi respons imunologik spesifik (Bellanti, 1985 ; Goldsby, 2000) .

Fungsi dalam memproses antigen inilah makrofag bertindak sebagai efektor, menghancurkan mikroorganisme serta beberapa sel ganas dan benda asing, termasuk makrofag alveolar. Diketahui bahwa makrofag termasuk komponen yang penting dalam sistem imun mukosal, karena perannya dalam memproses antigen serta mengekspresikan melalui MHC kelas II. Ekspresi MHC kelas II dan petanda permukaan sangat terkait dengan aktivitas dari sel fagositik yang didominasi oleh makrofag. Kondisi tersebut menyebabkan sel dalam keadaan teraktivasi dibanding dengan di jaringan yang lain. Disamping hal tersebut terpacunya sel B dan sel T sangat dibantu oleh makrofag, karena didorong oleh IL-1 dan IL-6, sebagai hasil produk makrofag.

2.7 Beberapa Komponen Mediator Terlarut Pada Sistem Imun

Komponen mediator terlarut adalah *soluble mediator* yang tersekresi pada sistem imun, yaitu imunoglobulin dan sitokin.

2.7.1 Imunoglobulin (Ig)

Pengertian imunoglobulin menurut hasil produkyang dihasilkan adalah suatu hasil sintesa dan sekresi akhir dari rangkaian sel B, diantaranya sel plasma. Secara struktur, molekul imunoglobulin tersusun secara asimetris oleh 4 (empat) rantai polipeptida yang dihubungkan oleh jembatan disulfida (Reeves, 1996).

Ada 5 (lima) kelas imunoglobulin di manusia, yaitu Ig G, IgA, IgM, IgD dan IgE:

1. Imunoglobulin G

Imunoglobulin G(IgG) adalah imunoglobulin yang terbanyak di cairan tubuh internal (Reeves, 1996), dan dalam serum orang dewasa normal mempunyai jumlah 75% dari imunoglobulin total (Kresno, 1996; Parslow, 1997). IgG terbagi menjadi 4 (empat) sub kelas, yang ditandai dengan IgG1, IgG2, IgG3 dan IgG4.

Diantara semua kelas imunoglobulin, IgG paling mudah berdifusi ke dalam jaringan ekstrasvaskuler dan melakukan aktivitas antibodi di jaringan. Kondisi inilah menyebabkan kajian respons imun pada jaringan mukosa sangat penting memfokuskan IgG, dan IgG umumnya melapisi mikroorganisme sehingga partikel itu lebih mudah difagositosis. Di dalam darah IgG mempunyai waktu paruh sekitar 23 hari (Bernier, 1985). Di sisi lain spesifitas imunoglobulin yang lain dalam proteksi epitel mukosa adalah IgA(Biewenga, 2000).

2. Imunoglobulin A

Imunoglobulin A merupakan kelas imunoglobulin terbanyak ke dua dalam hal jumlahnya di serum. IgA ini diproduksi dalam jumlah besar oleh sel plasma dalam jaringan limfoid yang terdapat di saluran pencernaan, saluran pemapasan dan juga di urogenital kesemuanya sudah dalam bentuk dimer

Dalam sel limfoid pada lapisan dinding traktus terdapat sintesis imunoglobulin IgA sekretoris. Kelas Ig A ini sangat penting pada permukaan mukosal, khususnya pada traktus karena sangat berdekatan dengan dunia luar (Belanti, 1985; Bienenstock., 1999, Biewenga, 2000).

Dalam prosesnya IgA dirangkaikan dengan komponen sekretorik (*secretory component*) yang diproduksi oleh sel epitel lokal. Keberadaan komponen sekretorik ini diperkirakan sebagai reseptor, sehingga IgA mudah menembus epitel mukosal melalui endositosis. Rangkaian IgA dengan komponen sekretorik, menyebabkan IgA akan dilepaskan ke dalam cairan sekresi . Fungsi dari komponen sekretorik adalah memberi kemudahan jalan atau transportasi IgA ke dalam cairan sekresi. Fungsi lain dari komponen sekretorik adalah memberi perlindungan IgA terhadap enzim proteolitik yang berada dalam cairan sekretori tersebut (Roitt, 1988).

Kemampuan IgA selain mengikat virus dan bakteri guna mencegah mikroorganisme melekat pada permukaan mukosal, IgA juga berfungsi membatasi absorpsi antigen, khususnya yang berasal dari makanan (Kresno, 1996). Waktu paruh dalam darah berkisar 3 hari , namun terpanjang antara 5-6 hari (Kresno, 1996). Keberadaan IgA dalam darah umumnya dalam bentuk monomer dan jumlahnya sekitar 15 % dari jumlah total imunoglobulin.

3. Immunoglobulin M (IgM)

Imunoglobulin M (IgM) merupakan imunoglobulin dengan molekul yang paling besar (Kresno, 1996). Besarnya molekul tersebut menyebabkan keberadaan IgM sering ditemukan di intravaskular. Jumlah total IgM dalam serum diperkirakan sekitar 5-10% dari total imunoglobulin lainnya.

IgM merupakan kelas imunoglobulin yang paling awal dibentuk karena rangsangan antigen, kelemahan respons IgM adalah mempunyai waktu pendek hanya beberapa hari, dan kemudian menurun. Waktu paruh dalam darah sekitar 5 hari (Parslow, 1997).

4. Immunoglobulin D

Imunoglobulin D (IgD) merupakan imunoglobulin dalam serum jumlahnya sangat sedikit, begitu pula peran biologiknya sebagai antibodi humoral belum jelas (Kresno, 1996). Di lain pihak keberadaan IgD relatif labil, mudah terdegradasi oleh panas dan enzim proteolitik (Parslow, 1997).

5. Immunoglobulin E

Imunoglobulin E (IgE) di dalam serum dijumpai dalam keadaan rendah, diperkirakan hanya 0,004 % dari kadar imunoglobulin total (Parslow, 1997). Keberadaan IgE dikenal sebagai reagin pada reaksi hipersensitifitas untuk tipe segera (*immediate type*). Sel plasma yang memproduksi IgE terdapat dalam tonsil dan sinuoid dan pada

jaringan limfoid sepanjang mukosa saluran napas dan saluran cerna (Kresno, 1996).

2.7.2 Sitokin

Banyak substansi berupa protein pengatur atau glikoprotein dengan berat molekul rendah yang disekresi oleh sel darah putih atau berbagai sel lainnya yang ada pada tubuh sebagai bentuk respons akibat sejumlah stimuli (Goldsby, 2000). Substansi tersebut dikenal dengan nama sitokin, yang berfungsi sebagai sinyal intraseluler dan mengatur respons inflamasi lokal maupun sistemik terhadap rangsangan luar (Kresno, 1996). Sitokin merupakan mediator respons imun yang sangat penting, disamping hal tersebut kemampuan berinteraksi dengan reseptor pada permukaan sel dengan afinitas yang tinggi menyebabkan sitokin menjadi substansi pokok dalam kejadian respons imun.

Begitu penting peran sitokin, maka identifikasi banyak dilakukan, antara lain sebagian merupakan mediator utama yang meningkatkan reaksi imunologik. Dalam peningkatan reaksi imunologik tersebut melibatkan makrofag, limfosit dan beberapa sel lain. Salah satu kelompok sitokin tersebut disepakati dengan nama interleukin (IL), artinya hubungan antar sel leukosit, dan perkembangan sampai saat ini interleukin sangat banyak diidentifikasi, yang diberi nama IL-1, IL-2, dan seterusnya. Sitokin dan reseptor merupakan molekul yang berperan sebagai aktifator di dalam terjadinya respons imun (Laszlo, 1993).

a. Interleukin –2

Produksi IL-2 dihasilkan oleh sel T yang teraktivasi oleh *thymocyte*, dan yang teraktivasi oleh IL-2 adalah suatu protein dengan

kemampuan sel T yang sedang aktif, namun dalam pengaruhnya terhadap sel B membutuhkan konsentrasi yang cukup besar (Oppenheim, 1997). Produk IL-2 juga berpengaruh terhadap sel natural killer (NK), sehingga sel ini berproliferasi dan mempunyai sifat sitotoksik, dan IL-2 secara spesifik juga membantu mengaktifkan sel Th2. Terinduksinya sintesis IL-2 disebabkan oleh berbagai stimuli, antara lain antigen spesifik.

b Interleukin-4

IL-4 diproduksi oleh sel Th2, sel mast dan juga sel NK (Oppenheim, 1997, Goldsby, 2000). IL-4 mempunyai peran dan fungsi ko-stimulasi sel B, juga menstimulasi proliferasi dan diferensiasi, khususnya merangsang diferensiasi sel Th2. Di sisi lain IL-4 menyebabkan *class switch* ke IgG1 dan IgE.

Pada sel matang atau *mast cell*, IL-4 dapat menstimulasi pertumbuhan, sedangkan pada makrofag dapat meregulasi ekspresi MHC kelas II serta meningkatkan aktivitas fagositosis. Di sisi lain bila terjadi suatu defisiensi IL-4 di mukosa oral, maka IL-4 justru menjadi faktor yang membantu diferensiasi dan proliferasi TGF beta (Weiner, 1997). Peran dan fungsi IL-4 sangat luas, baik sebagai growth factor dan faktor diferensiasi pada beberapa macam sel, tetapi mempunyai pengaruh dominan terhadap sel B.

c. Interleukin IL-5

IL-5 adalah sitokin yang diproduksi oleh sel matang (mast cell), sel T, khususnya Th2, di samping itu dapat menyebabkan proliferasi dan diferensiasi sel B serta produk antibodi (Oppenheim, 1997; Nijkamp, 1999; Goldsby, 2000). IL-5 mempunyai dampak yang sama dengan IL-4 terhadap diferensiasi eosinofil dan peningkatan kapasitas sel T sitotoksik (Tc). Dalam studi in vivo, IL-5 sebagian besar meregulasi eosinophil dalam kasus infeksi cacing dan penyakit alergi (Oppenheim, 1997).

d Interleukin-6

IL-6 diproduksi oleh monosit, makrofag, sel Th2, sel stromal sumsum tulang, sel endotel, sel epitel, fibroblast dan mengaktifasi sel T dan sel B (Oppenheim, 1997; Goldsby, 2000). Aktivitas yang menonjol akibat sekresi IL-6 adalah peningkat diferensiasi akhir ke dalam sel plasma ketika proliferasi sel B. IL-6 dapat dipakai sebagai kontrol dalam produk IgA, bila IgA rendah IL-6 rendah, begitu juga sebaliknya (Husband, 1999).

d Interleukin 10

Interleukin 10 diproduksi oleh sel Th2 dan sel target adalah makrofag dengan peran dan fungsi menekan produk sitokin dan secara tidak langsung mengurangi produksi sitokin yang dikeluarkan oleh sel Th1 (Goldsby, 2000). Produksi IL-10 dapat dihambat oleh IL-4 dan oleh IFN γ , di samping itu dalam studi

IL-10 pada murine nampak tidak jelas sebagai suatu kofaktor bagi TGF beta dalam *switching* isotope IgA (Husband, 1999). Ketidakjelasan peran sebagai kofaktor tersebut, maka berarti IL-10 kurang jelas perannya di mukosal, khususnya bila dikaitkan dengan produk IgA.

e. Interferon gamma (IFN γ)

IFN γ predominan diproduksi oleh beberapa sel T-CD4 (Th0 atau Th1), sel T-CD8, dan sel *Natural Killer* (NK) (Husband, 1999). IFN disebut juga sebagai regulator postif utama pada imunitas yang melalui aktivitas sel (*cell mediated immunity*), namun keberadaan IFN γ belum jelas dalam respons IgA mukosal (Husband, 1999).

2.8 Respons Imun Mukosal Saluran Pernapasan

Peran jaringan limfoid mukosal secara umum terhadap pertahanan saluran pernapasan merupakan faktor yang penting, dengan peran utama adalah menghadapi antigen atau benda asing yang masuk melalui inhalasi (Bienenstock, 1999). dengan fungsi jaringan limfoid pada NALT (*Nasal Associated Lymphoid Tissue*) dan BALT (*Bronchus Associated Lymphoid Tissue*).

Pada sistem NALT, peran yang menonjol adalah sebagai tempat lokasi induktif imunokompeten yang berfungsi dalam pengaturan dan ekspresi terhadap respons sistemik maupun di lokal mukosal (Bienenstock, 1999). Karakteristik lain pada sistem NALT, walaupun sebagai daerah induktif bagi sel B, tetapi tidak

seefektif seperti pada Peyer's Patch pada GALT, tetapi CD4+ masih mempunyai peran yang sangat dominan.

Beberapa faktor spesifik pada sistem mukosal saluran pernapasan yaitu:

1. mukus yang menjadikan barrier antara epitel dan penyebab gangguan;
2. epitel bersilia.

Atas pertimbangan tersebut, maka agar fungsi sistem imun mukosal berjalan optimal, termasuk sistem imun mukosal saluran pernapasan, maka upaya melakukan pencegahan masuknya suatu antigen merupakan hal yang penting, guna menghindari adanya kerentanan bila individu yang menderita suatu gangguan saluran pernapasan, khususnya infeksi akut. Di lain pihak, bila antigen terpaksa masuk, maka harus segera diungkap mekanisme yang mungkin bisa menimbulkan modulasi respons imun di mukosal yang merugikan, guna mencegah terjadinya akibat yang lebih kompleks. Keberhasilan membatasi antigen yang ada di lokasi mukosal atau konsentrasinya yang rendah dan tanpa merusak jaringan, sangat tergantung keseimbangan respons imunologiknya (Hussle, 1999).

Keterbatasan dalam teori mukosal saluran pernapasan, peneliti banyak mengekstrapolasi dari fungsi dan struktur MALT (*Mucosal Associated Lymphoid Tissues*). Studi agregasi dari BALT dan beberapa sel imunokompeten yang terkait akan memberikan gambaran mekanisme yang mendalam dalam suatu pertahanan mukosal, baik dalam sistem bronkus-paru maupun jaringan mukosal secara umum, dengan dapat menganalogikan seperti yang terjadi pada Peyer's

Patch, walaupun daerah fungsional dan struktural belum jelas (Bienenstock, 1999).

2.9 Pengaruh Pb Melalui Inhalasi Terhadap Respons Imun.

Pengaruh paparan Pb melalui inhalasi terhadap respons imun secara spesifik belum banyak diungkap. Perkembangan selanjutnya diketahui, bahwa Pb telah terbukti sebagai penekan sistem ketahanan tubuh imunologik (immunosuppressor) (Rocke, 1991; Trust, 1990). Dalam berbagai penelitian terbukti, bahwa paparan timbal juga mempengaruhi sistem imunologik humoral dan seluler (Dean 1986, Queiroz, 1994). Sebagai penekan sistem ketahanan tubuh, Pb mengganggu keseimbangan rasio Th1 dan Th2 dengan cara menghambat Th1 dan meningkatkan Th2 (Heoy, 1998). Partikel Pb dapat berikatan protein (Fullmer, 1990), sehingga ikatan kompleks dengan molekul yang besar, akan dapat memodulasi respons imun, terbukti Pb dapat menstimulasi terjadinya proliferasi limfosit dengan mengaktifkan interaksi sel T dan sel B (Razani, 1999). Di sisi lain, Pb mempunyai pengaruh terhadap aktifitas sel T-CD8, terbukti ada suatu beda yang signifikan prosentase sel CD8 yang tinggi terjadi pada pekerja yang terekspose Pb dibanding yang tidak terekspose Pb (Sata F, 1997).

Keberadaan partikel Pb di udara dengan konsentrasi sebesar $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dapat mengganggu sel imunokompeten pada saluran pernapasan, seperti yang terjadi pada tikus dengan terganggunya produksi sel makrofag alveolar dalam waktu 3-12 bulan (Bingham, 1968, 1973). Pada konsentrasi $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ lama

paparan 3 jam per hari selama 4 hari, Zelikoff membuktikan, bahwa pada tikus setelah 72 jam dari akhir paparan terbukti adanya aktifitas yang menunjukkan fungsi makrofag alveolar dalam menjalankan fungsinya melakukan fagositosis tertekan, dengan indikasi meningkatnya $TNF\ \alpha$ (Zelikoff, 1993).

Partikel Pb masuk melalui inhalasi melalui pintu awal mukosal saluran pernapasan, yang terkait dengan jaringan limfoid yang berhubungan dengan NALT (*Nasal Associated Lymphoid Tissues*) dan bronkus atau BALT (*Bronchus Associated Lymphoid Tissues*) (Stites, 1997; Goldsby, 2000). Induksi pada NALT dan BALT oleh partikel Pb, akan menimbulkan perubahan perilaku sel imunokompeten di mukosal saluran pernapasan, dan di samping itu juga kemungkinan partikel Pb dengan diameter $< 2\ \mu m$ dapat langsung terdeposit di jaringan paru, dalam pengamatan dapat terlihat pada makrofag alveolar.

Partikel Pb merupakan golongan logam berat, sebagai suatu stresor, sehingga sel imunokompeten mengalami kondisi yang berbeda, sehingga menghasilkan produk yang akan berbeda. Kondisi inilah yang diasumsikan sel mengalami stres (*stress cell*) akibat paparan partikel Pb secara inhalasi, sehingga terjadi adanya modulasi respons imun mukosal saluran pernapasan, karena perubahan perilaku sel imunokompeten pada mukosal saluran pernapasan.

Pengertian sel yang mengalami stres (*stress cell*) adalah adanya transaksional dan interaksional antara sel dan lingkungannya. Beberapa sel imunokompeten dalam mukosal saluran pernapasan akan mengalami stres akibat dan paparan partikel Pb yang terkandung dalam gas buang motor bakar berbahan bakar premium, sehingga sel tersebut akan mengalami perubahan perilaku dan

fungsi. Perubahan perilaku dan fungsi inilah yang akan mengakibatkan terjadinya modulasi respons imun pada mukosal saluran pernapasan. Partikel Pb tersebut merupakan stresor, dan dengan batasan yang mempunyai konsentrasi berkisar $>2 - <10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ udara .

2.10 Sistem Imun Mencit

Penelitian ini untuk melihat mekanisme respons imun dan kandungan Pb atau deposit pada paru, sehingga secara etika dilakukan penelitian dengan hewan coba. Dalam penelitian Pb di hewan jarang mendapatkan hasil yang berbeda bila dilakukan di manusia (WHO, 1977).

Sebagai penelitian detail sistem imun seluler pada manusia, maka mencit dapat dipakai sebagai model (Clark, 1983). Beberapa alasan pemakaian mencit sebagai hewan coba untuk uji biologi adalah :

1. struktur tubuh yang kecil membutuhkan ruangan yang kecil, sehingga memudahkan pemeliharaan;
2. karakteristik mencit mudah beradaptasi dengan kandang dan lingkungan di sekitar kandang;
3. harga relatif murah;
4. dibanding hewan yang lain, maka pengungkapan sistem imun lebih banyak diperoleh di mencit (Hudson, 1976).

Pertimbangan, pemakaian mencit jantan, adalah tidak akan mengganggu proses penelitian, sebab dimungkinkan bila mencit betina, maka akan hamil, dan masa hamil berkisar 19-21 hari (Smith JB, 1988), tentunya kondisi kehamilan

akan mengganggu kondisi imunitas, padahal penelitian akan berlangsung selama 30 hari. Di samping itu, berat mencit jantan dan betina relatif tidak sama, sebab mencit dewasa jantan berkisar 20-40 gram, dan mencit dewasa betina berkisar 18-35 gram. Kondisi inilah yang mendasari mencit jantan lebih memenuhi kriteria dalam penelitian.

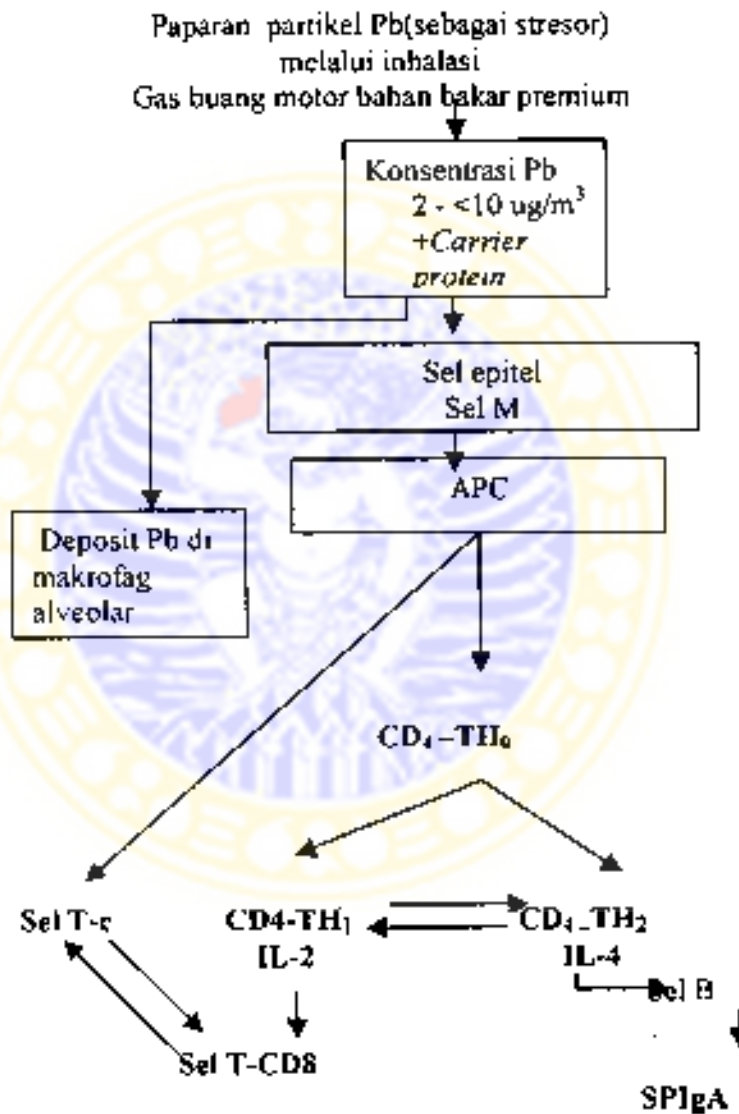


BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Kerangka konseptual dalam penelitian ini digambarkan seperti berikut :



Gambar: 3.1. Kerangka Konsep Penelitian

Penjelasan kerangka konsep

Gas buang bermotor, yang berbahan bakar premium, mengandung partikel Pb, dan sangat potensial terhirup dan terjadi induksi awal di mukosal saluran pernapasan. Kemampuan partikel Pb yang terikat pada *carrier protein* (Fullmer, 1990), menjadikan partikel Pb dalam ikatan kompleks tersebut, bisa memodulasi respons imun mukosal saluran pernapasan.

Partikel Pb dengan konsentrasi $>2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $> 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dengan karakteristik berupa besar diameter yang kurang dari $2 \mu\text{m}$, ada yang akan masuk ke alveolus, dan akan mengganggu makrofag alveolar dengan penambunan partikel Pb. Sifat partikel Pb yang persisten (Yatim, 1996), kemungkinan akan menimbulkan deposit Pb dalam sel tersebut. Partikel Pb yang berdiameter lebih besar akan menginduksi di mukosal saluran pernapasan. Setelah melalui sel M, sel akan mempresentasikan antigen (APC), dimungkinkan pula partikel Pb yang masuk melalui sel M akan disajikan oleh APC pada MHC kelas II, sehingga dapat menginduksi sel Thelper -CD4 yang akan berubah morfofungsi sebagai sel Th1-CD4 dengan memproduksi IL-2.

Partikel Pb dalam induksi terhadap sel T-CD4 dimungkinkan dapat secara langsung mempengaruhi sel T-CD8, berarti melibatkan peran MHC kelas I.

Produk IL-2 akan membantu perubahan morfofungsi sel CD4 Th0 menjadi sel Th2 -CD4 yang menghasilkan IL-4. Selain itu IL-2 dapat memicu sel T menjadi sel T sitotoksik -CD8.

IL-4 sebagai produk Sel T-CD4 akan memicu sel B dan berdiferensiasi dan dimungkinkan berpengaruh terhadap produk IgA pada mukosal

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis Penelitian

1. Ada perbedaan respons imun mukosal saluran pernapasan pada mencit Balb/c yang terpapar gas buang motor berbahan bakar premium yang mengandung partikel Pb konsentrasi berkisar $> 2 - < 10 \text{ ug/m}^3$ dengan yang terpapar gas buang motor bahan bakar premium yang tidak mengandung partikel Pb selama 3 jam/hari dalam waktu 30 hari.
2. Ada perbedaan jumlah makrofag alveolar yang mendeposit Pb pada mencit Balb/c yang terpapar gas buang motor berbahan bakar premium yang mengandung partikel Pb konsentrasi berkisar $> 2 - < 10 \text{ ug/m}^3$ dengan yang terpapar gas buang motor bahan bakar premium yang tidak mengandung partikel Pb selama 3 jam/hari dalam waktu 30 hari.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen hewan (*experimental animal*) dengan rancangan *the post test only control group design*. Alasan menggunakan rancangan ini adalah karena populasi ditetapkan tertentu, yang terdapat homogenisasi di tiap unit populasi, dengan kata lain karakteristik antar unit populasi dikriteriakan sama. Pengukuran awal tidak dilakukan, karena untuk semua kelompok berasal dari satu populasi, sehingga dikembangkan rancangan eksperimental tanpa ada pengukuran awal/pretest, dan hanya post test (Zainuddin, 1988).

Dukungan penggunaan rancangan ini adalah pemakaian sumber paparan berasal dari satu sumber, sehingga pengaruh perbedaan sumber paparan diminimalisasi sekecil mungkin



Gambar 4.1 Rancangan desain penelitian

Prinsip dasar sebagai persyaratan studi eksperimental adalah (dua) persyaratan. Persyaratan pertama adalah replikasi atau pengulangan yaitu kondisi perlakuan diberikan sama dengan seluruh sampel dalam seluruh kelompok perlakuan. Persyaratan kedua adalah sistem acak atau randomisasi yang dilakukan dalam pembagian sampel penelitian sejumlah 2(dua) kelompok penelitian, yaitu kelompok yang diberi paparan Pb melalui inhalasi, dan kelompok yang tanpa diberi paparan Pb atau kelompok kontrol. Kelompok kontrol digunakan agar menambah validitas hasil penelitian (Zainuddin, 1988; Widodo, 1993).

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian yang dipakai adalah mencit Balb/c pemeliharaan yang bebas dari paparan Pb berasal dari kandang hewan Pusat Veterenaria Farma Direktorat Jendral Peternakan Departemen Pertanian RI di Wonocolo Surabaya. Mencit diseleksi dengan jenis kelamin jantan, dengan berat badan 20-40 gram, dan umur 35 sampai 60 hari. Kedewasaan mencit diharapkan secara relatif tidak akan mengalami berat badan yang berbeda (Hume, 1972).

Mencit dipelihara dengan persyaratan pemeliharaan mencit dilengkapi kontrol, pengawasan lingkungan, pengawasaan status kesehatan, pengawasan pekerja dan peneliti serta pengawasan makanan dan minuman.

4.2.2 Sampel dan besar sampel

Populasi (N) penelitian tidak diketahui, dan sampel terbagi menjadi 2(dua) kelompok berpasangan, yaitu kelompok perlakuan dan kontrol, maka rumus n yang dipakai adalah :

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 OD^2}{d^2}$$

Keterangan :

n = besar sampel masing-masing kelompok sampel

Z_{α} = nilai standar normal yang besarnya tergantung α , dengan ketentuan sebagai berikut: bila $\alpha = 0,05$, maka $Z = 1,96$

bila $\alpha = 0,01$, maka $Z = 2,57$

α = α error

β = β error (Widodo, 1993; Steel RGD dan James H.Torrie, 1993)

Bagi kelompok atau grup yang berpasangan(*paired group*), $QD^2/d^2 = 1$, sehingga bila dipakai $\alpha = 0,05$, $\beta = 0,10$, maka *power test* $(1-\beta) = 0.90$, didapatkan hasil :

$$n = (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \quad , \text{ karena } Z_{\alpha} = 1,96, \text{ dan } Z_{\beta} =$$

1,65, maka harga n adalah $(1,96 + 1,65)^2 = 13,032$ dibulatkan 13 (tiga belas) sampel. Atas perhitungan tersebut, maka jumlah sampel mencit Balb/c setiap kelompok berjumlah 13(tiga belas) ekor. Waktu paparan yang dirasakan cukup lama, yaitu 30 hari , maka untuk menghindari besar sampel yang mati, besar sampel setiap kelompok ditambah 25 % atau 4 ekor, sehingga seluruh sampel per kelompok 17 ekor, atau keseluruhan 2 kelompok x 17 adalah 34 (tiga puluh empat) ekor.

4.2.3 Teknik pengambilan sampel

Berdasarkan kriteria sampel, dalam kandang, dilakukan pengambilan sampel secara random dengan menggunakan bilangan *random* (Snedecor, 1974), dan mendapatkan jumlah sampel 34 ekor. Populasi mencit Balb/c yang dalam kandang pemeliharaan telah diupayakan kondisi sama, baik kondisi lingkungan mikro, minuman, makanan, sanitasi kandang, jenis dan spesies mencit, usia, namun demikian masih ada perbedaan yang mungkin membuat variasi yaitu berat badan. Perbedaan berat badan dimungkinkan akan membuat perbedaan sel imunokompeten, sehingga perlu dilakukan uji homogenitas.

Proses menentukan subyek penelitian, diambil dari 34 sampel, dan selanjutnya secara random lagi dilakukan untuk mengalokasikan dalam 2 (dua) kelompok, yaitu kelompok I (PP-I), dan kelompok II(PP-II)/ Kontrol dan setiap kelompok tersebut ditentukan 17 (tujuh belas) sampel.

4.3 Klasifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

4.3.1 Klasifikasi variabel

a. Variabel bebas

Partikel Pb yang terkandung dalam gas motor bakar berbahan bakar premium dengan pengaturan debit gas buang secara konstan melalui instrumen volumetrik standard, yang akan menghasilkan konsentrasi partikel Pb berkisar antara 2 ug/m³ –10 ug/m³ selama 3 jam/hari dalam waktu 30 (tiga puluh) hari.

b. **Variabel pengganggu**

Suhu udara, kelembaban udara.

c. **Variabel kendali**

Berat mencit Balb/c, jenis kelamin mencit jantan Balb/c, kondisi/karakteristik kandang mencit, pakan mencit/pelet, minuman mencit, metode pemeriksaan sel imunokompeten, dan cara pemberian paparan dan dosis paparan.

d. **Variabel tergantung**

Variabel tergantung adalah variabel sebagai akibat perlakuan dan yang akan diteliti, sehingga dapat menjelaskan mekanisme respons imun mukosal saluran pemapasan dengan pendekatan imunopatobiologis dengan konsep sel yang mengalami stres (*stress cell*) Variabel tersebut adalah jumlah: (1) STp IL-2, (2) STp IL-4, (3) ST- CD4, (4) ST- CD8, (5) SP IgA, (6) jumlah makrofag alveolar yang mendeposit Pb.

4.3.2 **Definisi operasional variabel**

1. Paparan partikel Pb adalah pemberian gas buang motor bakar berbahan bakar premium yang mengandung partikel Pb yang dideteksi dengan analisis kandungan partikel Pb dengan konsentrasi berkisar $>2 \text{ ug/m}^3 - <10 \text{ ug/m}^3$ udara selama 3 jam/hari dalam periode 30 (tiga puluh) hari, dengan pengukuran konsentrasi Pb standar 1 jam.

2. Respons imun mukosal suatu respons yang bersifat kolektif dan terkoordinasi yang diberikan oleh beberapa sel yang bertanggung jawab terhadap sistem imun mukosal akibat oleh adanya substansi asing yang masuk dalam tubuh yang dapat diamati baik secara seluler maupun humoral (Bienenstok; Goldsby, 2006), dalam penelitian ini dihitung sel imunokompeten adalah jumlah ST-CD4, ST-CD8, STp IL-2, STp IL-4, dan SPtIgA.
3. Mukosal saluran pernapasan adalah mukosal yang berada di saluran pernapasan dalam cakupan BAL.T (*Bronchus Associated Lymphocyte Tissue*).
4. Deposit Pb di paru adalah terdapatnya partikel Pb pada makrofag alveolar yang dideteksi melalui pemeriksaan jaringan dengan metode *Mallory and Parker's Haematoxylin* (Smith, 1978), dengan penghitungan prosentase sel yang positif dalam keberadaan Pb, yang ditunjukkan dengan warna sel biru gelap keabuan (*dark blue grey*).

4.4 Bahan Penelitian

1. Hewan coba yang dipakai adalah mencit *Mus musculus* dengan galur Balb/c berumur 35 hari sampai 60 hari, dengan berat badan dalam kisaran 20 - 40 gram, dengan jenis kelamin jantan. Untuk analisisnya digunakan mukosa saluran pernapasan (BAL.T) yang diproses secara imunohistokimia guna menampilkan variabel

2. Partikel Pb adalah partikel yang terkandung dalam gas buang motor berbahan bakar premium, dengan kisaran konsentrasi $> 2 \text{ ug/m}^3 - < 10 \text{ ug/m}^3$ dengan metode paparan pengaturan debit gas konstan. Debit gas yang digunakan adalah dalam kisaran $40 \text{ cc/menit} - 82,5 \text{ cc/menit}$.
3. Paparan gas buang bebas Pb untuk kelompok kontrol.

Untuk mendapat perlakuan yang sama, kecuali partikel Pb yang diberikan pada kelompok paparan, maka gas buang hasil pembakaran premium yang menghasilkan Pb, harus dihilangkan partikel Pb yang dikandung. Untuk mendapatkan gas buang premium tanpa Pb, maka dilakukan penghilangan dengan suatu bahan cairan yang dapat menangkap Pb, dan relatif sempurna, karena tingkat pengendapan Pb baik dan tinggi, yaitu endapan Pb(OH)_2 (IRITA, 1987). Cairan yang digunakan adalah Ca(OH)_2 pada ujicoba, hasilnya sempurna pada Ca(OH)_2 konsentrasi 25 % dengan debit gas buang debit gas buang (lihat hasil ujicoba pada lampiran 1).

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Instrumen penghasil partikel Pb

Penghasil partikel Pb adalah motor bakar, berupa generator dengan merek XXX, baru yang berbahan bakar premium, sebagai pengganti kendaraan bermotor berbahan bakar premium. Sebagai alat pembakar dengan bahan bakar

premium, maka gas buang yang dihasilkan akan tetap sama dengan gas buang kendaraan bermotor berbahan bakar yang sama (Peavey, 1985). Untuk kelompok kontrol dilewatkan dengan larutan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 25 % (sesudah dilakukan penelitian pendahuluan), karena cara tersebut dapat menghilangkan Pb.

4.5.2 Instrumen pengatur debit gas buang

Instrumen pengatur debit gas buang adalah instrumen *century flowmeter* dengan standard Tube katalog No 448-035 (Lab.Crest Div F& P.CO, Meter Tube Cat No.448-035), untuk gas, dengan konversi angka dalam tube ke tabel yang sesuai standard, maka akan ditemukan debit yang diinginkan, yaitu 40 cc/menit – 82,5 cc/menit (Tabel konversi seperti dalam lampiran 2) . Instrumen pengatur debit gas buang mendapatkan konsentrasi kisaran yang diinginkan yaitu konsentrasi Pb berkisar 5,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ – 6,8 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

4.5.3 Instrumen tempat paparan

Boks paparan disesuaikan dengan model boks suatu pencemaran udara dengan mempertimbangkan *breathing zone* (titik kemampuan inhalasi optimal) dari hewan coba. Ilustrasi instrumen berupa model boks paparan seperti pada lampiran 3 (tiga).

4.6 Lokasi Dan Waktu Penelitian

4.6.1 Lokasi penelitian

Penelitian (pemaparan dan pemeriksaan variabel) dilakukan di:

1. Laboratorium Gramik Unair untuk pemeriksaan immunohistokimia.

2. Laboratorium Balai Teknik Kesehatan Lingkungan Surabaya untuk pemeriksaan kandungan Pb di udara.
3. Lokasi paparan ditempat yang memenuhi persyaratan paparan pencemaran udara, jauh dari pengaruh jalan yang padat kendaraan bermotor dan memenuhi syarat dalam pemeliharaan hewan coba, di Pusat Veterenaria Farma Jl, A. Yani 68-70 Surabaya .
4. Lokasi Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, untuk pengambilan gambar sel yang telah dilakukan perwarnaan sesuai kareakteristik yang ditentukan.

4.6.2 Waktu penelitian

Waktu penelitian dirinci menurut kegiatan sebagai berikut :

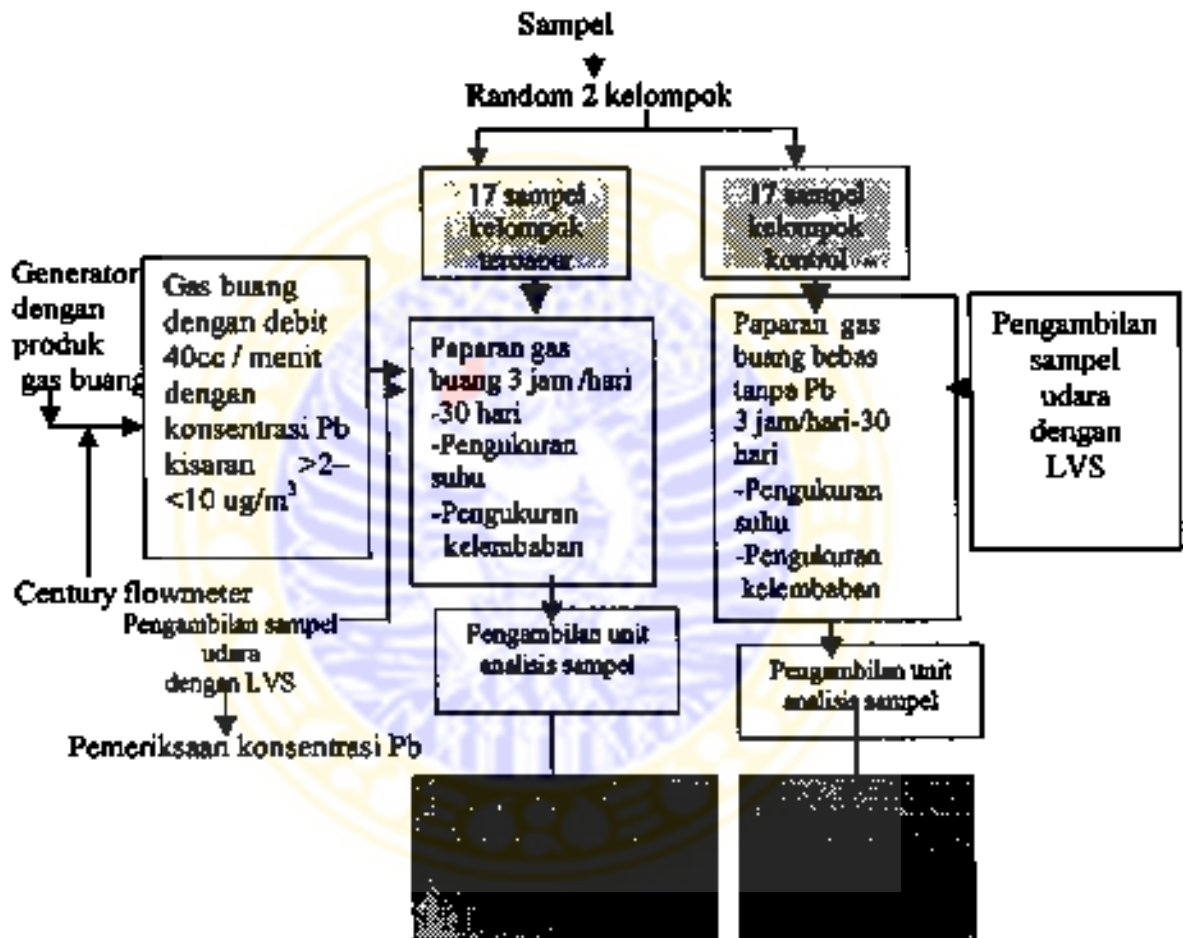
1. Penelitian pendahuluan 1 (satu) bulan
2. Persiapan instrumen 4 (empat) bulan
3. Penyesuaian dosis paparan 1(satu) minggu
4. Uji coba paparan 1 (satu) minggu
5. Pelaksanaan penelitian berupa pemberian paparan selama 30 hari.
6. Pemeriksaan variabel penelitian 4 (empat) bulan
7. Pengumpulan, pengolahan dan analisis hasil penelitian 3 (tiga) bulan
8. Penulisan hasil penelitian 2 (dua) bulan

4.7 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

Prosedur pengambilan dan pengumpulan data dilakukan sejak awal proses penelitian Kerangka operasional di bawah ini yang akan dipakai dalam

melakukan penelitian. Dalam pelaksanaan penelitian, peneliti berpedoman dengan kerangka operasional, sehingga diharapkan mendapatkan data yang sesuai dengan tujuan penelitian.

Kerangka operasional penelitian adalah sebagai berikut :



Gambar 4.2. Kerangka Operasional Penelitian

4.7.1 Prosedur pemberian paparan partikel Pb yang terkandung dalam gas buang.

a. Prosedur pemberian paparan.

Sumber paparan adalah generator xxx yang berbahan bakar premium, dan untuk pengaturan debit dengan century flow meter. Untuk mendapatkan konsentrasi partikel Pb sesuai konsentrasi yang diinginkan yaitu berkisar $>2 \text{ ug/m}^3$ - $<10 \text{ ug/m}^3$, dilakukan penelitian pendahuluan, hasil penelitian pendahuluan yang telah dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi tersebut dengan coba debit dan pengukuran partikel Pb seperti dalam lampiran 4.

Debit gas buang yang dipakai dalam penelitian ini adalah dalam kisaran 40 cc/menit- 82,5 cc/menit, dengan konsentrasi Pb yang dihasilkan kisaran $5,5 \text{ ug/m}^3$ - $6,8 \text{ ug/m}^3$, konsentrasi yang dihasilkan ini mendekati rerata debit dalam kisaran $>2 \text{ ug/m}^3$ - $<10 \text{ ug/m}^3$, untuk paparan selama 3 jam/ hari, periode 30 hari.

b. Prosedur perlakuan hewan coba selama paparan.

Hewan coba ditempatkan di model boks paparan (lihat gambar pada lampiran 2) selama 3 (tiga) jam/ hari, kemudian setelah selesai perlakuan dikandangan ke kandang pemeliharaan, demikian seterusnya selama 1 (satu) bulan atau 30 hari.

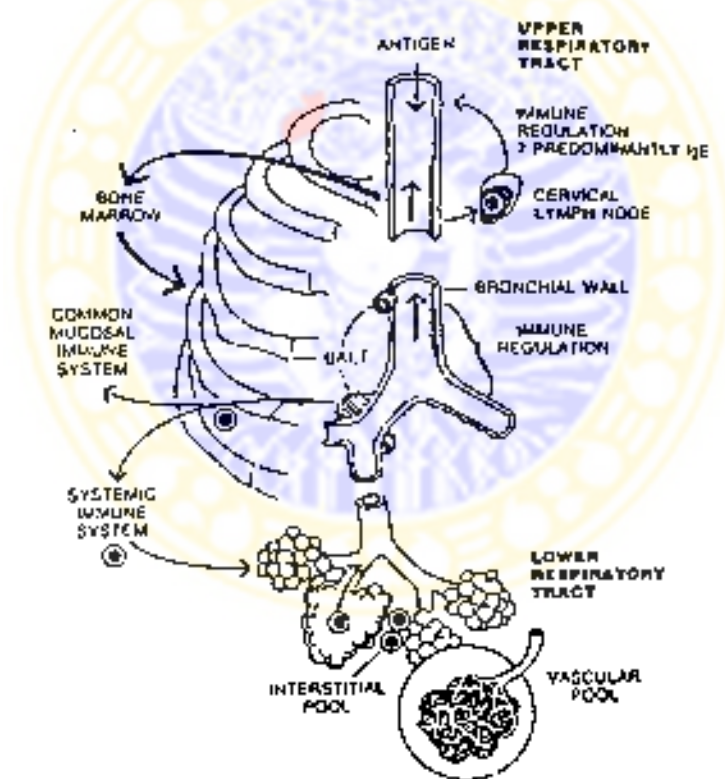
c. Prosedur perlakuan hewan coba kontrol

Semua prosedur dilakukan sama antara hewan coba yang diberi perlakuan dan kontrol, kecuali perbedaan yang ada bagi hewan kontrol

adalah tanpa partikel Pb yang terkandung dalam gas buang motor berbahan bakar premium (partikel Pb telah ditangkap/diendapkan sebelumnya).

4.7.2 Unit analisis

Bahan yang dianalisis adalah jaringan mukosal saluran pemapasan, adalah mukosa yang ada di *Bronchus Associated Lymphocyte Tissue (BALT)*, yang mempunyai lokasi terjadinya respons imun mukosal (Bienenstock J, 1999), dan paru yang mengandung alveoli (*respiratory alveoli*) (Telford IR, 1995) mencit Balb/c, untuk melihat keberadaan Pb di makrofag alveolar.



Gambar 4.3: Lokasi BALT (Sumber: Bienenstock J, 1999)

Jaringan dimasukkan ke dalam botol dan dimasukkan segera ke dalam deep freezer dengan suhu -70° Celcius. Semua variabel yang akan diteliti,

dengan cara jaringan segar dilakukan pewarnaan imunohistokimia, dengan antibodi monoklonal untuk sel T CD4, T CD8, sel Th1 yang mensekresi IL-2, sel Th2 yang mensekresi IL-4, sel plasma penghasil IgA.

Untuk melihat partikel Pb di sel makrofag alveolar paru, dengan cara histokimia, pewarnaan dengan *Mallory and Parker's Haematoxylin* (Smith, 1978). Dalam karakteristik pewarnaan metode ini, digunakan *Potassium dihidrogen Phosphate* (KH_2PO_4), sehingga adanya partikel Pb akan berikatan dan memberikan warna biru gelap keabuan.

4.7.3 Pemeliharaan hewan coba

Mencit Balb/c dipelihara berdasarkan persyaratan bagi kondisi dan persyaratan sesuai untuk penelitian imunologi (Smith, 1988; Svendsen, 1994). Mencit yang sudah terpilih sebagai sampel selama 1 (satu) minggu dimasukkan kandang (tempat pemeliharaan) agar menyesuaikan dengan lingkungan yang stabil, sebelum digunakan pengujian penelitian.

a. Kandang hewan coba

Mencit Balb/c dipelihara dalam bak plastik yang bisa menampung maksimal 10 mencit, dan ukuran kandang 55 x 33 x 20 cm (Svendsen, 1994; Smith JB, 1988), ditutup dengan anyaman kawat, dan pada dasar bak diberi sekam. Karena jumlah seluruh sampel adalah 34 ekor, maka diperlukan 4 (empat) kandang plastik. Perlakuan bak sebelum digunakan dibersihkan dengan alkohol 70 %, dan sekam dioven pada suhu 160° Celcius selama 2 jam, selanjutnya disimpan dalam tempat yang rapat dan bersih.

b. Makanan hewan coba

Mencit Balb/c selama penelitian dan pemeliharaan diberikan makanan sesuai standard yang berlaku (Smith, 1988) dengan komposisi sebagai berikut :

Tabel. 4.1 Mineral dan Makanan Mencit

Unsur	Prosentase
Kalsium	1,0 - 1,5 %
Fosfor	0,5 - 1,0 %
Magnesium	0,15 - 2,0 %
Kalium	0,8 - 0,9 %
Natrium	0,40 - 0,1 %
Kobal	0,7 mg/Kg
Tembaga	16,0 mg/Kg
Yodium	2,0 mg/Kg
Besi	250,0 mg/Kg
Mangan	105,0 mg/Kg
Seng	50,0 mg/Kg

3. Minuman hewan coba

Minuman yang diberikan selama pemeliharaan dan pengujian adalah air ad libitum (tanpa batas), berupa aqua murni, serta dan bebas dari Pb .

4.7.4 Penanganan selama pengujian

Setelah pemberian paparan selesai, yaitu selama 30 (tiga) puluh hari, maka maksimal tiga hari kemudian (Zelikoff, 1993) dilakukan pembedahan saluran pernapasan untuk diambil mukosa dan jaringan paru. Langkah berikut adalah pemotongan kecil, kemudian disimpan dalam nitrogen cair dengan suhu -80°C

4.7.5 Prosedur pemeriksaan partikel Pb udara.

Pemeriksaan dilakukan di Balai Teknik Kesehatan Lingkungan Wilayah Surabaya, begitu setiap selesai pemberian paparan. Pemeriksaan partikel di udara, termasuk Pb melalui penangkapan dengan alat Low Volume Sampler –Model SL-15 SP, melalui absorpsi filter, kemudian filter didestruksi untuk dilakukan perlakuan selanjutnya, serta dilihat konsentrasinya dengan alat Atomic Absorption Spectrophotometer (APHA, 1995) (Protokol pemeriksaan pada lampiran 5 dan metode penggunaan alat di lampiran 6 .

4.8 Prosedur Pemrosesan Jaringan.

4.8.1 Metode *frozen section*, dengan cara.

- 1 sampel jaringan segar (diambil dari tabung berisi nitrogen cair dengan suhu dibawah 80°C) di blok dengan *medium blok tissue Tek.H* dalam *Cryostat*,
- 2 penyayatan dengan *Cryostat* sayatan setebal 5 – 10 μm , untuk hal tersebut perlu suhu dalam *Cryostat* dipertahankan -25° Celsius sampai -30° Celsius,
- 3 sayatan sampel diambil dengan gelas preparat (*object glass*), kemudian dikeringkan dalam suhu ruangan selama 10 menit dan dilanjutkan fiksasi dengan aseton 100 % selama 10 menit.

Mikroskop dalam penelitian ini yang dipakai adalah merk Nikon yang dilengkapi graticulat, dengan pemeriksaan pembesaran 400x. Pewarnaan

chromogen akan memberikan warna coklat kekuningan pada sitoplasma sel yang mengandung kompleks antigen antibodi.

Pemeriksaan imunohistokimia dengan metode tidak langsung (indirect) membutuhkan bahan -

1. H_2O_2 3 %;
2. Tripsin 0,025 %;
3. Antibodi monoklonal terhadap variabel yang diteliti;
4. PBS *mines* (PH 7,4);
5. Streptavidin peroksidase;
6. Chromogen (DAB);
7. Meyers's Hematoxylin
8. Ethanol
9. Xylol
10. Entelan.

4.8.2 Metode *Parafin*.

1. Ambil jaringan;
2. Celup alkohol 50 % selama 2 x 1 jam;
3. Celup alkohol 70 % selama 2 x 1 jam,
4. Celup alkohol 80 % selama 1 jam;
5. Celup alkohol 95 % selama 2x 1 jam;
6. Celup alkohol 95 % selama 1 jam ;
- 7 Celup alkohol 100 % selama 1 jam;
8. Celup alkohol 100 % selama 1 jam;

9. Celup alkohol 100 % selama 1 jam;
10. Berikan xylol selama 1 jam;
11. Berikan xylol selama 1 jam ;
12. Berikan xylol selama 2 jam .
- 13 . Berikan Parafin cair (56 - 58⁰ C) selama 2 jam;
14. Berikan Parafin cair (56 -58⁰ C) selama 2 jam;
15. Berikan Parafin cair (56 -58⁰ C) selama 2 jam.

Dalam pemrosesan secara manual tersebut, dengan waktu tidak mencukupi, maka proses dihentikan pada tahap impregnasi yaitu pada paraffin cair (suhu 56-58⁰ C), agar jaringan tidak rusak, selanjutnya dibiarkan membeku pada suhu kamar.

Proses selanjutnya adalah melakukan *embedding* , kemudian jaringan dipotong dengan mikrotom, dengan ketebalan sekitar 4-6 mikron , berikut dilakukan pengambilan jaringan yang terpotong. Proses berikut pelekatan jaringan pada gelas preparat (*object glass*) melalui *water bath*, dan dilanjutkan untuk tahap pengecatan Spesifikasi antibodi monoklonal dan biotin (sekunder antibodi) yang dipakai untuk pengecatan sesuai dengan sel yang akan diteliti , berupa STpIL-2, STpIL-4, SPpIgA, ST-CD4,ST-CD8 seperti tersebut pada tabel 4.2:

Tabel 4.2 Anti bodi monoklonal dan biotin spesifik yang dipakai

No.	Antibodi monoklonal/Sekunder antibodi(Biotin)	Katalog	Produk
	Ab.Monoklonal		
1.	Rat anti mouse CD4	553647	Pharmingen
2.	Rat anti mouse CD8	553027	Pharmingen
3.	Rat anti mouse IL-4	554387	Pharmingen
4.	Goat anti mouse IL-2	I-8398	Sigma
5.	Goat anti mouse IgA	M-8769	Sigma
	Sekunder Ab/Biotin		
1.	Rabbit anti rat IG	DKE 046801	Dako
2.	LSAB-HRP anti Goat/rabbit/mouse	DKK 0679-11	Dako
	Assesoris.		
	-Streptavidin AB/HRP	DKK 0377-11	Dako
	-Antibody diluent	DKK 0377-11	Dako

4.9 Metode Perwarnaan

4.9.1 Perwarnaan *hematoxylin*

Untuk memberi gambaran morfologi paru yang dianalisis keberadaan Pb di makrofag alveolar, dilakukan pewarnaan dengan HE. Prosedur yang dilakukan adalah :

1. deparafinisasi, dengan memberikan xylol 3 x, alkohol absolut, alkohol 90 %, alkohol, 80 %, dan terakhir air;
- 2 selanjutnya tetesi dengan *Meyer's Haematoxylin* selama 15 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 20 menit, dan dilanjutkan penetesn eosin selama 2 menit;
3. proses selanjutnya adalah dehidrasi, yaitu diberi alkohol 80 % 2 x setiap kali 2 menit, dilanjutkan alkohol 95 % 2 kali setiap kali 2 menit, dan alkohol absolut 2 menit sebanyak 3 kali lalu dikeringkan;

4. selanjutnya, tetesi xylol selama 2 menit sebanyak 3 kali, agar jernih dan dikeringkan;
5. tetesi dengan entelan, tutup dengan *cover glass* dengan kehatian, agar gelembung udara tak terjadi, dan keringkan;
6. preparat kering disimpan dalam kotak preparat disimpan dalam kotak preparat (Sudiana, 1991).;

4.9.2 Metode pewarnaan *Mallory and Parker's Haemotoxylin*

Keberadaan Pb di makrofag alveolar dapat diperiksa dengan menggunakan metode pengecatan *Mallory and Parker's Haemotoxylin* (Smith A, 1978) dengan prosedur :

- a. Pembuatan larutan dengan reagen yang digunakan adalah :
 1. Haemotoxylin 0,1 gtt,
 2. 2 % Potassium dihydrogen phosphate 10 ml;Cara yang digunakan adalah larutkan haemotoxylin beberapa tetes pada alkohol absolut, campurkan dengan 2 % potassium dihydrogen phosphate, kemudian dilakukan penyaringan
- b. Cara atau teknik pengecatan adalah:
 1. siapkan air;
 2. deparafinisasi, dengan memberikan xylol 3 x, alkohol absolut, alkohol 90 %, alkohol 80 %, dan terakhir air;
 3. warnai sampel dalam slide dengan cairan campuran haemotoxylin segar tersebut diatas suhu 50 – 60⁰ Celcius selama 2 – 3 jam;

4. cuci pada air kran selama 10 menit;
5. lakukan dehidrasi dengan cara beri alkohol 80 % 2 x setiap kali 2 menit, dilanjutkan alkohol 95 % 2 kali setiap kali 2 menit, dan alkohol absolut 2 menit sebanyak 3 kali lalu dikeringkan;
6. selanjutnya, tetesi xylol selama 2 menit sebanyak 3 kali, agar jernih dan dikeringkan;
7. tetesi dengan entelan , tutup dengan *cover glass* dengan kehatian, agar gelembung udara tak terjadi, dan keringkan..

Makrofag alveolar mendeposit partikel timah hitam (Pb), bila berwarna biru keabu-abuan gelap (*dark blue-grey*). Dalam karakteristik perwarnaan metode ini, digunakan Potassium dihidrogen Phosphate(KH_2PO_4), sehingga adanya partikel Pb akan berikatan dan memberikan warna biru gelap keabuan.

4.9.3 Perwarnaan untuk Imunohistokimia.

Bahan yang diperlukan :

1. H_2O_2 3 %;
2. Tripsin 0,025 %;
3. Antibodi monoklonal terhadap varibael yang diteliti;
4. PBS *mines* (PH 7,4);
5. Strepptividin peroksidase;
6. Chromogen (DAB);
7. Meyers''s Hematoxylin
8. Ethanol

9.Xylol

10.Entelan.

Prosedure pelaksanaan pewarnaan sebagai berikut:

- 1.sampel dalam slide diberi batas Dako Pen, selanjutnya ditetesi H_2O_2 3 % selama 2 – 3 menit;
2. dilakukan perendaman PBS dengan PH 7.2 – 7.4 waktu 1- 2 menit dilakukan pengulangan 3 kali;
- 3.tetesi dengan tripsin dan ditunggu 6 menit pada suhu 37° Celsius dan kemudian cuci dengan PBS 3 kali, setiap kali 1 – 2 menit;
4. sampel selanjutnya ditetesi antibodi primer (yang sesuai variabel yang diteliti) dan inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian dicuci PBS selma 1-2 menit, dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali;
- 5 tahap berikutnya ditetesi dengan antibodi sekunder (*Link antibody atau Biotynilated antibody label*), dan inkubasikan selama 15 menit kemudian cuci dengan PBS 3 menit, dan dilakukan pengulangan 3 kali;
6. pemberian Streptavidin peroksidase;
- 7 tahap selanjutnya sampel ditetesi dengan larutan Chromogen (2 ml substrat ditambah 1 tetes Chromogen) dan inkubasi selama 5 menit kemudian cuci dengan PBS selama 3 menit dan lakukan pengulangan 3 kali;
- 8.lakukan pembilasan dengan aquadestilata dan dicuci dengan air /air

kran, selanjutnya sampet ditrendam dalam larutan hematoxylin selama 10 –15 menit kemudian dicelupkan 10 kali di dalam air, dan jemihkan dengan xylol;

9.tahap akhir sampel ditetesi mounting medium dengan entelan dan ditutup cover glass, guna pemeriksaan mikroskop.

4.10 Pemeriksaan Suhu dan Kelembaban

Pemeriksaan suhu dan kelembaban menggunakan alat *Portable Thermo-Hygrometers*-HI 8564-HI93640

- a. Pemeriksaan Kelembaban senagai berikut.
 1. mempersiapkan alat dengan segala perlengkapan, termasuk melakukan kalibrasi, dan pemeriksaan batu battery 9 V;
 2. tekan tombol On, maka akan segera terbaca kelembaban di tempat yang diteliti.
- b. Pemeriksaan suhu
 1. mempersiapkan alat yang ada;
 2. lakukan penekanan tombol $^{\circ}$ C, kemudian tunggu beberapa saat, maka akan ditampilkan suhu yang ada di tempat yang diteliti.

4.11 Cara Analisis Data

Sesuai dengan unit yang dianalisis, maka beberapa uji dilakukan sebagai berikut:

4.11.1 Uji homogenitas

Populasi mencit Balb/c dipersiapkan homogen, dan variabel berat badan dan umur. Variabel berat badan selama uji penelitian kemungkinan besar akan berkurang atau bertambah untuk setiap sampel, kecuali umur yang sudah dipersiapkan homogen, maka dengan waktu penelitian yang sama jelas akan tetap homogen. Atas dasar pertimbangan tersebut, maka untuk menyatakan bahwa populasi homogen, variabel yang diuji adalah berat badan mencit pada saat awal dan usia mencit sampel. Untuk variabel penyerta, berupa suhu dan kelembaban juga akan dilakukan uji homogenitas dan uji beda, selama perlakuan atau paparan

4.11.2 Uji normalitas

Untuk melihat apakah data yang diperoleh menunjukkan distribusi normal, dan sebagai prasyarat analisis multivariat, maka seluruh variabel yang diteliti akan dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*.

4.11.3 Uji beda pengamat ke I dan ke II

Untuk pemeriksaan variabel tergantung yaitu jumlah STpIL-2, STpIL-4, ST-CD4, ST-CD8, SPIgA dan keberadaan Pb di sel makrofag alveolar dilakukan pemeriksaan oleh pengamat ke I dan pengamat ke II dengan uji beda t, karena ada 2 (dua) kelompok.

4.11.4 Uji perbedaan antar kelompok sampel

Untuk menguji adanya suatu perbedaan respons imun mukosal saluran pernapasan antara kelompok perlakuan dan kontrol dilakukan uji statistik anova, yang terdiri atas:

1. *Univariate analysis of variance*, digunakan untuk menganalisis antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol dari variabel jumlah STpIL-2, STpIL-4, ST-CD-4, ST-CD-8, dan SPIgA untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap setiap komponen respons imun
2. *Multivariate analysis of variance*, digunakan untuk menganalisis antar kelompok perlakuan dan kelompok kontrol secara keseluruhan dari variabel respons imun, untuk menyimpulkan bahwa respons imun pada kelompok perlakuan ada perubahan dengan kelompok kontrol
3. Uji beda T , untuk menguji perbedaan keberadaan partikel Pb di makrofag alveolar antar kelompok perlakuan dan kontrol

4.11.5 Analisis diskriminan

Analisis diskriminan untuk menganalisis variabel respons imun mukosal saluran pernapasan variabel jumlah STpIL-2, STpIL-4, ST-CD-4, ST-CD-8, dan SPIgA , yang telah di uji dalam anova . Variabel tersebut dianalisis untuk mengetahui variabel yang ditentukan sebagai variabel pembeda terkuat (diskriminator), sehingga didapatkan kontribusi fungsi setiap variabel pembeda terkuat tersebut. Selain itu, akan didapatkan besar kekuatan dalam mengklasifikasi sebagai kelompok pembeda dalam memodulasi respons imun yang mencerminkan kelompok perlakuan dan kelompok respons imun yang mencerminkan kelompok kontrol.

4.11.6 Pembuatan Pola.

Pembuatan pola respons imun mukosal saluran pernapasan, dengan cara menggunakan harga kontribusi diskriminan setiap variabel pembeda terkuat, yaitu fungsi diskriminan linier dari Fisher (*Fisher Linier Discriminant Function*), yaitu dengan D (fungsi diskriminan) = $w_1 \times A + w_2 \times B + \dots + w_x \times Z$ (Sharma S, 1996), dimana $w_{1..x}$ = Koefisien Fisher (1...x), dan A...Z = Rerata (*Mean*) dari variabel A...Z, dengan asumsi variabel yang lain tidak mempunyai pengaruh.

Pola yang terjadi adalah pola variabel respons imun yang mempunyai pembeda terkuat, dengan arti bahwa kontribusi setiap variabel yang dihitung dan tercermin dalam pola, diasumsikan efek variabel yang lain = 0. Maksud pembuatan pola adalah sebagai alat dalam mengungkap mekanisme respons imun, berupa penjelasan imunopatobiogenesis, yaitu proses kejadian dan adanya perubahan imunopatobiologik yang merugikan akibat perlakuan yang diberikan, di mukosal saluran pernapasan. Perlakuan yang diberikan adalah pemberian gas buang motor berbahan bakar premium yang mengandung partikel Pb

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS

5.1 Hasil Pengukuran Variabel Penelitian

5.1.1 Hasil pengukuran variabel kendali.

a. Hasil pengukuran berat badan mencit.

Pada awal dan akhir penelitian berat tikus mencit Balb/c dilakukan pengukuran, sehingga faktor berat badan akan diketahui perkembangannya, sebab uji coba dengan hewan coba tentang sistem imun, faktor berat badan dapat mempengaruhi hasil (Smith, 1988). Untuk keperluan tersebut maka berat badan mencit dilakukan uji statistik untuk mengetahui homogenitas dengan taraf signifikan.

Dari hasil pengukuran penelitian, berat tikus kelompok perlakuan dan kelompok kontrol menunjukkan homogen, dengan taraf signifikansi 0,672 atau >0.05 , (seperti terlihat pada lampiran 7).

Tabel 5.1. Uji Homogenitas Berat Badan Mencit pada Awal Penelitian Pada Kelompok Perlakuan (P) dan Kelompok Kontrol (K)

Kelompok 1(P); 2 (K)	N	Rerata	Simpang Baku	Signifikansi
BB mencit (1) Awal P+K	17	29,25 gr	0,3986	0,672
(2).	17	29 gr	0,4183	

Data berat mencit pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol pada awal serta akhir penelitian dapat dilihat pada lampiran 7

b. Usia mencit balbc dan jenis kelamin .

Pada awal penelitian, telah diseleksi untuk sampel, yaitu usia mencit berkisar antara 35 hari - 60 hari, dan karena waktu penelitian selama 30 hari, maka tikus akan mengalami maturasi selama 30 hari, sehingga usia tikus pada akhir penelitian berkisar 65 hari - 90 hari. Diharapkan dengan usia tersebut dan jenis kelamin tikus, yang sama yaitu jantan, tidak akan mempunyai pengaruh terhadap imunitas tikus selama penelitian, kecuali oleh pengaruh perlakuan. Homogenitas usia mencit seperti terlihat pada lampiran 8, yang menunjukkan pada awal penelitian populasi homogen, dengan signifikansi=0,836 atau $p>0,05$, berarti secara bermakna homogen.

Tabel 5.2 Uji Homogenitas Usia Mencit Pada Awal Penelitian Pada Kelompok Perlakuan(P) dan Kelompok Kontrol(K)

Kelompok I(P), 2 (K)	N	Rerata	Simpang Baku	Signifikansi
Usia mencit (1) Awal P+K	17	56,58 hari	2,1523	0,836
(2).	17	55,82 hari	2,0987	

5.1 2. Hasil pengukuran variabel pengganggu

a. Hasil pengukuran suhu udara lokasi penelitian.

Untuk mengetahui perbedaan suhu lokasi paparan dan kontrol diuji dengan uji t test. Waktu penelitian selama 30 hari, selama 3 jam perhari paparan, dilakukan antara pukul 6.00 - pukul 9.00. Pengukuran suhu selama penelitian dilakukan pada awal penelitian.

Dari hasil pengukuran, rerata suhu lokasi untuk kelompok perlakuan dan kelompok kontrol tidak berbeda bermakna pada uji T , dengan signifikansi $p=0,154$ ($p >0,05$) hasil dapat dilihat pada lampiran 9.

b. Hasil pengukuran kelembaban udara lokasi penelitian.

Pengukuran kelembaban udara relatif selama penelitian dilakukan pada awal paparan. Dari hasil pengukuran, rerata kelembaban udara relatif di lokasi kelompok perlakuan dan kelompok kontrol tidak berbeda bermakna pada uji t test, dengan signifikansi $p=0,236$ atau $p>0.05$, hasil dapat dilihat pada lampiran 10

5.1.3. Hasil pengukuran variabel bebas, yaitu konsentrasi Pb ug/m³ udara

a. Hasil konsentrasi Pb ug/m³ udara pada kelompok paparan

Sesuai dengan hasil uji pendahuluan, maka untuk mendapatkan gas buang dengan konsentrasi Pb berkisar antara >2 ug/m³ – <10 ug/m³ maka debit gas harus berkisar dengan 40 cc/menit – 82,5 cc/menit. Dari hasil pengukuran konsentrasi Pb dari gas buang yang dipaparkan selama perlakuan rerata $5,103$ ug/m³ , hasil ini sesuai dengan paparan yang diharapkan dalam penelitian ini.

Hasil pengukuran selama 30 hari sebagai berikut dalam tabel 5.3.

Tabel 5.3 Konsentrasi Pb Udara Paparan Pada Kelompok Perlakuan

Hari ke	Konsentrasi Pb $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Hari ke	Konsentrasi Pb $\mu\text{g}/\text{m}^3$
1	3.3	16	4.7
2	3.3	17	7.8
3	4.7	18	5.0
4	4.7	19	5.7
5	2.9	20	4.1
6	8.8	21	5.9
7	5.9	22	4.4
8	8.1	23	9.8
9	3.8	24	6.9
10	3.7	25	5.5
11	3.7	26	9.6
12	3.5	27	4.6
13	3.0	28	3.2
14	4.7	29	2.5
15	4.9	30	3.8

*Sumber data hasil pemeriksaan BTKL, tgl 1-11-2000 s/d 30-11-2000

b. Hasil konsentrasi Pb $\mu\text{g}/\text{m}^3$ udara pada kelompok kontrol.

Dari hasil uji pendahuluan, dengan penangkap Pb cairan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 25 %, maka selama penelitian hasil pengukuran partikel Pb yang terkandung dalam gas buang untuk kelompok kontrol dapat dilihat pada lampiran 11. Dari hasil tersebut sangat bermakna bahwa paparan di kelompok kontrol dapat memenuhi syarat sebagai gas buang untuk kelompok kontrol.

5.1.4 Hasil penghitungan makrofag alveolar yang positif mengandung partikel Pb.

Di paru, maka makrofag alveolar merupakan sel yang mempunyai kemampuan sebagai sel penyaji antigen (*APC Antigen Presenting Cell*), yang selanjutnya menjalankan fungsi fagositosis. Dimungkinkan, bila terjadi paparan

yang kontinyu keberadaan partikel di makrofag alveolar akan dapat menimbulkan fibrosis (Howard, 1985; WHO, 1989). Keberadaan partikel Pb, pada makrofag alveolar dapat dilihat dengan pemeriksaan histokimia metode pengecatan *Mallory and Parker's Haematoxylin* (Smith A, 1978). Keberadaan partikel Pb nampak warna sitoplasma sel abu-abu biru gelap (*dark blue grey*) seperti terlihat dalam Gambar. 5.3, di halaman 89.

5.1.5. Hasil pemeriksaan imunohistokimia dan histokimia

1. Sel T-CD4, adalah sel T helper yang pada awal sel Th mengenal dan berinteraksi dengan suatu kompleks molekul MHC kelas II dan antigen, sel segera diaktivasi menjadi suatu sel efektor yang sekresinya berupa faktor pertumbuhan berbagai macam yang disebut sebagai sitokin. Peran sel T-CD4 sangat penting dalam sistem imun, termasuk dalam sistem imun mukosal. Untuk mengenali digunakan monoklonal antibodi yang spesifik, dan di dalam penelitian ini dipakai *rat anti mouse CD-4*, dan nampak sel T-CD4 positif dengan sitoplasma yang berwarna kuning kecoklatan, seperti dalam gambar 5.4., di halaman 89
2. Sel T-CD8, adalah sel T dengan kemampuan yang bersifat sitolitik, yaitu kemampuan untuk membunuh sel yang lain yang dianggap asing. Aktivasi sel T-CD8 akan melepaskan sitokin IL-2 dan IFN (guna meningkatkan respons imun sel B dan limfosit T. Fungsi lain dari Sel T-CD8 dapat mensupresi respons imun. Mengenali sel tersebut dengan antibodi monoklonal spesifik, dalam penelitian ini digunakan *rat anti*

mouse CD-8, sitoplasma menunjukkan warna kuning kecoklatan, seperti terlihat dalam gambar 5.5, di halaman 90.

3. Sel T penghasil IL-2, sel ini adalah sel T namun produk sitokin yang dihasilkan adalah Interleukin-2 (IL-2), dan sebagai kelompok sel Th1, pada pengenalan dengan pemeriksaan sitokin IL-2, menggunakan antibodi monoklonal IL-2, dalam penelitian ini, adalah *goat anti mouse IL-2*, sitoplasma menunjukkan warna kuning kecoklatan, seperti terlihat dalam gambar 5.6, di halaman 90.
4. Sel T penghasil IL-4, sel ini adalah sel T namun produk sitokin yang dihasilkan adalah Interleukin-4 (IL-4), dan sebagai kelompok sel Th2. Pendeteksian dilakukan melalui deteksi sitokin IL-4, menggunakan antibodi monoklonal spesifik IL-4, dalam penelitian ini menggunakan *rat anti mouse IL-4*, maka sel positif bila sitoplasma berwarna kuning kecoklatan, seperti terlihat dalam gambar 5.7, di halaman 91.
5. Sel Plasma penghasil IgA, yaitu sel yang mempunyai kemampuan menghasilkan IgA, pendeteksian menggunakan antibodi monoklonal spesifik IgA, dalam penelitian ini menggunakan *goat anti mouse IgA*. Sel positif, bila sitoplasma berwarna kuning kecoklatan pada sel plasma, seperti dalam gambar 5.8, di halaman 91.

5.2. Hasil Uji Statistik Variabel Penelitian .

5.2.1. Uji normalitas data.

Variabel tergantung untuk dilakukan analisa lebih lanjut perlu diuji distribusi normal dengan uji normalitas. Uji normalitas, karena data terdiri dengan kelompok dilakukan dengan uji *Kolmogorov-Smirnov Test*, seperti pada lampiran 13.

Hasil yang diperoleh disimpulkan sebagai berikut, bahwa variabel Pb di sel makrofag alvaeolar, ST- CD4, ST-CD8, STp- IL-2,STp-IL-4 dan SPIgA,pada kelompok paparan dan kelompok kontrol mempunyai distribusi normal

Tabel 5. 4 :Hasil Uji Normalitas Variabel Pb Alv ST- CD4, ST-CD8, STp- IL-2, STpIL-4 dan SPIgA

Variabel	Kelompok Perlakuan			Kelompok Kontrol		
	K-SZ	P	Hasil	K-SZ	P	Hasil
Pb Alv	0,746	0,634	Normal	1,355	0,051	Normal
ST-CD4	0,632	0,820	Normal	1,082	0,192	Normal
ST-CD8	0,523	0,947	Normal	0,863	0,446	Normal
STp-IL-2	0,659	0,777	Normal	0,679	0,745	Normal
STp-IL-4	0,471	0,979	Normal	0,990	0,281	Normal
SPIgA	0,741	0,642	Normal	0,765	0,603	Normal

5.2.2. Uji pengamat ke 1 dan ke 2.

Untuk melihat obyektifitas hasil pembacaan sel positif oleh peneliti, maka pengamatan ke 2 dilakukan pengamat yang ahli di bidangnya, karena kelompok yang diuji adalah 2 (dua) kelompok, yaitu kelompok Paparan dan Kelompok Kontrol, , maka dilakukan uji t untuk mengetahui beda pengamatan, selengkapnya di lampiran 17. Hasil uji beda pengamatan tersebut seperti terlihat dalam tabel berikut , dalam tabel 5.5 dan tabel 5.6, dengan kesimpulan bahwa pengamat ke 1 dan ke 2 tak ada beda, maka hasil yang dipakai selanjutnya

untuk analisis penelitian ini adalah data pengamat kel atau hasil pengukuran peneliti.

Tabel 5.5: Hasil Uji Beda Pengamat 1 dan 2 Untuk Variabel tergantung Sel T_p(CD4,CD8,IL-2, IL-4) Sel I_gA dan Pb Alv pada Kelompok Perlakuan

Variabel	Pengamat 1		Pengamat 2		T	Df	Sig
	Rerata	SB*	Rerata	*SB			
Pb Alv	9,7687	4,0526	9,2062	4,086	1,759	15	0,099
ST-CD4	4,9712	2,7819	4,850	2,8411	0,385	15	0,706
ST-CD8	4,6063	2,7647	4,2813	2,4763	0,867	15	0,399
ST _p -IL-2	6,1125	2,9626	5,5938	3,6237	1,563	15	0,139
ST _p -IL-4	2,4575	1,9289	2,0625	2,0807	1,281	15	0,220
SP _I gA	2,7500	2,4130	2,8125	1,9903	0,207	15	0,839

*Simpangan Baku

Tabel 5.6: Hasil Uji Beda Pengamat 1 dan 2 Untuk Variabel Tergantung ST(CD4,CD8) ST_p(IL-2, IL-4),SP_IgA dan Pb Alv pada Kelompok Kontrol

Variabel	Pengamat 1		Pengamat 2		T	df	sig
	Rerata	SB*	Rerata	*SB			
Pb Alv	0,1286	0,1590	0,0979	0,1352	1,041	13	0,317
ST-CD4	0,9643	1,2004	1,4286	0,7300	0,385	13	0,070
ST-CD8	1,4464	1,2653	1,8643	1,4020	0,867	13	0,164
ST _p -IL-2	2,4429	1,6171	2,7786	1,6839	1,563	13	0,295
ST _p -IL-4	2,150	2,1971	1,8714	1,3842	1,281	13	0,511
SP _I gA	2,9214	2,6470	2,8714	3,4028	0,207	13	0,888

*Simpangan Baku

5.2.3. Uji beda antar kelompok sampel

a. Uji Pb di makrofag alveolar.

Untuk mengetahui keberadaan partikel Pb di sel makrofag alveolar, telah dilakukan perwarnaan dengan metode *Mallory and Parker's Haemoroxylin* (Smith, 1978), dan hasil yang diperoleh, bahwa sel makrofag alveolar yang positif mengandung partikel menunjukkan beda yang sangat signifikan dan signifikansi $\alpha = 0.001$ (<0.005) antara kelompok perlakuan dengan kelompok

kontrol melalui uji T, seperti terlihat dalam tabel 5.7, dan selengkapnya di lampiran 12.

Tabel 5.7. Uji Beda T Pb di Makrofag alveolar Pada Kel Perlakuan dan Kontrol

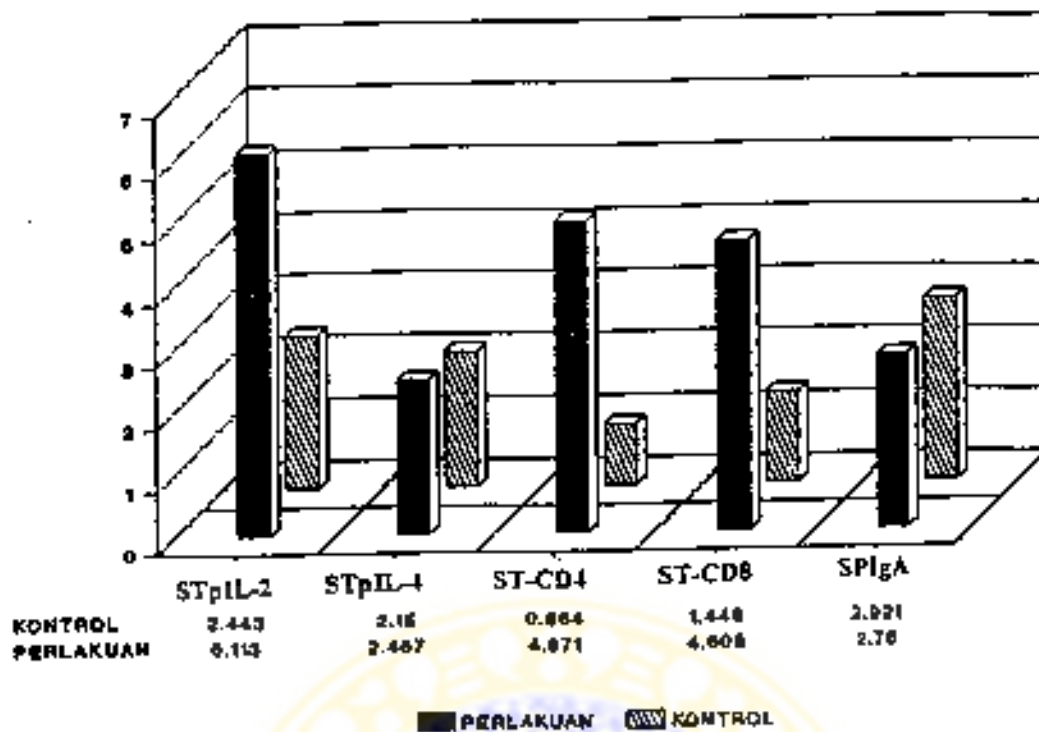
Kelompok 1(P);2(K)	N	Rerata	Simpang Baku	Sig
1(Perlakuan)	16	9.7687	4.0526	0.000
2(Kontrol)	14	0.1286	0.1590	

b. Uji variabel ST-CD4, ST-CD8, IL-2, IL-4 dan SPIgA

Dalam menguji beda antar kelompok dilakukan dengan uji anova, dengan uji analisa varian univariat (*Univariate analysis of variance*) dan manova (*Multivariate analysis of variance*), terhadap variabel respons imun mukosal, ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2, STpIL-4, dan SPIgA, dengan analisis seperti pada lampiran 14.

Tabel 5.8 Beda Komponen Respons Imun Mukosal Saluran Pernapasan (STCD4, ST-CD8, STpIL-2, STpIL-4) SPIgA) Pada Kelompok Perlakuan dan Kontrol Dengan Uji Anova-Univariat

Variabel	Kel.Perlakuan(P)		Kel.Kontrol (K)		Signifikansi
	Rerata	Simpang Baku	Rerata	Simpang Baku	
STCD4	4.971	2.782	0.964	1.200	0.000
ST-CD8	4.606	2.765	1.446	1.265	0.001
STpIL-2	6.113	2.963	2.443	1.617	0.000
STpIL-4	2.457	1.929	2.150	2.197	0.686
SPIgA	2.750	2.413	2.921	2.647	0.854



Gambar 5.1. Grafik Rerata Komponen Respons Imun ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2, STpIL-4, dan SPiGA

Dari hasil tabel 5.8 dengan uji anova univariat, pada kelompok perlakuan dengan paparan Pb, maka 2 (dua) variabel komponen respons imun menampakkan tidak ada perbedaan, karena $p > 0,05$, yaitu untuk variabel SPiGA dan STpIL-4, sedangkan untuk variabel ST-CD4, STpIL-2, ST-CD8) menunjukkan ada perbedaan yang bermakna. Kesimpulan, bahwa paparan Pb dengan konsentrasi $>2 - <10 \text{ ug/m}^3$ udara tidak berpengaruh sama di setiap komponen respons imun mukosal saluran pernapasan, ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2, STpIL-4 dan SPiGA, sedangkan untuk melihat pengaruh keseluruhan variabel secara bersama dilakukan uji multivariat.

Dalam uji multivariat tersebut, terbukti bahwa komponen ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2, STpIL-4 dan SPiGA secara bersama signifikan dengan $p = 0.000$ antara kelompok perlakuan paparan Pb konsentrasi $>2 - <10 \text{ ug/m}^3$.

dengan kelompok kontrol untuk variabel ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2, STpIL-4) dan SPIgA, selengkapnya di lampiran 14. Signifikansi tersebut menunjukkan adanya saling bergantung antar komponen respons imun mukosal tersebut akibat paparan Pb dengan konsentrasi $>2 - <10 \text{ ug/m}^3$ sehingga ada perubahan yang berarti dibanding dengan kelompok kontrol.

5.2.4 Analisis diskriminan

Hasil analisis diskriminan pada variabel respons imun mukosal saluran pemapasan, yang mempunyai beda bermakna dan terkuat yaitu ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2, dengan signifikansi Wilks setiap variabel tersebut adalah 0.0000, seperti dalam tabel 5.5. (lampiran 15).

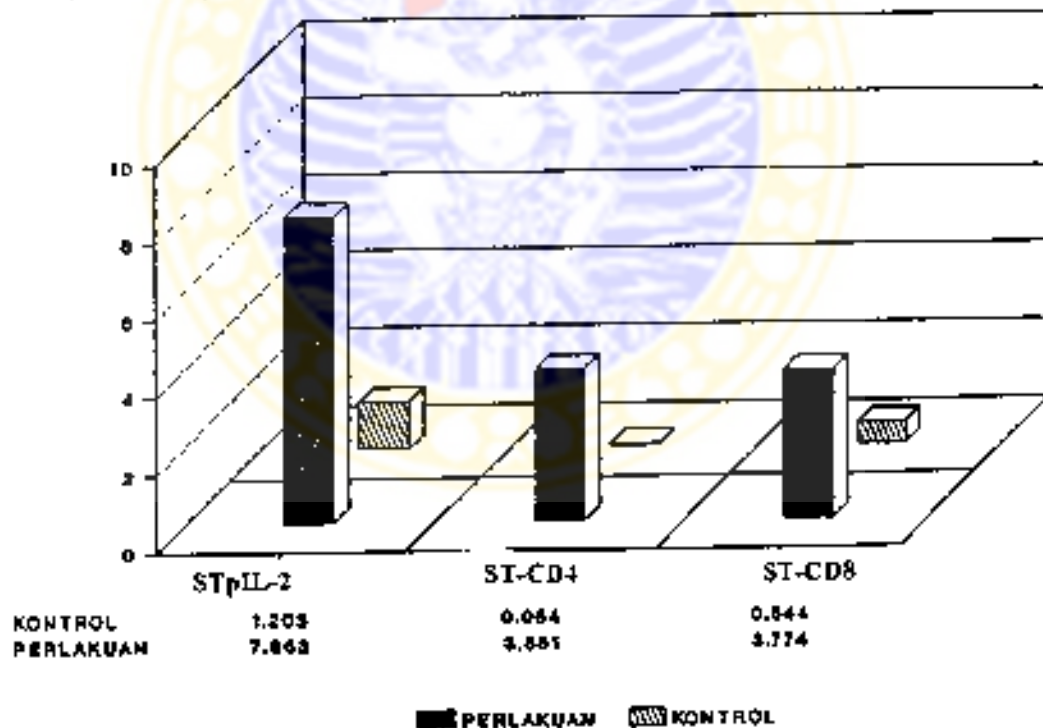
Tabel 5.9 Rekapitulasi Analisis Diskriminan Variabel Pembeda Terkuat Respons Imun Mukosal Saluran Pemapasan (*Summary table*)

Step variabel yang di uji/di analisa	Vars	Koefesien Wilks	
		Lambda	Signifikansi
STpIL-2	1	0.52932	0.0000
ST-CD4	2	0.36544	0.0000
ST-CD8	3	0.34402	0.0000

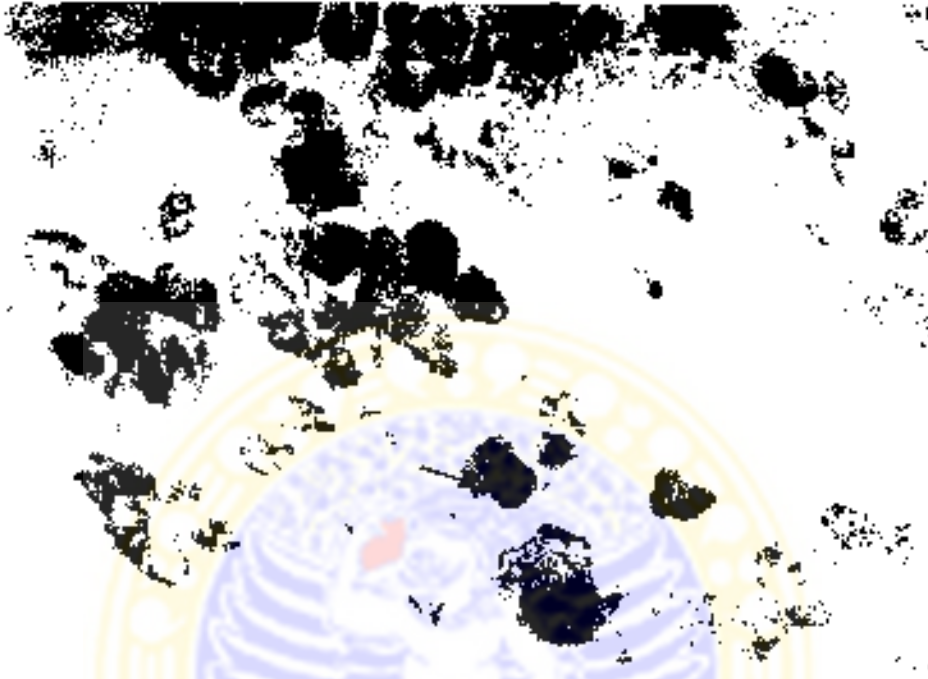
Dari variabel pembeda yang terkuat dihasilkan suatu nilai *Fisher's Linear* yang dapat mewakili kelompok, dan kekuatan dari variabel pembeda terkuat. Besar kekuatan pembeda tersebut, digunakan untuk mengetahui prosentase kekuatan pengelompokan. Hasil kekuatan pengelompokan dari 3 variabel pembeda tersebut adalah 90 %, berarti variabel pembeda terkuat (ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2) merupakan kelompok yang termodulasi respons imun mukosal mencerminkan 90 % dari kelompok perlakuan, dan kelompok yang tidak termodulasi respons imun mukosal mencerminkan 90 % kelompok kontrol.

5.2.5 Pembuatan pola respons imun mukosal saluran pemapasan.

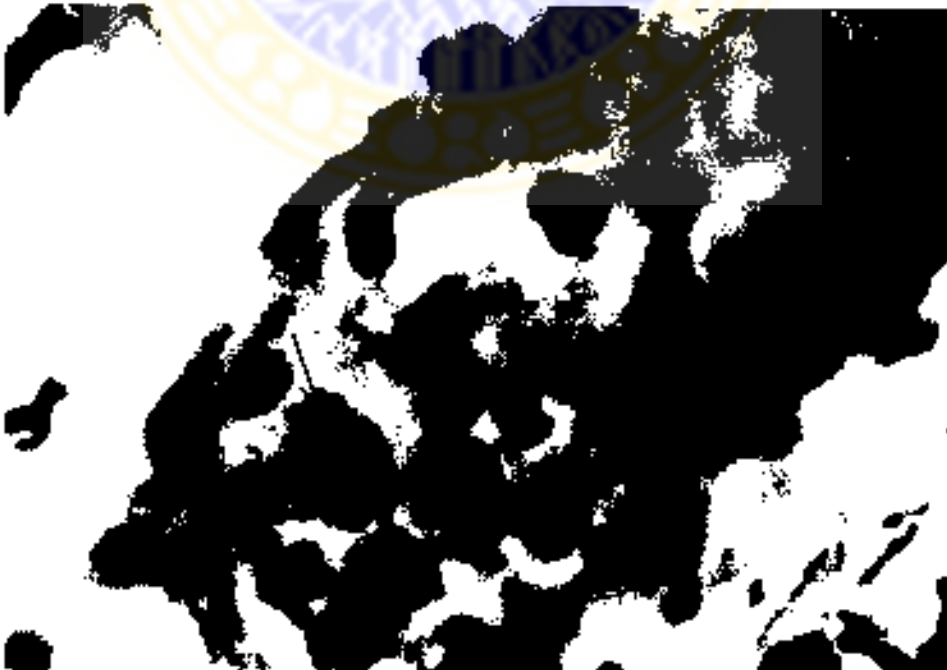
Dari 3 (tiga) variabel pembeda terkuat, yaitu ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2, diperoleh nilai kontribusi (*Coefficient Fisher Linear*) diskriminan setiap variabel pembeda terkuat (lampiran 16). Hasil yang diperoleh berupa koefisien Fisher, yaitu pada kelompok perlakuan, yaitu variabel ST-CD4 = 0,7746902, variabel ST-CD8 = 0,8192902, dan variabel STpIL-2 = 1,286370, sedang pada kelompok kontrol, yaitu variabel ST-CD4 = 0,066820252, variabel ST-CD8 = 0,3759046. Untuk membuat pola, dicari kontribusi fungsi setiap variabel pembeda terkuat (diskriminasi), dengan perkalian *Coefficient Fisher Linear* dengan data asli setiap kelompok (Sharma S, 1996). Besaran kontribusi fungsi pada setiap variabel pembeda terkuat dinyatakan dalam suatu bentuk batang (*bar*)



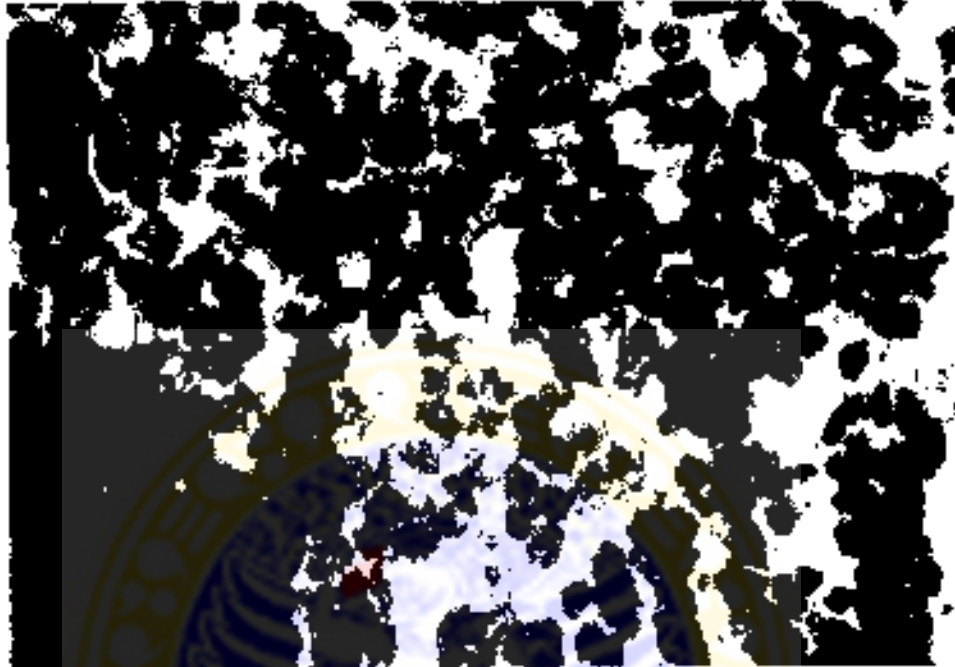
Gambar 5.2: Grafik Pola Variabel Yang Berperan Bermakna Dalam Respons Imun Mukosal Saluran Pemapasan.



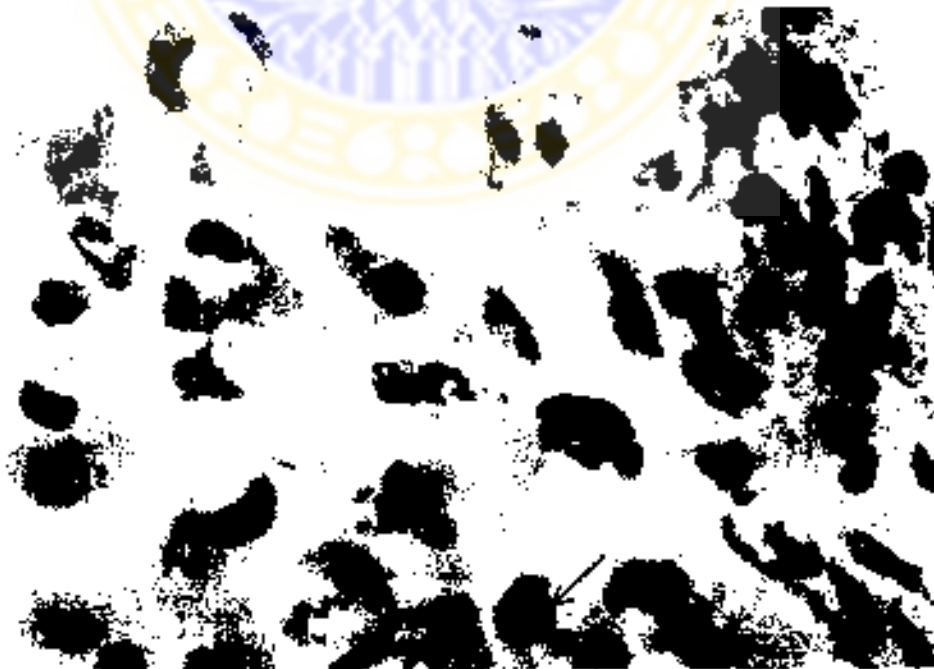
Gambar 5.3. Spleen sampel dengan deposit partikel Pb di makrofag alveolar (warna bening kebiru-abuan gelap) dengan perwarnaan *Mallory and Parker's Haematoxylin* ditunjukkan, perbesaran 400x.



Gambar 5.4. SI-CD4 dengan antibodi monoklonal CD4 dengan sitoplasma berwarna kuning kecoklatan di mukosa saluran pernapasan dengan pembesaran 400 x.



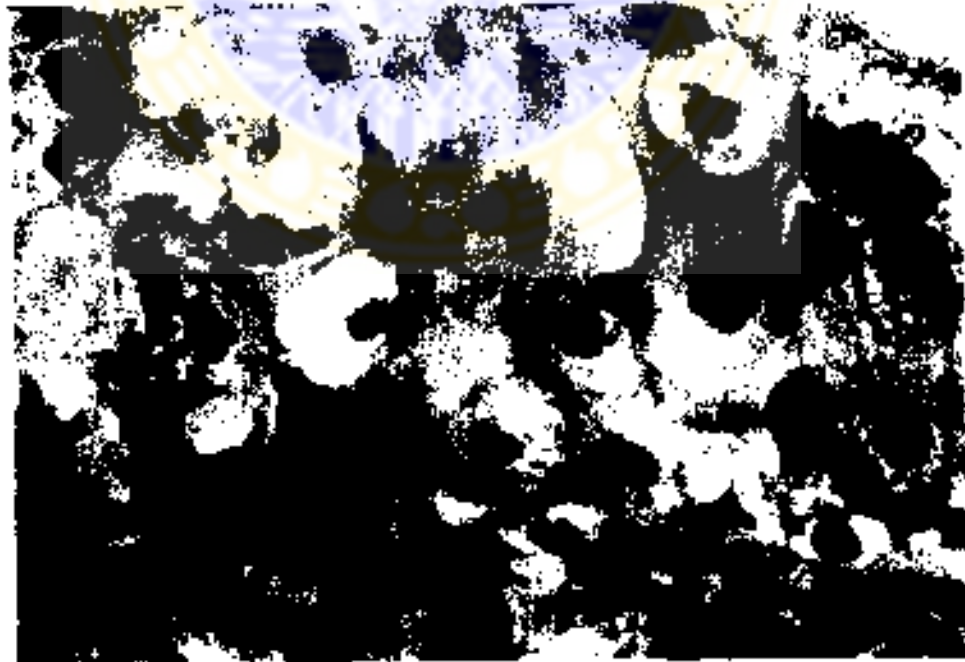
Gambar 5.5. ST-CD8⁺ dengan antibodimonoklonal 6-CD8 dengan sitoplasma berwarna kuning keoklatan di mukosa saluran pernapasan dengan pembesaran 400 x.



Gambar 5.6. STp11-2 dengan antibodimonoklonal H-2 dengan sitoplasma berwarna kuning keoklatan di mukosa saluran pernapasan dengan pembesaran 400 x.



Gambar 5.7: STp IL-4 dengan antibodimonoklonal IL-4 dengan sitoplasma berwarna kuning kecoklatan mukosal di saluran pemapasan dengan pembesaran 400 x,



Gambar 5.8: SPIgA dengan antibodimonoklonal IgA dengan sitoplasma berwarna kuning kecoklatan dengan pembesaran 400 x, di mukosal saluran pemapasan

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap mekanisme respons imun mukosal saluran pernapasan dan kejadian deposit partikel Pb pada sel makrofag alveolar akibat paparan Pb yang terkandung dalam gas buang motor berbahan bakar premium. Partikel Pb merupakan logam berat, yang mempunyai kemampuan berikatan dengan protein sebagai ikatan kompleks. Ikatan kompleks akan terikat oleh molekul besar, sehingga dapat memodulasi respons imun, berupa menstimulasi terjadinya proliferasi limfosit dengan mengaktifkan interaksi sel T dan sel B. Gambaran tersebut dapat menjelaskan, bahwa secara sistemik Pb dapat mempengaruhi respons imun, tetapi di mukosal saluran pernapasan belum dengan jelas diungkap, padahal potensi keberadaan partikel Pb di udara cukup besar.

Berdasar pertimbangan tersebut, penelitian ini dirancang dengan memberikan paparan partikel Pb secara riel dari motor yang berbahan bakar premium, yang mengeluarkan gas buang. Secara teknologi konsentrasi paparan Partikel Pb dapat diatur sesuai kisaran yang ditentukan dalam konsep penelitian, yaitu $> 2 \text{ ug/m}^3 - < 10 \text{ ug/m}^3$, sehingga diharapkan akan membuktikan hipotesa. Untuk membenarkan paparan yang akurat dalam konsentrasi tersebut, maka dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan debit gas buang yang tepat, agar menghasilkan konsentrasi tersebut. Debit gas buang yang tepat adalah pada kisaran 40 cc/menit - 82,5 cc/menit, dan dihasilkan selama penelitian konsentrasi Pb kisaran 2,5-9,8 ug/m^3 udara.

Penelitian di desain dengan *the post test only control group design* dapat menggambarkan realita di lapangan, khususnya dalam bentuk paparan yang diberikan, dan kelompok mencit yang mengalami perlakuan dan kontrol mengalami waktu yang sama.

Sampel penelitian, berupa hewan mencit Balb/c. Berdasar karakteristik sampel, maka variabel yang di uji homogenitasnya adalah berat badan awal dan usia mencit awal penelitian. Hasil uji homogenitas dengan uji anova menunjukkan variabel berat badan dan usia adalah homogen secara statistik, walaupun memang populasi yang dipilih sudah terseleksi dengan rentang berat dan usia yang telah ditetapkan.

Penerapan paradigma yang dipakai dalam penelitian ini, diikuti oleh penetapan konsep. Diharapkan pemakaian konsep ini dapat lebih memantapkan hasil penelitian, karena indikator yang dipakai jelas, karena indikator merupakan faktor yang ada dalam variabel yang bisa diukur (Pujiraharjo, 1993). Paradigma yang dipakai dalam penelitian ini adalah imunopatobiologis, suatu kajian terhadap sistem imun yang tidak lazim atau menyimpang (Putra,1997), dengan mempelajari aktivitas sel imunokompeten dengan produk yang dihasilkan, ketika sel tersebut mengalami stres akibat suatu stresor, dalam penelitian adalah partikel Pb. Bentuk suatu pola akan dibuat untuk menggambarkan variabel yang berperan bermakna dalam respons imun pada mukosal saluran pernapasan, yang mencerminkan hubungan timbal balik antara fungsi dari komponen variabel tersebut. Hubungan timbal balik secara fungsional bersama inilah harus mencerminkan interaksi biologik, sehingga pola yang dihasilkan merupakan hasil

perkalian harga rerata variabel yang berperan bermakna atau variabel yang memberi kontribusi terkuat dalam respons imun mukosal saluran pernapasan yang diteliti dengan koefisien Fisher (Sharma, 1996). Konstanta atau Koefisien Fisher tersebut yaitu suatu nilai interaksi dari berbagai variabel, yang memberi gambaran besar peran dan sumbangan variabel yang berperan bermakna sewaktu mekanisme biologik terjadi, baik dalam kelompok Kontrol maupun kelompok perlakuan.

Di samping hal tersebut, keberadaan partikel Pb di paru, yang digambarkan oleh keberadaan di makrofag alveolar, dilakukan uji T untuk mengetahui sejauh mana ada beda antara kelompok paparan dan kontrol.

6.1 Respons Imun Mukosal Saluran Pernapasan Akibat Paparan Partikel Pb

Dari hasil uji statistik, dengan uji multivariat terbukti, bahwa 5 (lima) variabel yang diteliti, yaitu, ST-CD4, ST-CD8, STpIL-2, dan STpIL-4 dan SPiGA, hanya 3 (tiga) variabel ST-CD4, ST-CD8 dan STpIL-2 sebagai variabel yang mempunyai peran bermakna dalam memberi respons imun mukosal saluran pernapasan. Hasil yang nampak, bahwa justru Pb pada konsentrasi $> 2 - < 10 \text{ ug/m}^3$ selama 3 jam dalam periode 30 hari meningkatkan jumlah ST-CD4, ST-CD8 dan STpIL-2, dibanding dengan kontrol.

Dalam analisis berikutnya, analisis diskriminan, dilakukan dengan dasar asumsi, bahwa kelompok perlakuan mencerminkan bentuk kelompok yang mengalami modulasi respons imun mukosal saluran pernapasan akibat perlakuan, dan kelompok kontrol mencerminkan kelompok yang tidak mengalami modulasi

respons imun mukosal saluran pernapasan karena tidak terpapar partikel Pb. Hasil yang diperoleh, bahwa partikel Pb mampu memberi respons imun di mukosal saluran pernapasan, namun dengan melihat ke 3 variabel tersebut, berarti, respons imun yang diinduksi mengarah ke seluler (Abbas, 1997; Goldsby, 2000)

Dalam penelitian ini, lokasi induktif dan efektor mukosal saluran pernapasan sangat sulit dibedakan dan tidak jelas, hal ini sesuai dengan yang disampaikan Bienenstock, bahwa mukosal saluran pernapasan secara fungsional dan struktural belum jelas (Bienenstock, 1999).

Peningkatan Sel T-CD4, disebabkan oleh terinduksi di daerah awal di BALF sebab di daerah ini merupakan lokasi terjadinya respons imun mukosal lokal, dan sel Th-1 lebih mempunyai peran bermakna dari Sel Th-2, dengan dibuktikan sel T penghasil IL-2 juga meningkat, dan selanjutnya memicu sel T-CD8. Secara teoritis, induksi STp IL-2 yang merupakan sel Th1 akan memicu juga sel T-CD8 (Bradley, et al, 1996, Abbas, 1997). Terbukti, bahwa memang kontribusi STpIL-2, mempunyai kontribusi terbesar diantara 3 (tiga) variabel tersebut, dengan koefisien Fisher sebesar 1,286370 pada kelompok perlakuan, namun pada kelompok kontrol jauh lebih rendah hanya mempunyai nilai 0,4925635 atau hampir 2,5 kali lebih rendah, hal ini menunjukkan, bahwa partikel Pb di mukosal saluran pernapasan mempunyai peran bermakna, memicu STpIL-2. Sebaliknya, pada variabel ST-CD4, pada kelompok perlakuan, koefisien Fisher = 0,7746902, sedangkan pada kelompok kontrol sebesar 0,06682052, hal ini menunjukkan, bahwa adanya indikasi induksi awal yang cukup kuat, sehingga

ST-CD4 meningkat cukup berarti, dan hal ini berarti molekul CD4 peran fungsi pentingnya dalam mengaktifasi sel T yang akan memberi sinyal transduksi atau memfasilitasi suatu *TCR complex mediated signal transduction* pada ikatan molekul MHC kelas II (Abbas, 1997; Goldsby, 2000).

Terjadinya ketidak seimbangan fungsi biologik sel Th1 yang dicerminkan oleh STpIL-2, dan sel Th2 yang dicerminkan oleh STpIL-4, dengan dibuktikan ada kenaikan jumlah STp-IL-2, padahal seharusnya diimbangi oleh penurunan STpIL-4 (Romagnani, 1997), tetapi ternyata indikasi adanya kenaikan STpIL-4. Kejadian tersebut menunjukkan, bahwa aktifitas keseimbangan imunobiologik sel tersebut terganggu, sehingga menunjukkan tidak adanya regulasi diantara sel Th1 dan sel Th2, menyebabkan tidak adanya regulasi silang yang baik dan mengganggu imun lokal di mukosal saluran pernapasan, dan modulasi respons imun bersifat merugikan. Kondisi ini menyebabkan akan lebih rentan bagi individu, khususnya bila sebelumnya mengalami gangguan kesehatan saluran pernapasan, misal gangguan infeksi akut, dan mereka berada dalam udara yang tercemar partikel Pb.

Untuk variabel ST-CD8, koefisien Fisher mempunyai nilai 0,8192902, dan pada kelompok kontrol hanya 0,3759046, hal ini menunjukkan pula, bahwa ST-CD8 teraktivasi, guna berperan mengaktifasi makrofag. Di samping hal tersebut, pada penelitian sebelumnya tentang sel T-CD8 pada pekerja yang sering terekspose partikel Pb, menunjukkan jumlah sel T-CD8 meningkat (Sata F, 1997). Dari hasil penelitian ini sel T-CD8 terbukti memang meningkat pada kelompok perlakuan (yang terpapar partikel Pb $>2 - <10 \text{ ug/m}^3$) di banding kontrol .

sehingga ditinjau dari masuknya partikel melalui inhalasi terhadap pengaruh pada sel T-CD8 di mukosal saluran pernapasan sama dengan penelitian sebelumnya. Akibat aktivasi sel T-CD8, maka akan melepas sitokin IL-2 dan IFN γ , dan pada penelitian ini STp- IL-2 meningkat dibanding kelompok kontrol. Jumlah ST-CD8 yang meningkat sangat potensial menimbulkan kerusakan membrane sel itu sendiri (Goldsby, 2000).

Dari uji dengan analisis diskriminan, kekuatan tiga variabel yang bermakna atau terkuat adalah ST- CD4, ST-CD8 dan STpIL-2 sebesar 90 %, artinya 90 % kelompok yang mempunyai variabel pembeda terkuat, atau yang mengalami modulasi respons imun mukosal saluran pernapasan tersebut 90 % mencerminkan kelompok perlakuan. Pada kelompok lain yang tidak mengalami modulasi respons imun mukosal saluran pernapasan (dengan variabel ST-CD4, ST-CD8 dan STpIL-2 tidak bermakna), 90 % mencerminkan kelompok kontrol. Hasil tersebut, membuktikan bahwa secara bersama dan fungsional sel T-CD4, sel T-CD8 dan sel T penghasil IL-2 memang merupakan variabel yang bermakna kuat dalam memberikan respons imun mukosal saluran pernapasan, dan hal ini lebih memperkuat terjadinya bentuk respons imun seluler, yang terbukti dalam penelitian ini.

Sel T penghasil IL-4 (STpIL-4) , yang merupakan sel Th2, tidak menunjukkan peningkatan dalam penelitian ini, dengan tidak munculnya sebagai variabel pembeda terkuat. Sitokin IL-4, yang diproduksi oleh STp-IL4, mempunyai peran selain sebagai faktor dalam meningkatkan proliferasi sel B, yang dapat berpengaruh terhadap ekspresi MHC kelas II. juga meregulasi

reseptor IL-4 sendiri. Sitokin IL-4, yang ditengarai di tikus dapat memengaruhi proliferasi makrofag dan sel mast. Secara umum sitokin IL-4 sebenarnya mempunyai peran dan fungsi sebagai faktor pertumbuhan (*growth factor*) serta diferensiasi faktor terhadap bermacam sel.

Kecenderungan peningkatan variabel respons imun seluler sebagai variabel bermakna (ST-CD4, ST-CD8, dan STpIL-2) pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi yang rendah $> 2 \text{ ug/m}^3 - < 10 \text{ ug/m}^3$ lama paparan 3 jam/ hari, selama 30 hari, merupakan suatu kondisi peringatan (*alarm state*) adanya partikel Pb, yang merupakan suatu stresor.

Dalam kondisi konsentrasi Pb yang lebih tinggi, seperti kondisi udara di Surabaya, rerata diatas 10 ug/m^3 , bahkan prediksi di 12 jalan utama di Surabaya minimum $28,17 \text{ ug/m}^3$ udara (Purwanto, 2001), tentu akan lebih menyebabkan sel imunokompeten mukosal saluran pernapasan mengalami stres oleh stressor partikel Pb, lebih berat, dan tentunya kondisi akan menuju suatu kondisi yang disebut *exhausted*, sehingga akan lebih merugikan terhadap peran sel imunokompeten.

Kondisi stres pada sel sangat dipengaruhi oleh *Heat Shock Protein* (HSP), yaitu protein yang disintesis oleh setiap sel dalam keadaan basal maupun dalam keadaan stres. Kondisi sel normal, produksi HSP melalui pemanasan yang bertahap mempunyai kaitan adanya toleransi sel terhadap kondisi stres di lingkungan yang menonjol dari biasanya. HSP yang terbentuk, bukan hanya karena induksi oleh panas, tetapi juga oleh kondisi yang tidak menguntungkan oleh kehidupan sel, khususnya eukariota, seperti kekurangan nutrisi, adanya

logam berat, infeksi virus, dan juga radikal bebas (Mc Gregor, 1992). Partikel Pb adalah logam berat, sehingga dimungkinkan juga bisa menginduksi HSP.

Sangat dimungkinkan, bahwa bila konsentrasi partikel Pb di udara melebihi dari kisaran penelitian dengan waktu paparan yang lebih lama, akan mengakibatkan kondisi sel imunokompeten akan mengalami stres yang berakibat mengalami kelelahan (*exhausted state*). Kondisi inilah yang tidak diinginkan, karena dapat menunjukkan manifestasi gejala klinis, atau lebih bersifat *injury* (Kane, 1995)

Dalam penelitian ini, mencermati berbagai variabel, khususnya variabel yang bermakna dalam menimbulkan respons imun mukosal pernapasan, yaitu ST-CD4, T-CD8, dan STpIL-2, adanya paparan partikel Pb dalam konsentrasi rendah $>2 \text{ ug/m}^3 - <10 \text{ ug/m}^3$, dapat menimbulkan modulasi respons imun seluler, sehingga perlu dicermati untuk kondisi konsentrasi partikel Pb yang tinggi dalam waktu yang lama. Di samping itu, walaupun dengan konsentrasi partikel Pb tersebut, menunjukkan keberadaan pada makrofag alveolar cukup bermakna dibandingkan kelompok kontrol, sehingga perlu dicermati paparan Pb dalam konsentrasi yang melebihi paparan partikel Pb lebih dari 10 ug/m^3 .

Kondisi di mukosal saluran pernapasan tersebut diatas merupakan adanya kecenderungan indikasi ke arah DTH (*Delayed Type Hypersensitivity*), yang didahului oleh fase sensitisasi, berupa peningkatan sel T-CD4, STpIL-2, khususnya ST-CD8, dan pada fase efektor sel T-DTH (yang tersensitisasi) akan mengeluarkan beberapa sitokin, antara lain IFN γ , IL-2, sehingga makrofag

aktif dan berakibat molekul MHC kelas II meningkat, TNF receptor meningkat, radikal oksigen meningkat, dan Nitrit oksida meningkat (Goldsby RA, 2000).

Variabel Sel Plasma penghasil Immunoglobulin A (SPIgA) dalam penelitian ini, dibuktikan, bahwa tidak mempunyai beda dengan kelompok kontrol, hal ini disebabkan oleh arah respons imun yang ditimbulkan adalah seluler, juga dimungkinkan oleh adanya peran partikel lain yang ada dalam gas buang. Di samping hal tersebut aktivasi sel Th1 akan mengaktifasi makrofag, serta akan melaksanakan berbagai macam fungsi yang terkait dengan *cell immediated immunity*, namun peran bantuan terhadap sel B perannya kecil (Abbas, 1997; Goldsby, 2000), oleh sebab itulah IgA tidak menunjukkan peningkatan yang bermakna, dengan indikasi SPIgA tidak menunjukkan berbeda dengan kelompok kontrol ($p=0,854$). Terbukti, bahwa tidak bedanya STpIL-4, sebagai sel Th2 antara kelompok yang terpapar Pb dan kontrol, sejalan juga dengan SPIgA yang tidak mempunyai beda bermakna, sehingga dapat disimpulkan, bahwa pengaruh partikel Pb yang terkandung dalam gas buang motor bakar, tidak menunjukkan pengaruh terhadap respons imun mukosal humoral.

6.2 Keberadaan Partikel Pb Di Makrofag Alveolar.

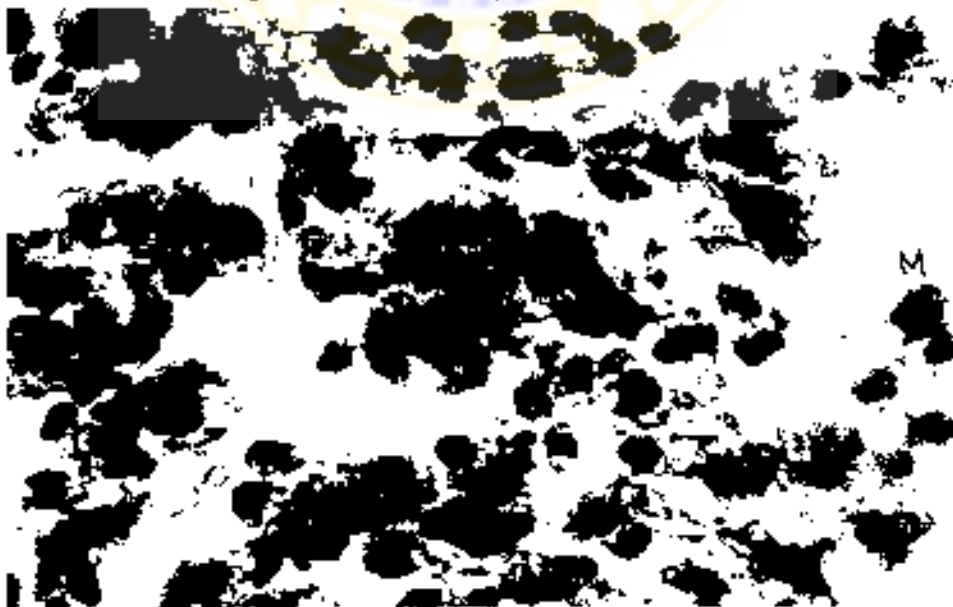
Dari hasil perhitungan dengan uji statistik, tersebut dalam butir 5.1.4, terbukti bahwa keberadaan partikel Pb dengan paparan Pb konsentrasi $>2 \text{ ug/m}^3 - <10 \text{ ug/m}^3$ mempunyai beda bermakna dengan kelompok kontrol, dengan signifikansi 0.001. Terbukti, bahwa dalam penelitian paparan partikel yang

langsung masuk ke paru, khususnya di alveoli, walaupun dengan konsentrasi tersebut dan hanya dalam waktu paparan 3 jam selama 30 hari, keberadaan partikel Pb sangat bermakna. Kondisi ini, bila berlangsung dalam waktu lama dan konsentrasi partikel Pb yang lebih tinggi, akan menimbulkan akibat terjadi fibrosis. Kejadian ini disebabkan partikel dapat merusak membran lisosom, sehingga lisosom pecah dan akan merembes ke sitoplasma dan menyebabkan otolisis semua organel dan metabolit, yang berakibat makrofag alveolar mati. Untuk selanjutnya, bila ada partikel Pb berikutnya akan difagositosis oleh makrofag alveolar lain, sehingga terjadi rantai kematian bagi makrofag alveolar. Akhir proses, banyak partikel yang masuk dan kumulatif, akan makin banyak makrofag dikerahkan memfagositosis dan mati dalam jaringan, sehingga merangsang fibroblast untuk terus memproduksi kolagen, sehingga terjadi penebaran paru (Yatim, 1996). Di sisi lain logam berat, khususnya Pb dan emas, bila tidak mungkin bisa merusak lisosom, maka partikel Pb juga akan tetap berada di dalam dan hadir terus (Yatim, 1996). Ada kecenderungan persamaan pada penelitian lain, yaitu paparan partikel quartz pada tikus, terbukti keberadaan partikel quartz di makrofag alveolar menurunkan aktivitas metabolisme sel tersebut, sehingga akhirnya dapat menimbulkan kerusakan (Zetterberg, 1998).

Dari gambaran makrofag alveolar (perwarnaan haematoxylin-eosin), partikel Pb yang terdeposit, pada penelitian ini belum menunjukkan kerusakan berarti, belum adanya fibroblast (gambar 6.1). Paparan partikel Pb konsentrasi $>2 \text{ ug/m}^3 - <10 \text{ ug/m}^3$ yang terdeposit atau keberadaan di makrofag alveolar sebagai suatu sinyal, belum menimbulkan kerusakan. Kejadian kerusakan atau

macry menggambarkan kegiatan dalam menghadapi suatu penyebab, yang mengakibatkan tanda karis dan gejala (Kane, 1975). Pada penelitian ini, kerusakan atau *damage* sel-sel nampak, tetapi pada mukosa saluran pernapasan sebagai tempat awal aksi partikel Pb, nampak pm_{10} dan berupa gangguan aktivitas keseluruhan imunobiologi sel T_{H1} dan sel T_{H2} seperti yang dijelaskan dalam bab-bab sebelumnya. Nampak, bahwa respons imun mukosa sangat bersifat spesifik lokal, dan khasus pada penelitian ini, menunjukkan mukosa awal dan gangguan imunobiologi, yang lebih menampakkan *macry*.

Partikel Pb yang mempunyai sifat dapat terdeposit secara kumulatif maka jumlah konsentrasi dan periode waktu paparan, menentukan terjadinya kecenderungan deposit, sehingga akan mempunyai kecenderungan menimbulkan kerusakan mukosa saluran kardiopul.



Gambar 5.1. Perubahan morfologi pada membran yang catat kandungan Pb di mukosa saluran kardiopul dengan perwarnaan Hematoxylin - Eosin pembesaran 400X (M. Makrolig.)

Peran makrofag alveolar adalah sebagai efektor, dan berbeda peran sel makrofag di mukosa sebagai sel penyaji antigen, yang akan menginduksi pada sel imunokompeten yang lain. Pertimbangan inilah, maka keberadaan partikel Pb yang cukup bermakna di sel makrofag alveolar pada kelompok perlakuan, akan lebih menunjukkan pengaruhnya pada sistem imun yang sistemik, karena lokasi kejadian (Bienenstock, 1999).

Kecenderungan konsentrasi partikel Pb di udara, khususnya di Surabaya relatif lebih dari 10 ug/m^3 , maka sangat dimungkinkan kejadian keberadaan yang cukup berarti partikel Pb dimaksud mempunyai potensi yang tinggi, namun disebabkan penelitian ini dilakukan di hewan coba, untuk melihat pengaruhnya kejadian di manusia perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut.

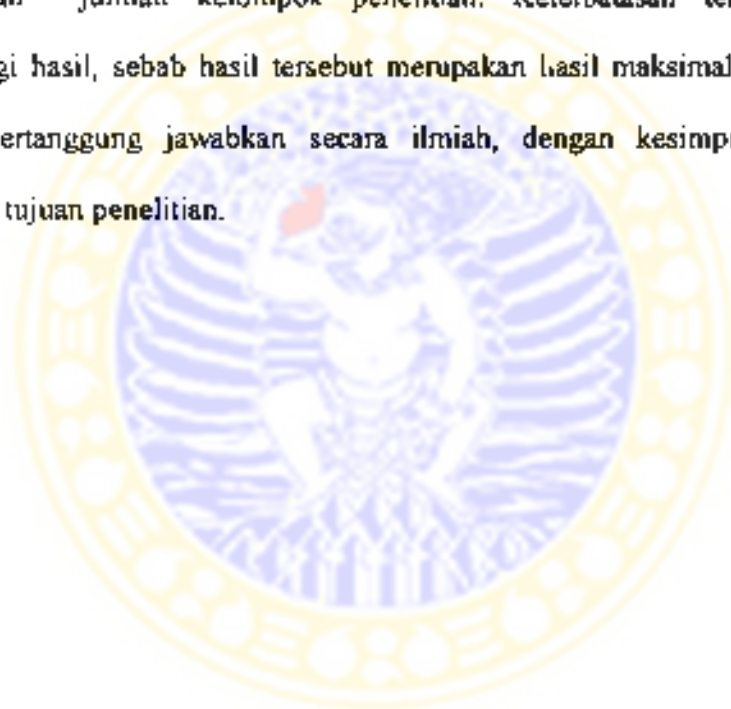
Keterbatasan penelitian

Kelompok paparan hanya satu kisaran, yaitu $> 2 \text{ ug/m}^3 - < 10 \text{ ug/m}^3$, sebaiknya dapat meneliti juga konsentrasi Pb kisaran $10 \text{ ug/m}^3 - 30 \text{ ug/m}^3$, untuk menggabungkan antara penelitian Bingham dan Zelikoff (Bingham, 1973; Zelikoff, 1993). Kontrol gas buang yang tanpa Pb, dapat menggunakan produk Pertamina, yang sudah diproduksi sejak bulan Juni tahun 2001, diharapkan lebih sempurna, namun kendala yang dihadapi adalah, tidak dapat dari sumber motor bakar yang sama, sehingga perlu uji kemampuan dalam menghasilkan gas buang dari motor bakar yang berbeda, terutama stabilitas debit.

Jenis penelitian eksperimen pada hewan coba, dengan pengaturan debit gas buang untuk menghasilkan konsentrasi yang diinginkan, guna melihat

pengaruh terhadap respons imun mukosal saluran pernapasan, dan melihat keberadaan partikel Pb di makrofag alveolar, belum pernah dilakukan di Indonesia, sehingga beberapa kelemahan tersebut merupakan masukan bagi peneliti berikutnya

Variabel respons imun yang diperiksa, terbatas, maka kelemahan ini bagi peneliti berikut agar lebih banyak variabel yang diteliti, sehingga akan dapat memberikan gambaran pola respons imun yang lebih lengkap, disamping itu keterbatasan jumlah kelompok penelitian. Keterbatasan tersebut tidak mengurangi hasil, sebab hasil tersebut merupakan hasil maksimal yang masih dapat dipertanggung jawabkan secara ilmiah, dengan kesimpulan dapat menjawab tujuan penelitian.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan.

1. Paparan partikel Pb dengan konsentrasi $> 2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $< 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ yang terkandung dalam gas buang dengan bahan bakar bakar premium, selama 3 jam/hari waktu 30 hari memodulasi respons imun mukosal saluran pernapasan dengan indikasi meningkatnya ST-CD4, ST-CD8 dan STpIL-2, sebagai bentuk respons imun seluler. Terjadi ketidak seimbangan sel Th1/ Th2, berakibat gangguan imunopatobiologis, sehingga cenderung dapat memicu terjadi *Delayed Type Hypersensitivity (DTH)*.
2. Paparan partikel Pb dengan konsentrasi $> 2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $< 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ yang terkandung dalam gas buang dengan bahan bakar bakar premium, selama 3 jam/hari, waktu 30 hari menyebabkan deposit di makrofag alveolar yang cukup berarti, sehingga dimungkinkan mempunyai kecenderungan dapat mengakibatkan kerusakan makrofag alveolar yang berakibat terjadinya fibrosis, bila konsentrasinya $> 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dan waktu paparan yang lebih lama.
3. Paparan partikel Pb dengan konsentrasi $> 2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $< 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ yang terkandung dalam gas buang dengan bahan bakar bakar premium selama 3 jam/hari, waktu 30 hari, menghasilkan pola respons imun diskriminan, dengan indikasi variabel pembeda terkuat

ST-CD4, ST-CD8, dan STpIL-2, yang menunjukkan peningkatan STCD4, diikuti sangat bermakna peningkatan ST-CD8 dan STpIL2.

4. Paparan partikel Pb dengan konsentrasi $> 2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ - $< 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ yang terkandung dalam gas buang dengan bahan bakar bakar premium selama 3 jam/hari, waktu 30 hari, menimbulkan suatu perubahan imunobiologik dari keseimbangan sel Th1/sel Th2 yang tidak normal, sehingga merupakan indikasi awal dari proses biologis yang merugikan.

7.2 Saran

1. Hasil penelitian ini, dapat menjadi masukan dalam mengkaji penetapan nilai ambang batas partikel Pb di udara (ambien), sesuai dengan PP No 41 tahun 1999, sebesar $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ udara, bagi daerah Propinsi Jawa Timur. SK. Gubernur Jatim No. 129 tahun 1996, yang sarapat saat ini masih memberlakukan nilai ambang batas $0,06 \text{ mg}/\text{m}^3$ ($60 \mu\text{g}/\text{m}^3$), melalui penelitian lanjutan.
2. Penelitian eksperimental hewan coba selanjutnya disarankan dilakukan di daerah yang mempunyai konsentrasi Pb diatas $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$, untuk melihat pengaruh respons imun mukosal saluran pemapasan, khusus terhadap keberadaan partikel Pb di makrofag alveolar dan dipelajari secara patologis kemungkinan yang terjadi akibat kerusakan makrofag alvacolar, yang mungkin bersifat spesifik

3. Paradigma imunopatobiologis dengan konsep *stress cell*, dapat digunakan sebagai paradigma untuk penelitian parameter zat pencemar kimia terutama zat pencemar udara dengan tujuan mengkaji pengaruh terhadap sistem imun yang tak lazim yang ditimbulkan oleh zat tersebut, sebagai pengembangan ilmu kedokteran, khususnya dalam hubungan dengan pencemaran lingkungan



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Paber JS, 1994. *Celluler and Moleculer Immunology*, Philadelphia. WB Saunders Company, pp 237 – 290
- Achmadi Umar Fahmi, 1990 *Media Kedokteran Indonesia*, Volume :40,Nomor:7, Juli 1990:399-409
- Aditama Tjandra Yoga, 2001. *Hubungan Asap dan Kanker Paru*. Kompas 11 Juli 2001
- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington, DC: American Public Health Association, pp 3-72.
- Badan Pengendalian Dampak Lingkungan, 1999. *Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 41 Tahun 1999 tentang Pengendalian Pencemaran Udara*, Bapedal, Jakarta. Halman 26-27
- Bailey R A, Clark IMM, Ferris JP, Kraus S, Strong R L, 1978 *Chemistry of the Environment*. London: Academic Press Inc, pp 96 – 109
- Balai Teknik Kesehatan Lingkungan Surabaya, 1996. *Laporan Hasil Pemantauan Kualitas Udara Ambien di terminal Bungurasih, Joyoboyo, Bratang dan Osowilangun Kotamadya Surabaya tahun 1996*. Surabaya: BTKL
- Belanti JA, 1985. *Immunology III*, Philadelphia. WB Saunders Company:291-296
- Berner GM, 1985. *Antibody and Immunoglobulins : Structure and Function* In. Bellanti ed. *Immunology III*. 2nd ed. Philadelphia WB Saunders Company, pp 89-105
- Bienenstock J, M.R McDermott, R.L. Clancy, 1999. *Respiratory Tract Defences. Role of Mucosal Lymphoid Tissues in Mucosal Immunology II*, second Ed, 1999 Academic Press, Toronto, pp 283-289
- Bingham E, Pfitzer E.A, Barkeley W & Radford E.P, 1968. *Alveolar macrophages: Reduced number in rats after prolonged inhalation of lead sesquioxide*. *Science*,162:1297-99
- Chanlet ET, 1979. *Environmental Protection*. Tokyo: Graw Hill Inc, pp 209-220

- Chen Pau-Chung, Yu-Min Lai, Jung-Der Wang, Chun-Yuh Yang, Jing-Shiang Hwang, Hsien-Wen Kuo, Song-Lih Huang, and Chang-Chuan Chan, 1998. Adverse Effect of Air Pollution on Respiratory Health of Primary School Children in Taiwan Environmental Health Perspective Volume 106, June 1998:331-335
- Chow TI, 1968. Isotope analysis of seawater by mass spectrometry. *J. Water Pollut Control. First Ed* 40:399-411
- Clark WR, 1983. *The Experimental Foundation of Modern Immunology*. 2nd Ed, London: John Wiley & Sons, pp 207-213
- Dean JH, Murray MJ and Ward EC, 1986. Toxic responses of the immune systems. In Cassarets & Douls Toxicology the Basic Science of Poison 3rd Ed. McMillan Publ Co : p 245-385
- Dermott MC, Befus AD, Bienenstock J, 1984. The Possible Role of Effector Cells on The Intestinal Mucosa and Gastrointestinal Host Defenses in Intractable Diarrhea. In: E Lebental Ed. Chronic Diarrhea in Children. New York, Nestle Nutrition Workshop Series Vol.6, Raven Press, 373
- Departemen Kesehatan RI, 2001. Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan, Dampak Kesehatan Dan Lingkungan Akibat Pencemaran Timbal.
- Direktorat Lalu Lintas, Markas Besar Kepolisian RI, Juni 1999.
- Fuggle, R.F & Rabie M.A, 1992. Environmental Management in South Africa, Juta: Cape Town
- Fullmer CS & Rosen JF, 1990. Effect of dietary calcium and lead status on intestinal calcium absorption. *Environmental Research* 51:91-99.
- Girard D, Paquin R, Beauheu A D, 1997. Responsiveness of Human neutrophils to Interleukin-4 Induction of Cytoskeletal Rearrangements, de novo Protein Synthesis and Delay of Apoptosis. *Biochem J*, Jul:325(Pt 1). 147-53
- Glass G and Hopkins, 1984. *Statistical Methods in Education And Psychology*, 2nd ed, New York, Allyn and Bacon Inc, pp-176-178
- Goldsmith, J.R., and Friberg, L.T, 1977. Effects of air pollution on human health In A.C Stern (Eds). *Air Pollution*, 3rd Ed, Volume -III, New York, Academic Press, 530-551

- Golub Es, 1987. Regulation of the immune response, In: *Immunology, a Synthesis* 1st ed, Sunderland, Mass, Sinauer Associates Inc, pp 378 – 400
- Goodman JW, 1991. *The Immune Response In Basic Human Immunology*. First Ed, USA :Prentice Hall International Inc, pp 34-43
- Goyer RA, 1986. Toxic effect of metal in Cassarets & Doul *Toxicology. The Basic Science Poison* 3rd edition, editor curtis D Klassen, Mc Millan Publ Co: pp 245-385
- Heo Y, Leu WT, Lawrence DA, 1998. Differential effects of lead and cAMP on development and activities of Th-1 and Th-2 lymphocyte .*Toxicol Sci* 1998, Jun ;43(2):172-85
- Hudson L and Hay FC, 1976. *Practical Immunology*, Third Ed, Melbourn. Blackwell Scientific Publications, pp 454-470
- Hume CW, 1972. *The Tufan Handbook on the Care and Management of Laboratory Animal* Fourth Ed, Edinburg and London, pp 199-202
- Hussell Tracy, Pietro Pala, Tim E.Sparer, Peter J.M.Openshaw. *Benefecial and harmful Immune Respons in the Respiratory Tract in Mucosal Immunology II*, second Ed, 1999 Academic Press, Toronto, pp 125 – 221
- IRITA, 1987. *Metal Finishing*, The Industry Recognized International Authority Sience 1903, Belgium Nov. 1987
- Janeway CA, Jr. ,Paul Travers, Mark Walport, J. Donald Capra, 1999. *Immuno Biology. The immune systems in Health and disease*, 4th Ed, Current Biology Publications, London, p.250-302, 6012-613)
- Kaminski, E.J, Fischer, C.A, Kennedy, G.L., Jr, and Calandra, J.C, 1977. 1977 Response of pulmonary macrophages to lead.*Br.J Exp.Pathol.*58,pp 9-12
- Kresno Siti Boedma, 1996. *Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, Edisi Ketiga, Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. hlm 3-49
- KPBB (Komite Penghapusan Bensin Bertimbang), 2001. *Kebijakan Energi Bersih Melalui Penghapusan Bensin bertimbang(Pb)*, Jakarta, 2001 hal 1-17

- Lanier L, 1991. Cells on the Immune Response Lymphocyte and Mononuclear phagocytes In (Daniel PS, Abbas IT, eds. Basic Human Immunology. First Ed, Stanford California: a Lange Medical Book, pp 61-67
- Lazlo G, Hathcock KS, Dickler H, Hodes PJ, 1993. Characterization of a Novel Cell-Surface Molecule Expressed on subpopulation of activated T and B cells. *J. Immunol* 150:5252-5253
- Lu FC, 1995. Toksikologi Dasar: Asas, Organ, sasaran dan penilaian Resiko. Edisi kedua, Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia, hlm 10-30
- Ludirdja H, Arjatim Tjokronegoro, Udin Syamsuddin, Setyawati, 1996. Pengaruh Timbal dari emisi kendaraan bermotor terhadap kualitas semen (air mani) Polisi Lalu Lintas di Jakarta. *Majalah Kedokteran Kerja Indonesia Vol 1.No. 1-April 1996 : 26 – 37*
- Masters GM, 1974. Introduction to Environmental Science and Technology. Canada. John Wiley & Sons, Inc, pp 178-193
- Mahaffey KR, 1985 Factors modifying susceptibility to lead toxicity, in Inorganic Lead. *Environmental Health Criteria* 165, World Health Organization, Geneva pp 140-145)
- Mc Ghee JR, Strober W, Fujihashi K, Kiyono H, 1993. Tcell and Cytokine regulation of mucosal antibody responses with emphasis on intrephithelial lymphocytes helper function in Mucosal Immunology : intraepithelial lymphocytes. Ed. Kiyono H, Mc.Ghee Inc. Raven Press 1-20
- Mustaina Sri, 1998. Pengaruh timbal asetat terhadap perubahan sistem ketahanan imunologik pada mukosa usus mencit (Pendekatan imunopatobiologik). Thesis, Universitas Airlangga.
- Nukman atrisman, 2001. Sub Dit Pengendalian Dampak Pencemaran Udara & Kebisingan Departemen Kesehatan R I, Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan. Dampak Kesehatan Dan Lingkungan Akibat Pencemaran Timbal.
- Palar H, 1994 Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat. Jakarta: PT Rineka Cipta, halaman 9-59
- Parslow TG 1997. Immunoglobulins & Immunoglobulin Genes. In: Stites DP (ed). *Medical Immunology* 9th Appleton & Lange A Simon & Schuster Company, . pp 43-145

- Pearary L. Ogra, Jiri Mestecky, Michael E. Lamm, Warren Strober, John Bienenstock, Jerry R. McGhee, 1999. *Mucosal Immunology I +II*, Second Ed Academic Press Toronto., dalam Chapter 18
- Peavy Howard S, Donald R. Rowe, George Tchobanoglous, 1985. *Environmental Engineering*. McGraw-Hill International Editions, Singapore, pp 426-463
- Pemerintah Daerah Tk.II Kodya Surabaya, Surabaya dalam angka 1996. Surabaya
- Pujirahardjo W J, Herjanto Poemomo, Moh Hasan Machfoed, 1993. *Metode Penelitian Dan Statistik Terapan*. Poerwadi T, Joseof AA dan Wijaya, Surabaya : Airlangga University Press: hlm 1-59
- Purwanto, Didik Sugeng, 2001. *Pola Hubungan Antara Volume Kendaraan Bermotor Dengan Kadar Partikulat, Pb Udara Dan Prediksi Kualitas Udara Di Jalan Raya Kota Surabaya*, Surabaya: Institut Teknologi 10 Nopember Surabaya(Thesis)
- Putra ST, 1990. *Pola Immunopatologik Kelenjar Getah Bening Regional sebagai Prognostikator Kanker Payudara. Suatu Pendekatan Morfofungsional*. Disertasi, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Putra ST, 1997 *Konsep Patobiologi dan imun mukosal, Immunologi Mukosal Kedokteran*. Surabaya : Gramik FK. Unair, halaman 27-48
- Putra ST, 1999. *Development of psychoneuroimmunological concept*. *Folica Medica Indonesia: Airlangga University School of Medicine: January-March 1999*, pp 23- 26
- Queiroz MC, 1994 *Engulfment and killing capabilities of neutrophils and phagocytic splenic function in person occupationally exposes to lead*. *Int-J-Immunopharmacol. Mar; 16(3):239-44*
- Romagnani S, 1997. *The Th1/Th2. Paradigm Immunology Today*, 18(6): 263-266
- Kane Agnes B, 1995. *Mechanisms of Cell and Tissue Injury in Cellular and moleculer Pathogenesis*, Editor Alphone E. Sirica. Philadelphia-New York: Lipincott-Raven Publishers, pp 1-3
- Ray Bill T, 1995. *Environmental engineering*. PWS Publishing Company, Boston, pp 427-468
- Razani, Boroujerdt S, Edwards B, Sopori ML, 1999. *Lead Stimulates*

- Lymphocytes proliferation through enhanced T cell - B cell interaction. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 199 Feb; 288(2):714-9
- Reeves Gordon and Ion Tood, 1996 *Immunology* 3rd Ed. Massachusetts : Blackwell Science Ltd , pp 68 – 95
- Riley V, 1981. Psychoneuroendocrine Influences on Immunocompetence and Neoplasia. *Science*, Vol 212, pp 1100-1109
- Rocke TE, Samule MD, 1991. Effect of lead shot ingestion renal function and Immune response. *Arch Hig Rada Toxicol* 97(1):Mar 1996:1-8
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK, 1985. *Immunology*. London New York: Gower Medical Publishing, pp 1-.11
- Roitt IM, 1988. Molecules which recognize antigen. In: *Essential Immunology* 6th ed, Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1988: pp 31-43
- Sarudji D, Prajogo, Widiyanto Hadiwinoto, 1998. Pengaruh pemberian vitamin C terhadap kadar Pb dalam darah polisi Lalu Lintas di Kotamadya Surabaya, Badan Penelitian Pengembangan Kesehatan: him 15 – 27
- Sata F, Araki S, Tangawa T, Morita Y, Sakurai S, Nakata A, Katsumo N, 1998. Changes in T Cell Subpulations in lead workers. *Environmental Res.* Dep of PH, Faculty of Medicine: University of Tokyo, Tokyo, Japan. Jan; 76(1):61-4
- Sharma Subhash, 1996. *Applied Multivariate Techniques*. Canada: John Wiley & Sons, Inc, pp-237-255.
- Sigal LH, 1994. Immunology and Inflammation. In *Basic Mechanism and Clinical Consequences* New York: Mc Graw Hill Inc, pp 470 –471
- Siswanto, 1994. *Toksikologi Industri, Balai Hiperkes dan Keselamatan Kerja Jatim, Depnaker.*
- Smith Arthur and John Bruton, 1978. *A colour atlas of Histological Staining Techniques*. Wolfe Medical Publications Ltd, 10 Earham Astreet, London WC2, pp-138
- Smith John B dan Soesanto Mangkoewidjojo, 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di daerah Tropis*, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta, halaman 11-36.

- Snedecor GW, Cochran WG, 1974. Ten Thousand Randomly Assorted Digits Assorted Digits. In: *Statistical Methods*, 6th ed. Ames Iowa: the Iowa State University Press, p542-543
- Soedomo Moestikahadi, 1999. *Mengenal Pencemaran Udara*. Penerbit Institut Teknologi Bandung. Halaman 3-101
- Steel Robert GD and James H. Torrie, 1993. *Prinsip dan prosedur statistika suatu pendekatan biometrik*. Jakarta: PT.Gramedia Pustaka Utama, hlm 132 – 148
- Stoldt Stephen in Amos Turk, Jonathan Turk, Janet T Wittes, Robert E. Witte, 1974. *Environmental Sciences*. Canada. W.B. Saunders Company, pp 335-369
- Stites DP, Abba I Terr, Tristram G Parslow, 1997. *Medical Immunology*, 9th Ed, Appleton & Large A Simon Shuster Company. Printice Hall, New Jersey: pp 9- 211.
- Sudiana I K, 1991 *Teknik Praktis Untuk Jaringan Sel*. Edisi Pertama, Jembrana Negara, Bali. CV. Dharma Shandi
- Swame, DJ, 1955. Thraee element content of soils In *Lead Environmental Health Criteria 3*, 1977, Geneva: WHO, pp 30-35
- Subowo, 1993. *Intuno Biologi*. Bandung :Angkasa, hal 3-20
- Svensden Per and Jann Hau, 1994 *Handbook of Laboratory Animal Science Volume I*, CRC Press LLC, USA, pp 60-87
- Thomas, V and T. Spiro, 1997. Emissions and exposure to metals, In: *Industrial ecology and global chane*, Socolow, R., C. Andrews, F. Berkhout and V. Thomas, eds., pp.297-318. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tureikran NK and Wedepore, 1961. Distribution of the elements in some major units of the earth's crust In *Lead Environmental Health Criteria 3*, 1977, Geneva: WHO, pp 30-35
- Trust KA, 1990 Effect of ingested lead on antibody production in mallarat (Anasplathy rhyncos). *J. Wild. Dis.* 26(3):316-22
- Viteta ES, Fernandez - Bortran R, Mayers CD, 1989 Sanders VM, 1989. Cellular interactions in the humoral immune response. In : Dixon FJ (Ed)

- Advances in Immunology. New York, Academic Press Inc; vol 45 : 1-86
- Wang JH, Redmond HP, Watson RW, Condon , Bouchier- Hayes D. 1995. Induction of Heat Shock Protein 72 Prevents neutrophil-Mediated Human Endothelial Cell Necrosis. Arch Surg.Dec; 130(12):1260-5
- Weast R. C, 1974. Hand Book of Chemistry and Physics, 55th Ed, Cleveland, Ohio: Chemical Rubber Company In Lead Environmental Health Criteria 3, 1977, Geneva: WHO, pp 19-21
- WHO, 1977 Environmental Health Criteria 3 : Lead, Geneva: pp 75-95
- WHO, 1987. Air Quality Guidelines for Europe; WHO Reg Publication, European Series No. 23, Copenhagen.
- WHO, 1989. Lead-Environmental Aspects. World Health Organization, Geneva : pp 35-84
- WHO-EHC-165, 1995 . Environmental Health Criteria 165. In Organic Lead Lead, World Health Organization, Geneva: pp 220-223
- Winarko, 1999. Analisis Faktor Determinan Kadar Pb Dalam Darah Pegawai Terminal Joyoboyo Kotamadya Surabaya , Surabaya :FKM-Unair (Tesis)
- Xu, x., and Dockey, D.W, 1991. Effects of Air Pollution on adult pulmonary function. Arch. Environment Health, 46, Vol4, pp-199-206
- Yatim Wildan, 1996. Biologi Modern, Biologi Sel. Bandung: Penerbit Tarsito Bandung, hal 1-95
- Zainuddin M, 1988. Metodologi Penelitian.Surabaya: hlm 25-28, 56-75
- Zelikoff J.T., Eleanore Parsons, and Richard B .Schlesinger, 1993. Inhalation of particulate Lead Oxide Disrupts Pulmonary Macrophage-mediated Function Important for Host Defense and Tumor Surveillance in the Lung Environmental Research.Academic Press, Inc, New York: 62, pp 207-222
- Zetterberg G, Anne Johansson, Joachim Lundahl, Margot Lundborg, Carl Magnus Skold, Goran Tornling, Per Camner, and Anders Ekluad, 1998. Differences between rat alveolar and interstitial macrophages 5wk after quartz exposure Journal of Applied Physiology Online-AJP-Lung Cellular and Molecular Physiology, Univerity of Stockholm, Sweden; February 1998, Vol 274, Issue2: pp 226-234

Lampiran 1

Uji coba konsentrasi Pb ambien setelah gas buang dihilangkan dengan Ca(OH)_2 10%, 25%, dan 50 %

No.	Debit gas buang	Pemeriksaan tgl. 30-9-2000 Konsentrasi Pb pada		Pemeriksaan tgl. 5-10-2000 Konsentrasi Pb pada	
		Ca(OH)_2 10%	Ca(OH)_2 25 %	Ca(OH)_2 25%	Ca(OH)_2 50 %
1.	40 cc/menit	Tidak diperiksa	Tidak diperiksa	0,002 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	0,005 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
2.	82,5 cc/menit	2,25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Tidak diperiksa	0,005 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	0,007 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

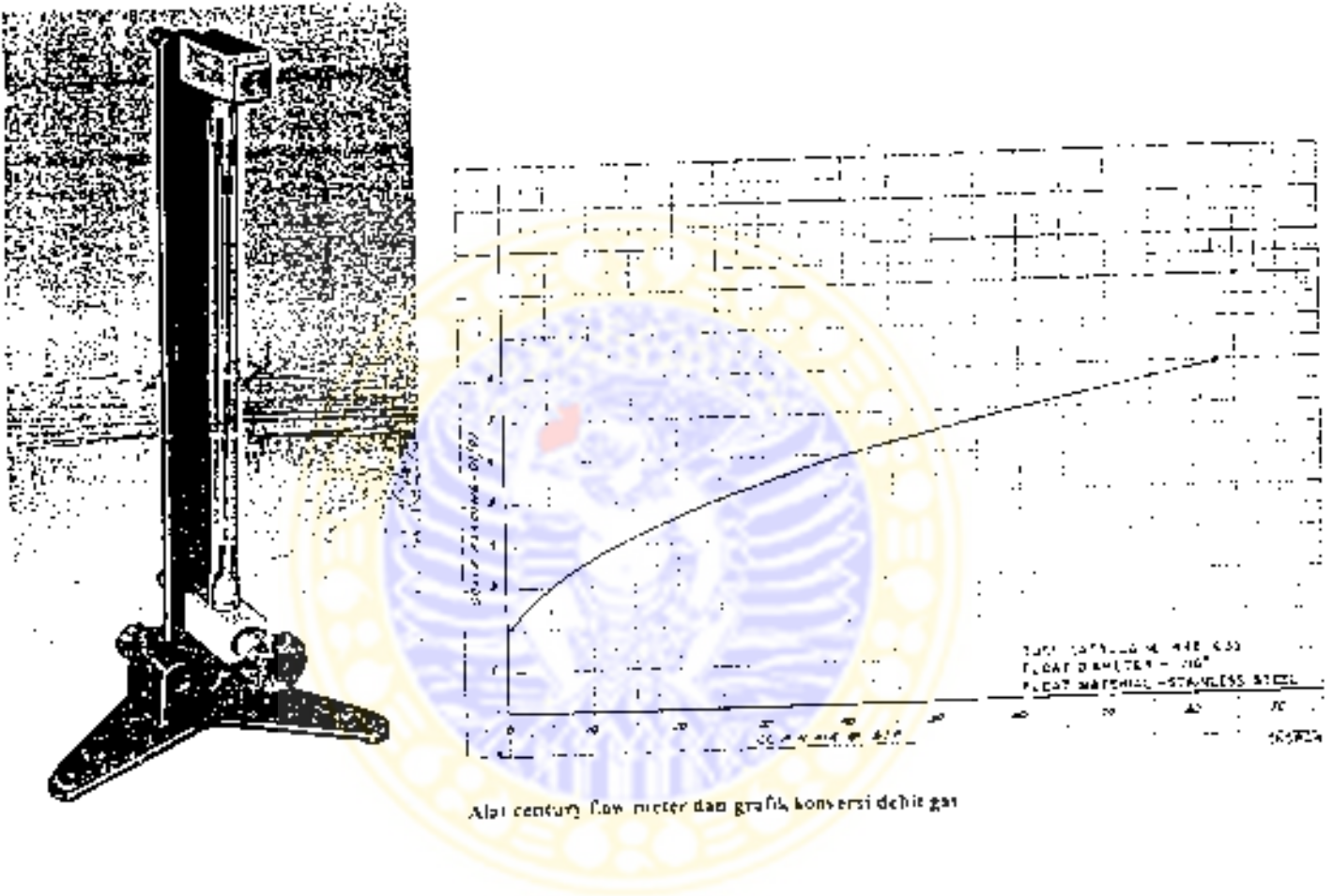
Evaluasi kandungan Pb pada cairan larutan Ca(OH)_2 25 % dan 50% setelah dipakai sebagai filter gas buang

Hasil uji Laboratorium			
Parameter	satuan	Hasil uji pada Ca(OH)_2	
		50%	25%
Pb	Mg/l	1,524	6,604

*Sumber data BTKL : Pemeriksaan tgl. 5 Oktober 2000

Lampiran 2

Alat century flow meter dan grafik konversi gas buang.



Lampiran 3

Rancangan *Box Model* untuk paparan partikel Pb

1. Pendekatan untuk menentukan dimensi *box model*

Pendekatan dibuat karena tidak ada prosedur baku untuk penelitian respons imun akibat inhalasi suatu gas buang motor bakar, maka pertimbangannya adalah atas kebutuhan dasar hidup mencit dan kemampuan hisap pada suatu area atau *breathing zone*.

-Kebutuhan mencit akan oksigen	=2,38-4,48 ml/gram/jam
-Berat mencit dewasa jantan	=30-40 gram
-Presentase oksigen di udara	=21%
-Jumlah mencit dalam satu <i>box model</i>	=maksimal 15 ekor
-Lama paparan	=3 jam – 24 jam

2. Dimensi *box model* :

Volume yang dibutuhkan adalah :

$$\begin{aligned}
 &4,5 \text{ ml/gram/jam} \times 35 \text{ gram/ekor} \times 15 \text{ ekor} \times 24 \text{ jam} \times 100/21 \\
 &= 270.000 \text{ mL} \\
 &\approx 0,27 \text{ m}^3 \\
 &\approx 0,5 \text{ m} \times 0,75 \text{ m} \times 0,75 \text{ m} \\
 &\quad \text{(tinggi} \times \text{panjang} \times \text{lebar)}
 \end{aligned}$$

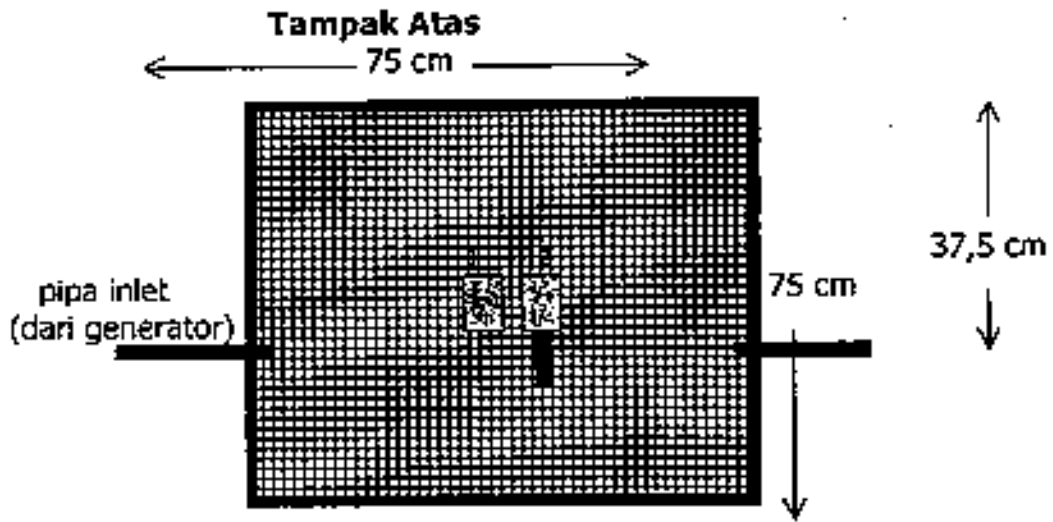
Menggunakan asumsi, bahwa *mixing height* emisi gas buang = 3 m

Tinggi rerata *breathing zone* orang = 1,5 m,

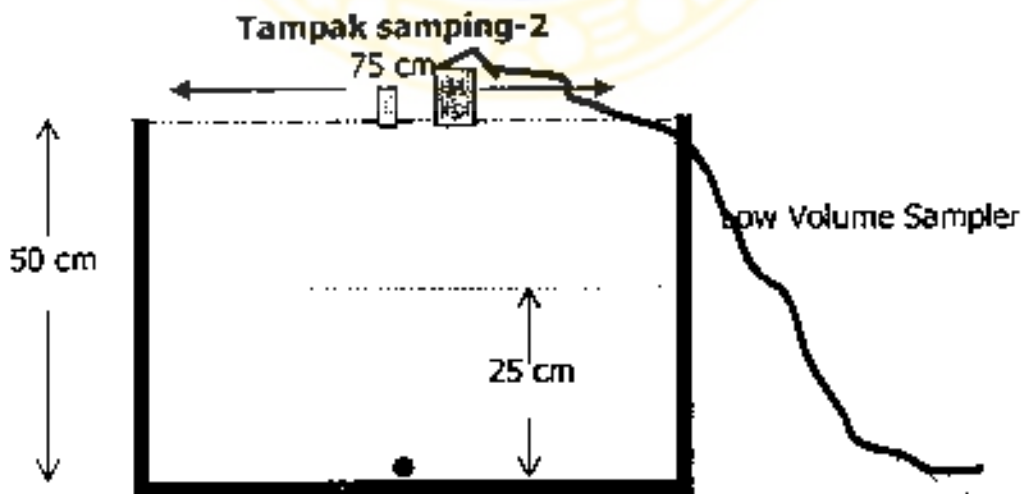
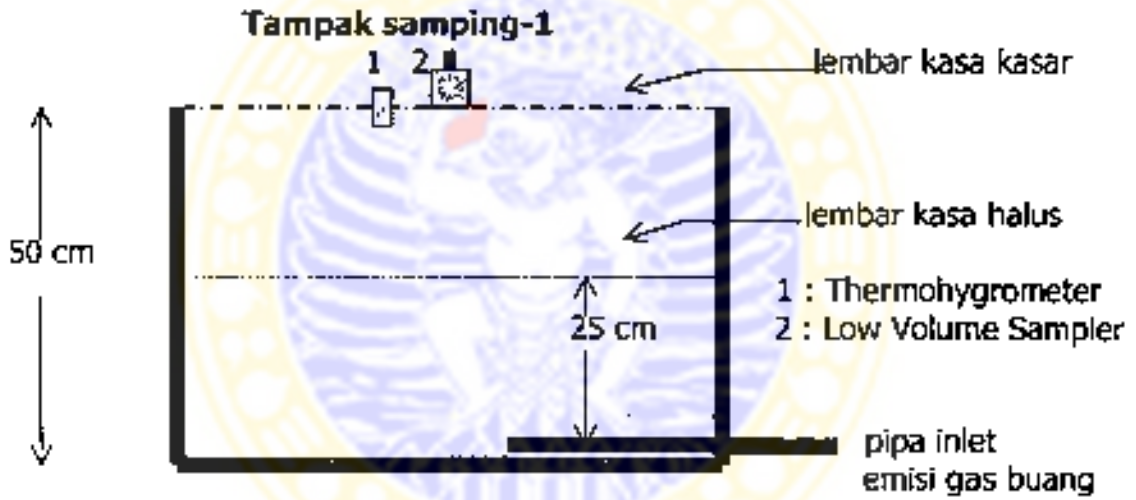
Untuk *mixing height box model* = 0,5 m, maka

breathing zone untuk mencit = $(0,5 \times 1,5) / 3 = 0,25 \text{ m}$

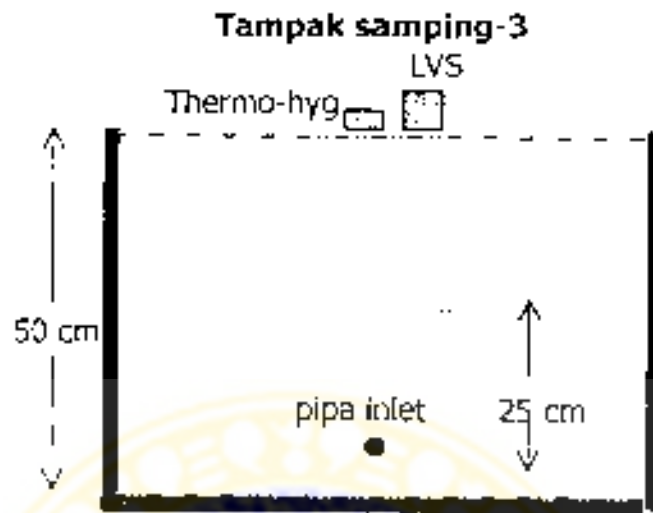
3. Rangkaian alat *box model* digambarkan dalam beberapa tampak samping, seperti di halaman 73, 74, 75, dan gambar 3 dimensi di halaman 76



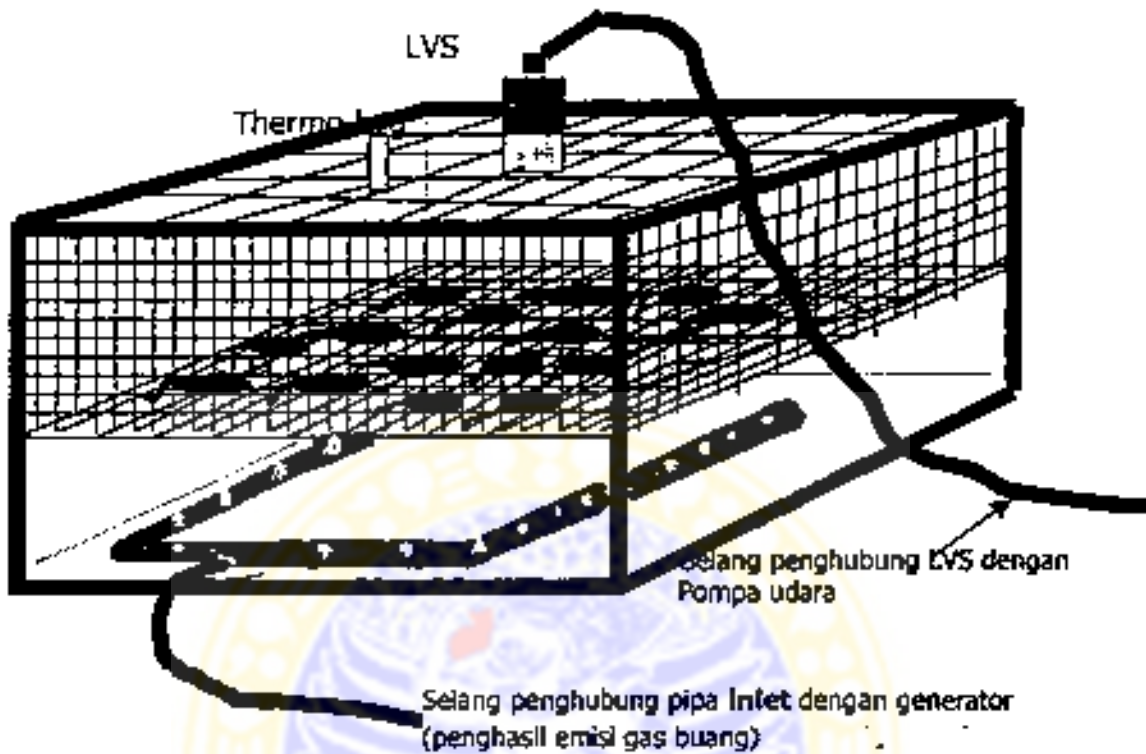
- 1 : Thermo hygrometer
- 2 : Low Volume Sampler



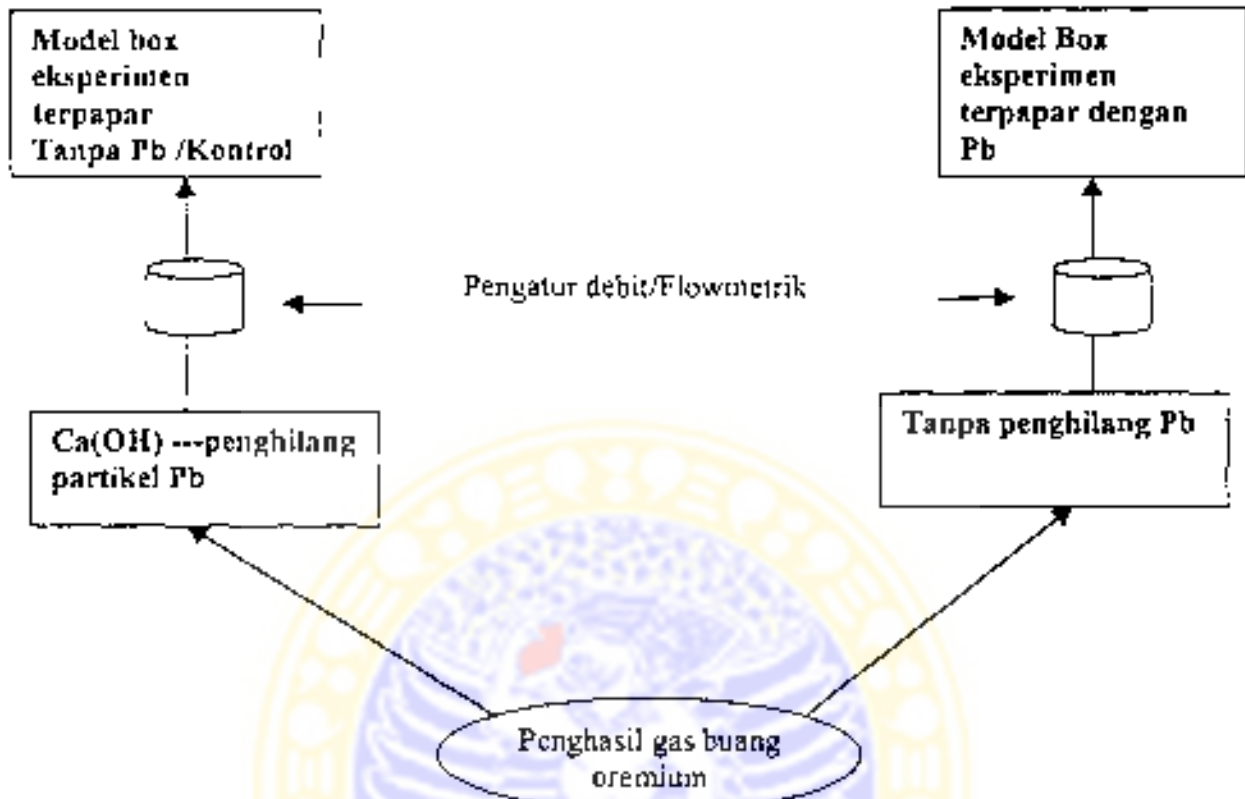
pipa inlet



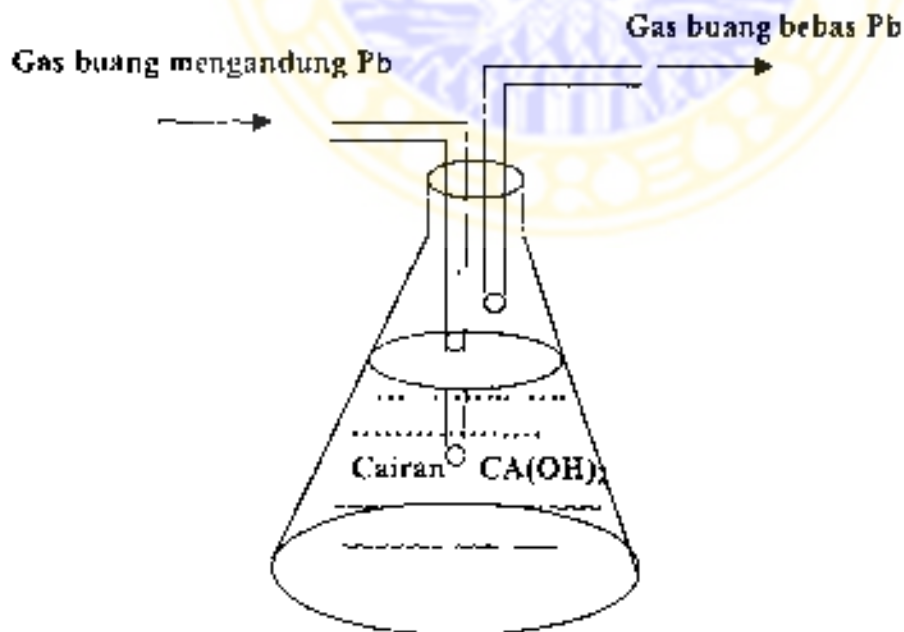
Gambar Tiga Dimensi 'Box Model'



GAMBARAN MODEL, PAPARAN



Gas buang dengan Ca(OH)₂ sebagai penangkap partikel Pb sebagai paparan kontrol



Lampiran 4

Uji coba debit gas buang motor berbahan bakar premium terhadap kandungan Pb

Uji coba debit gas buang motor berbahan bakar premium
Terhadap kandungan Pb

No.	Debit gas buang	Pemeriksaan tgl.26-8-2000 (Konsentrasi Pb)	Pemeriksaan tgl.30-9-2000 (Konsentrasi Pb)	Pemeriksaan tgl.5-10-2000 (Konsentrasi Pb)
1.	15.100cc/menit	2.466,7 ug/m ³	-	-
2.	13.000 cc/menit	1.366,7 ug/m ³	-	-
3.	8.000 cc/menit	700 ug/m ³	-	-
1.	14 cc/menit	-	2,5 ug/m ³	-
2.	40 cc/menit	-	5,5 ug/m ³	5,7 ug/m ³
3.	82,5 cc/menit	-	6,8 ug/m ³	7,0 ug/m ³

Sumber data :BTKL, tgl 26-8-2000, 30-9-2000,5-10-2000



Lampiran 5

Pengukuran kadar timbal /Pb di udara ambien secara spektrofotometri

1. Maksud dan Tujuan

a. Maksud

Metode pengujian ini dimaksudkan sebagai pegangan dalam pelaksanaan penentuan konsentrasi timbal di udara ambien.

b. Tujuan

Tujuan metode pengujian ini untuk menentukan konsentrasi timbal di udara ambien pada kisaran antara 0,5-10 ppm dengan menggunakan metode spektrofotometri

2. Teori Singkat

Partikulat di udara ditangkap dengan menggunakan pompa hisap dan media penyaring Partikulat tersuspensi pada kertas saring dilakukan analisa terhadapnya dengan alat Spektrofotometri Serapan Atom (SSA), untuk mengetahui kadar timbal yang terkandung di dalamnya

Terlebih dahulu dilakukan destruksi terhadap contoh kertas saring dengan menggunakan pelarut asam. Kelarutan unsur logam di udara akan dicapai secara maksimum dalam kondisi keasamanyang tinggi atau pH larutan berkisar 1. Untuk mendekomposisi unsur logam didalam contoh udara dapat dibantu dengan cara destruksi dengan penambahan asam khlorida. Adapun penggunaan peroksida dalam destruksi ini dimaksudkan untuk mengoksidasi senyawa-senyawa organik yang terkandung. Selain itu penggunaan asam nitrat sebagai pelarut logam yang akan dianalisa

Analisis Spektrofotometri Serapan Atom (SSA) biasa digunakan untuk analisis unsur-unsur logam. Analisis ini dilakukan dengan menggunakan nyala. Cuplikan dalam bentuk cairan disemprotkan ke dalam nyala dalam bentuk kabut halus. Didalam nyala terjadi pembentukan atom-atom netral dari unsur-unsur logam yang dianalisis. Atom-atom logam dapat mengabsorpsi sinar dengan panjang gelombang tertentu yang berasal dari sumber sinar (Hollow Cathode). Besarnya absorpsi sinar ini sebanding dengan konsentrasi atom-atom dalam nyala

Hubungan absorpsi sinar dengan konsentrasi dinyatakan oleh Hukum Lambert Beer

$$A = a b c$$

A = Absorbans

a = absortivitas

b panjang jalan sinar dalam nyala

c - konsentrasi atom logam

Metode ini digunakan untuk batas pengukuran konsentrasi Timbal antara 1-20 $\mu\text{g/l}$, dengan menggunakan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 283,3 nm.

3. Cara Pelaksanaan

• Peralatan dan Bahan

- Peralatan yang digunakan terdiri atas :
 - a. Spektrofotometri Serapan Atom sinar tunggal atau sinar ganda yang mempunyai kisaran panjang gelombang 190 - 870 nm dan lebar celah 0,2 - 2 nm serta telah dikalibrasi pada saat digunakan.
 - b. Pemanas listrik yang dilengkapi pengatur suhu
 - c. Pipet mikro 500 dan 1000 ml
 - d. Labu ukur 50 dan 1000 ml
 - e. Gelas piala 100 ml
 - f. Gelas ukur 100 ml
 - g. Pipet seukuran 5 dan 10 ml
 - h. Kaca arloji
 - i. Kertas saring whatman no. 5A/B
 - j. Gunting keramik (dianjurkan)
 - k. Corong gelas

- B a h a n

Bahan kimia yang mempunyai kemurnian tinggi (*pro analysis*) yang digunakan dalam pengujian ini terdiri atas :

 - a. Kemasan larutan logam Pb 1,0 g atau kemasan larutan induk Pb 1000 mg/l
 - b. Asam nitrat, HNO_3 pekat
 - c. Air suling atau air demineralisasi yang bebas logam
 - d. Gas asetilen
 - e. Asam klorida, Hcl pekat
 - f. Hidrogen peroksida, H_2O_2

- * *Persiapan Contoh Uji*

Preparasi untuk pengujian timbal dari contoh udara dapat diterapkan untuk alat High Volume Sampler (HVS) adalah sebagai berikut :

 - a. Tidak harus potong kertas saring menjadi potongan - potongan kecil dan masukkan ke dalam gelas piala 100 ml
 - b. Tambahkan 60 ml Hcl (1 : 1)
 - c. Tambahkan 5 ml H_2O_2 dan tutup mulut gelas piala dengan kaca arloji
 - d. Letakkan gelas piala diatas pemanas, panaskan contoh selama kurang lebih satu jam
 - e. Tambahkan kembali 5 ml H_2O_2 dan lanjutkan pemanasan selama 30 menit
 - f. Dinginkan contoh dan kemudian lakukan penyaringan
 - g. Bilas kaca arloji dengan sejumlah air bersamaan dengan penyaringan contoh
 - h. Saring contoh dan tampung filtrat pada gelas piala 100 ml yang lain, tambahkan 50 ml Hcl (1 : 1) pada residu di gelas piala terdahulu
 - i. Lanjutkan pemanasan selama 30 menit untuk contoh terdahulu (residu)
 - j. Dinginkan contoh dan kemudian lakukan penyaringan kembali, pencucian residu dilakukan dua kali
 - k. Jadikan filtrat dalam suatu gelas piala 100 ml atau 200 ml
 - l. Panaskan filtrat sampai terjadi evaporasi dan residu mendekati keadaan kering (hanya tinggal sedikit cairan sisa)

- m. Tambahkan 20 ml NH_4OH ke dalam gelas piala dan tutup dengan kaca arloji, sementara itu lanjutkan pemanasan sampai seluruh residu terlarut
- n. Dinginkan contoh dan lakukan penyaringan
- o. Bilas gelas piala dengan sejumlah kecil asam nitrat saring contoh dan kemudian tampung filtrat dalam labu - labu ukur 50 ml dan ditambah asam nitrat sampai tepat tanda tera
- p. Contoh (larutan tes) siap dianalisis dengan SSA

• *Persiapan Pengujian*

1. Pembuatan Larutan Induk Timbal, Pb

Buat larutan induk timbal 1000 ml/l dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Tuangkan larutan logam Pb 1,0 g dari kemasan kedalam labu ukur 1000 ml
- b. Tambahkan air suling sampai tepat pada tanda tera

2. Pembuatan Larutan Baku Timbal, Pb

Buat larutan baku timbal dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Pipet 0,0 ; 0,5 ; 10,0 ; 15,0 dan 20 ml larutan induk timbal dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 ml
- b. Tambahkan air suling sampai tepat pada tanda tera sehingga diperoleh kadar timbal 0,0 ; 0,5 ; 10,0 ; 15,0 dan 20,0 mg/l
- c. Masukkan larutan baku tersebut ke dalam tabung reaksi secara duplo sebanyak 20 ml

3. Pembuatan Kurva Kalibrasi

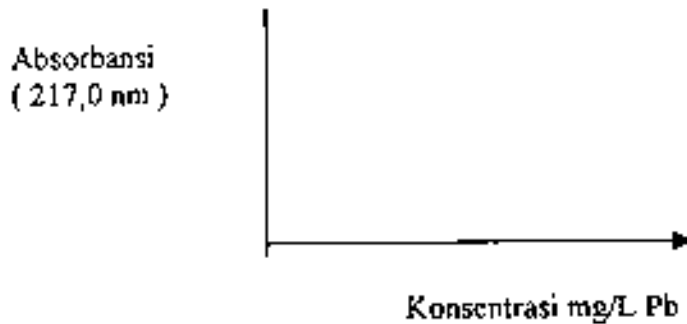
Buat kurva kalibrasi dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Atur alat SSA dan optimalkan sesuai dengan petunjuk penggunaan alat untuk pengujian kadar timbal
- b. Isapkan larutan baku satu per satu ke dalam alat SSA melalui pipa kapiler, kemudian baca catat masing - masing serapan masukkan
- c. Apabila perbedaan hasil pengukuran lebih dari 2% periksa keadaan alat dan ulangi langkah a dan b apabila perbedaannya kurang atau sama dengan 2% rata - ratakan hasilnya
- d. Buat kurva kalibrasi dari data b diatas atau tentukan persamaan garis lurusnya

Tabel :

Konsentrasi	0,0	5,0	10,0	15,0	20,0 mg/L Pb
Absorbansi (217,0 nm)	A1	A2	A3	A4	A5

Grafik :



• *Cara Uji*

Uji kadar timbal dengan tahapan sebagai berikut :

- a. Benda uji diisapkan satu per satu ke dalam alat SSA melalui pipa kapiler
- b. Serapan dibaca dan dicatat

4. **Perhitungan**

Hitung kadar timbal dalam benda uji dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis lurus dan perhatikan hal - hal berikut :

- a. Selisih kadar maksimum yang diperbolehkan antara dua pengukur duplo adalah 2% dan hasilnya dirata - ratakan
- b. Apabila hasil perhitungan kadar timbal lebih besar 20 mg/L, pengujian diulangi dengan cara mengencerkan benda uji
- c. Apabila hasil perhitungan kadar timbal lebih kecil dari 1,0 mg/L, pengujian diulangi dengan cara menggunakan metode tungku karbon atau dilakukan pengurangan volume larutan tes atau luas contoh kertas saring yang digunakan diperbesar
- d. Setelah didapatkan nilai konsentrasi Pb (hasil pengukuran dari SSA), konsentrasi Pb dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$C_{pt} = (C_t - C_b) \times V_t \times S/St \times 1/V$$

Keterangan :

C_{pt}	=	konsentrasi timbal diudara ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
C_t	=	konsentrasi timbal dalam larutan tes (mg/L)
C_b	=	konsentrasi timbal dalam larutan blanko (mg/L)
V_t	:	volume larutan tes
S	:	luas contoh pada permukaan kertas saring
St	=	luas contoh yang digunakan
V	=	volume udara yang hisap (m^3)

Lampiran 6

Sampling Suspended Particulate dengan Low Volume Sampler**a. Prinsip Operasi**

Low Volume air sampler ini dapat mengumpulkan partikel dengan ukuran tertentu atau lebih kecil yang tergantung kepada kapasitas pengisapan pompa.

Low Volume air sample ini memisahkan 100% partikel berukuran 10 μm pada multiplates horizontal elutriator.

Jika udara dihisap dengan debit 20 l/menit, ini dapat/biasa dipakai untuk pengukuran di Kantor, Sekolah, Bioskop di Jepang

Pada debit pengisapan yang lebih mudah yaitu 10 l/menit dapat memisahkan partikel berukuran 7 μm ini bisa dipakai sebagai metoda standard di Jepang, untuk pengukuran di tempat kerja seperti Industri, Bengkel dll

b. Prosedur Pengukuran

Memilih debit pemompaan dan waktu sampling pilih debit pemompaan sesuai dengan yang dikehendaki misalnya 20 l/m dan 20 l/menit. Untuk tujuan penelitian dapat dipilih debit sesuai dengan grafik.

Waktu sampling ditetapkan setelah mempertimbangkan kemungkinan konsentrasi debu yang diperkirakan, presisi dari alat penimbang dan sifat higroskopis dari filter. Waktu sampling minimum 10 menit dan debu yang menempel minimum 10 kali daya ukur timbangan misalnya $10 \times 0,1 \text{ mg} = 1 \text{ mg}$

c. Menimbang Filter Fiberglass

Sebelum sampling, tiap lembar filter harus dikondisikan dulu supaya berat dan kelembabannya konstan misalnya selama 24 jam pada temperatur 20°C dan kelembaban relatif 50 % di dalam desikator, setelah sampling di kondisikan lagi baru kemudian di timbang.

d. Sampling

Pada awal sampling, kecepatan alir pengisapan udara sesuai dengan yang diijinkan dengan mengatur katup. Jika debu menempel pada filter maka hambatan makin besar dan debit akan menurun, maka perlu untuk mengatur katup dari waktu ke waktu selama sampling.

e. Perhitungan

Konsentrasi debu dapat dihitung sbb :

$$C = \frac{W_2 - W_1}{V_0}$$

- dimana :
- C = Konsentrasi debu, mg/m^3
 - V_0 = Volume udara yang dibisap pada 20°C dan 760 mm Hg
 - W_2 = Berat filter sebelum sampling (mg)
 - W_1 = Berat filter setelah sampling (mg)

Untuk mendapatkan hasil yang lebih tepat, volume udara yang terbaca pada alat ukur harus dikoreksi dan distandarkan pada temperatur 20°C dan 760 mm Hg menurut rumus :

$$Q_u = Q_k \sqrt{\frac{293}{273 + t} + \frac{760 - p}{760}}$$

- dimana :
- Q_u = Debit yang telah distandarkan pada 20°C dan 760 mm Hg (l/menit)
 - Q_k = Debit rasial pembacaan (l/menit)
 - t = Temperatur ambien ($^\circ\text{C}$)
 - p = Tekanan udara (mmHg)

Berat badan mencit dan uji homogenitas

No. Sampel	Berat badan mencit Perlakuan (gram)		No Sampel	Berat badan mencit Kontrol (gram)	
	Awal	Akhir		Awal	Akhir
01-P	30	31,4	01-K	30,5	31,7
02-P	30,5	31,6	02-K	25,5	30
03-P	29,5	30,6	03-K	28,5	-
04-P	30,5	31,6	04-K	25,5	27,5
05-P	30,5	31	05-K	28	29,5
06-P	30	-	06-K	30,5	31,5
07-P	29	30	07-K	25	31,5
08-P	29,5	33,5	08-K	29	35,7
09-P	27	27,7	09-K	27	32,7
10-P	26,5	30,9	10-K	25	28
11-P	29	29,8	11-K	28	29
12-P	30	31,1	12-K	25,5	-
13-P	29	32,9	13-K	27,5	32,5
14-P	30,5	31,8	14-K	26,5	29
15-P	29	32,5	15-K	26,5	31
16-P	31,5	32,8	16-K	28,5	29,6
17-P	32	32,7	17-K	28,5	-

Descriptives

			N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
BBB mencit awal	Kelompok	1,00	17	29.2529	.3986	.0967
Paparan dan Kontrol	1(P):2(K)	2,00	17	29.0000	.4183	.1015
Total			34	29.1265	.4223	.0724

Descriptives

			95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
			Lower Bound	Upper Bound		
BBB mencit awal	Kelompok	1,00	29.0480	29.4579	28.70	30.10
Paparan dan Kontrol	1(P):2(K)	2,00	28.7849	29.2151	28.20	29.90
Total			28.9791	29.2738	28.20	30.10

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
BBB mencit awal Paparan dan Kontrol	.163	1	32	.672

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
BBB mencit awal	Between Groups	.544	1	.544	3,257	.081
Paparan dan Kontrol	Within Groups	5,342	32	.167		
Total		5,886	33			

Lampiran 8

Uji homogenitas usia mencit awal penelitian

Descriptives

			N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Usia mencit awal dalam hari	Kelompok	1.00	17	55.5682	2.1523	.5220
	Paparan dan Kontrol	2.00	17	55.8235	2.0987	.5090
	Total		34	55.2059	2.1289	.3651

Descriptives

			95% Confidence Interval for Mean			
			Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
Usia mencit awal dalam hari	Kelompok	1.00	55.4816	57.6048	52.00	60.00
	Paparan dan Kontrol	2.00	54.7445	56.9025	51.00	59.00
	Total		55.4631	56.9487	51.00	60.00

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Usia mencit awal dalam hari	.044	1	32	.836

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Usia mencit awal dalam hari	Between Groups	4.971	1	4.971	1.100	.302
	Within Groups	144.568	32	4.518		
	Total	149.566	33			

Uji beda T suhu lokasi penelitian

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Suhu lokasi kontrol	29.037	30	.885	.161
	Suhu lokasi paparan	28.773	30	.908	.166

Paired Samples Correlations

Pair		N	Correlation	Sig.
1	Suhu lokasi kontrol & Suhu lokasi paparan	30	.395	.031

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Suhu lokasi kontrol - Suhu lokasi paparan	.263	.986	.180	-.105	.631	1.463

Paired Samples Test

Pair		d ²	Sig. (2-tailed)
1	Suhu lokasi kontrol - Suhu lokasi paparan	29	.154

Uji beda T kelembaban lokasi penelitian.

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 Kelembaban lokasi kontrol	70.9667	30	1.8909	.3452
Kelembaban lokasi paparan	70.5867	30	1.7743	.3239

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 Kelembaban lokasi kontrol & Kelembaban lokasi paparan	30	.982	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Kelembaban lokasi kontrol - Kelembaban lokasi paparan	.0800	.3624	.0662	-.0653	.2153	1.200

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Kelembaban lokasi kontrol - Kelembaban lokasi paparan	29	.235

Lampiran : 11

Rekapitulasi konsentrasi Pb ambien ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) selama 30 hari

Hari ke	Konsentrasi Pb ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	
	Lokasi Perlakuan(P)	Lokasi Kontrol (K)
1	3.3	.00
2	3.3	.00
3	4.7	.03
4	4.7	.00
5	2.9	.00
6	8.8	.06
7	5.9	.02
8	8.1	.00
9	3.8	.00
10	3.7	.00
11	3.7	.01
12	3.5	.00
13	3.0	.00
14	4.7	.00
15	4.9	.02
16	4.7	.00
17	7.8	.00
18	5.0	.02
19	5.7	.00
20	4.1	.01
21	5.9	.00
22	4.4	.00
23	9.8	.05
24	6.9	.00
25	5.5	.02
26	9.6	.07
27	4.6	.04
28	3.2	.00
29	2.5	.00
30	3.8	.00

* Sumber data BTKL, tgl. 1 Nopember s/d 30 Nopember 2000

T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Konsentrasi Pb kontrol	.0107	30	.0189	.0035
	Konsentrasi Pb Paparan	5.083	30	1.998	.365

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Konsentrasi Pb kontrol & Konsentrasi Pb Paparan	30	.723	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Konsentrasi Pb kontrol - Konsentrasi Pb Paparan	-5.0727	1.9841	.3623	-.58136	-4.3318	-14.003

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Konsentrasi Pb kontrol - Konsentrasi Pb Paparan	29	.000

Uji beda T Pb di makrofag alveolar

	Kelompok 1(P), 2(K)	N	Mean	Std Deviation	Std Error Mean
Pb di	1,00	16	9.7687	4.0526	1.0132
makrofag alv.	2,00	14	.1286	.1590	.0425

Independent Samples Test

		t-test for Equality of Means						
		1	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
							Lower	Upper
Pb di makrofag alv.	Equal variances assumed	8,875	28	,000	9.6402	1.0862	7.4151	11.8652
	Equal variances not assumed	9,507	15,053	,000	9.6402	1.0140	7.4795	11.8009

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
Pb di makrofag alv.	Equal variances assumed	48,679	,000
	Equal variances not assumed		

Lampiran 13

Uji distribusi normal untuk Pb di sel makrofag alveolar, STp IL-4, STp IL-2, ST-CD8, ST-CD4, SPiG

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Pb alveolar Kelompok Kontrol	14	.1266	.1590	.00	.40
Pb alveolar Kelompok Paparan	16	9.7688	4.0526	2.70	15.60

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Pb alveolar Kelompok Kontrol	Pb alveolar Kelompok Paparan
N		14	16
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.1266	9.7688
	Std. Deviation	.1590	4.0526
Most Extreme Differences	Absolute	.362	.188
	Positive	.362	.188
	Negative	-.217	-.162
Kolmogorov-Smirnov Z		1.355	.746
Asymp. Sig. (2-tailed)		.051	.634

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
IL-4 Kelompok Kontrol	14	2,1500	2,1971	,00	5,50
IL-4 Kelompok Paparan	16	2,4575	1,9289	,00	6,90

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		IL-4 Kelompok Kontrol	IL-4 Kelompok Paparan
N		14	16
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,1500	2,4575
	Std. Deviation	2,1971	1,9289
Most Extreme Differences	Absolute	,265	,118
	Positive	,265	,118
	Negative	-,164	-,101
Kolmogorov-Smirnov Z		,990	,471
Asymp. Sig. (2-tailed)		,281	,979

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
IL-2 Kelompok Kontrol	14	2.4429	1.6171	.00	5.00
IL-2 Kelompok Paparan	16	6.1125	2.9626	1.30	10.10

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		IL-2 Kelompok Kontrol	IL-2 Kelompok Paparan
N		14	16
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2.4429	6.1125
	Std. Deviation	1.6171	2.9626
Most Extreme Differences	Absolute	.182	.165
	Positive	.149	.105
	Negative	-.182	-.165
Kolmogorov-Smirnov Z		.679	.659
Asymp. Sig. (2-tailed)		.745	.777

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
CD ^a Kelompok Kontrol	14	1.4464	1.2653	.00	3.70
CD ^b Kelompok Paparan	16	4.6062	2.7647	.00	9.70

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD ^a Kelompok Kontrol	CD ^b Kelompok Paparan
N		14	16
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	1.4464	4.6062
	Std. Deviation	1.2653	2.7647
Most Extreme Differences	Absolute	.231	.131
	Positive	.231	.131
	Negative	-.179	-.103
Kolmogorov-Smirnov Z		.863	.523
Asymp. Sig. (2-tailed)		.446	.947

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
CD4 kelompok Kontrol	14	.9643	1.2004	.00	3.20
CD4 Kelompok Paparan	16	4.9713	2.7819	.00	9.00

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		CD4 kelompok Kontrol	CD4 Kelompok Paparan
N		14	16
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.9643	4.9713
	Std. Deviation	1.2004	2.7819
Most Extreme Differences	Absolute	.269	.158
	Positive	.269	.068
	Negative	-.211	-.158
Kolmogorov-Smirnov Z		1.082	.632
Asymp. Sig. (2-tailed)		.192	.820

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
IgA Kelompok Kontrol	14	2,9214	2,6470	,00	9,70
IgA Kelompok Paparan	16	2,7500	2,4130	,00	6,20

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		IgA Kelompok Kontrol	IgA Kelompok Paparan
N		14	16
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,9214	2,7500
	Std. Deviation	2,6470	2,4130
Most Extreme Differences	Absolute	,204	,185
	Positive	,204	,185
	Negative	-,135	-,138
Kolmogorov-Smirnov Z		,765	,741
Asymp. Sig. (2-tailed)		,603	,642

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
IgA Kelompok Kontrol	14	3,1357	2,6445	,00	9,70
IgA Kelompok Paparan	16	2,7500	2,4130	,00	6,20

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		IgA Kelompok Kontrol	IgA Kelompok Paparan
N		14	16
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3,1357	2,7500
	Std. Deviation	2,6445	2,4130
Most Extreme Differences	Absolute	,185	,185
	Positive	,185	,185
	Negative	-,125	-,138
Kolmogorov-Smirnov Z		,691	,741
Asymp. Sig. (2-tailed)		,726	,642

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 14

Uji anova untuk variabel ST-(CD4, CD8), STp (IL-2, IL-4) dan SPiG_A

```
mas IL_2 IL_4 CD_4 CD_8 IGA ST group(1,2)/pd( cell (all)/pc( homo (all)
/pt( signif (all)/disc/desig.
```

```
30 cases accepted.
0 cases rejected because of out-of-range factor values.
0 cases rejected because of missing data.
2 non-empty cells.

1 design will be processed.
```

CELL NUMBER						
Variable	1	2				
GROUP	1	2				
Cell Means and Standard Deviations						
Variable .. IL_2						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	PERILAKU	5.113	2.962	16	4.534	7.691
GROUP	KONTROL	2.443	1.617	14	1.509	3.377
For entire sample		4.400	3.030	30	3.269	5.531
Variable .. IL_4						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	PERILAKU	2.457	1.823	16	1.430	3.485
GROUP	KONTROL	2.150	2.197	14	.881	3.419
For entire sample		2.319	2.028	30	1.537	3.071
Variable .. CD_4						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	PERILAKU	4.071	2.782	16	3.489	6.454
GROUP	KONTROL	1.964	1.300	14	.371	1.627
For entire sample		3.101	2.964	30	1.993	4.208
Variable .. CD_8						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	PERILAKU	4.606	2.763	16	2.133	6.079
GROUP	KONTROL	1.946	1.263	14	.716	2.177
For entire sample		3.132	2.691	30	2.127	4.137
Variable .. IGA						
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval	
GROUP	PERILAKU	2.750	2.413	16	1.464	4.036
GROUP	KONTROL	2.921	2.647	14	1.393	4.450
For entire sample		2.830	2.482	30	1.902	3.757

```
* * * * * ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN 1 * * * * *
```

```
EFFECT .. GROUP
```

```
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1 1/2, N = 1)
```

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Wilks	.65665	9.18009	5.00	24.00	.000
Hotelling's	1.91252	9.18009	5.00	24.00	.000
Wilk's	.34335	9.18009	5.00	24.00	.000
Roy's	.65665				

```
Eigenvalues and Canonical Correlations
```

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	1.91252	100.00000	100.00000	.81034

```

-----
Univariate F-tests with (1,28) D. F.

```

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
XL_2	100,54822	165,65179	100,54822	5,91614	18,99359	,000
XL_4	,70602	118,56450	,70602	4,23445	,16671	,686
CD_4	119,88303	104,61852	119,88303	4,81495	14,89810	,000
CD_8	74,55072	135,46169	74,55072	4,83792	15,40967	,001
TGA	,21943	178,42357	,21943	6,17227	,03443	,854

```

-----
Averaged F-test with (5,140) D. F.

```

VARIABLES	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
1 to 5	295,90742	732,92007	59,18149	5,23114	11,70465	,000

```

***** ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN 1 *****
EFFECT .. CONSTANT
-----
Multivariate Tests of Significance (E = 1, N = 1 1/2, M = 11)

```

Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error df	Sig. of F
Pillais	,91256	50,09786	5,00	24,00	,000
Hotelling	10,43705	50,09786	5,00	24,00	,000
Wilks	,08744	50,09786	5,00	24,00	,000
Roys	,91256				

```

-----
Eigenvalues and Canonical Correlations

```

Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.
1	10,43705	100,00000	100,00000	,95529

```

-----
Univariate F-tests with (1,28) D. F.

```

Variable	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
XL_2	546,51622	165,65179	546,51622	5,91614	92,37723	,000
XL_4	158,51029	118,56450	158,51029	4,23445	17,47353	,000
CD_4	263,05504	104,61852	263,05504	4,81495	54,63301	,000
CD_8	173,54072	135,46169	173,54072	4,83792	36,54100	,000
TGA	240,16609	178,42357	240,16609	6,17227	17,68925	,000

```

-----
Averaged F-test with (5,140) D. F.

```

VARIABLES	Hypoth. SS	Error SS	Hypoth. MS	Error MS	F	Sig. of F
1 to 5	1401,10365	732,92007	280,22073	5,23114	56,60927	,000

Analisis diskriminan .

dae group group(1,2)/VAR IL_2 IL_4 CD_4 CD_8 IGA/met kag/77N*0.5/DOUT*0.5/ana all/stat all.

----- DISCRIMINANT ANALYSIS ----- On groups defined by GROUP

10 (unsighted) cases were processed.
0 of these were excluded from the analysis.
10 (unsighted) cases will be used in the analysis.

Number of Cases by Group

GROUP	Number of Cases		Label
	Unweighted	Weighted	
1	16	16.0	PERLAJUAN
2	14	14.0	KONTROL
Total	30	30.0	

Group Means

GROUP	IL_2	IL_4	CD_4	CD_8	IGA
1	6.11250	2.45750	4.97125	4.60625	2.75000
2	2.44286	2.15000	.96429	1.44643	2.92143
Total	4.40000	2.31400	3.10133	2.13167	2.83000

Group Standard Deviations

GROUP	IL_2	IL_4	CD_4	CD_8	IGA
1	2.96263	1.92889	2.78192	2.76465	2.41302
2	1.61703	2.19711	1.20019	1.26529	2.64697
Total	1.02974	2.07800	2.96358	2.69106	2.48194

Wilks' Lambda (D-statistic) and univariate F-ratio with 1 and 28 degrees of freedom

Variable	Wilks' Lambda	F	Significance
IL_2	.62228	17.00	.0001
IL_4	.99408	.1857	.6851
CD_4	.52912	24.90	.0000
CD_8	.60502	15.41	.0005
IGA	.99877	.3443E-01	.8541

----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

1 groups defined by GROUP

Analysis number 1

Stepwise variable selection

Selection rule: Maximize Rao's V
 Maximum number of steps..... 10
 Minimum tolerance level..... .00100
 Maximum significance of F to enter..... .50000
 Minimum significance of F to remove..... .50000
 Minimum increase to Rao's V..... .00000

Canonical Discriminant Functions

Maximum number of functions..... 1
 Minimum cumulative percent of variance... 100.00
 Maximum significance of Wilks' Lambda... 1.0000

Discriminant probability for each group is .50000

----- Variables not in the analysis after step 0 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IL_3	1.0000000	1.0000000	.0007	16.99539
IL_4	1.0000000	1.0000000	.6261	
CB_4	1.0000000	1.0000000	.0000	24.89810
CB_8	1.0000000	1.0000000	.0005	15.40967
IGA	1.0000000	1.0000000	.8541	

At step 1, CB_4 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	1 1	28.0
Equivalent F	1 1	28.0 .0000
Rao's V	1 1	.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 1 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
CB_4	1.0000000	.0000	

----- Variables not in the analysis after step 1 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IL_2	.9803345	.9803345	.0017	48.61925
IL_4	.9883958	.9883958	.9267	
CB_8	.6893448	.6893448	.3395	26.79788
IGA	.9994605	.9994605	.87150 0	

F statistics and significances between pairs of groups after step 1
Each F statistic has 1 and 18.0 degrees of freedom.

Group	1	2
	PERLAKA	KONTROL
N	24.898	.0000

At step 2, IL_3 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	2 1	28.0
Equivalent F	2 2	27.0 .0000
Rao's V	2 2	.0000 (APPROX.)

----- Variables in the analysis after step 2 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
IL_2	.9803345	.0017	
CB_4	.9803345	.0002	

----- Variables not in the analysis after step 2 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IL_4	.9883958	.9883958	.9261	
CB_8	.6717643	.6717643	.2145	53.38977
IGA	.9878257	.9883145	.8961	

F statistics and significances between pairs of groups after step 2
 Each F statistic has 2 and 27.0 degrees of freedom.

Group	PERLAKUAN	N
1	PERLAKUAN	27,491
2	KONTROL	,0000

At step 3, CD_0 was included in the analysis.

	Degrees of Freedom	Signif. Between Groups
Wilks' Lambda	2 1 28.0	
Equivalent F	16.5254 3 26.0	.0000
RAO'S V	53.98977 3	.0000 [APPROX.]

----- Variables in the analysis after step 3 -----

Variable	Tolerance	Signif. of F to remove	Rao's V
IL_2	.9551328	.0015	
CD_4	.6887673	.0400	
CD_8	.4717643	.2145	

----- Variables not in the analysis after step 3 -----

Variable	Tolerance	Minimum Tolerance	Signif. of F to enter	Rao's V
IL_4	.9622901	.6547205	.9152	
IGA	.9835306	.6688414	.8387	

F statistics and significances between pairs of groups after step 3
 Each F statistic has 3 and 26.0 degrees of freedom.

Group	PERLAKUAN	N
1	PERLAKUAN	16,525
2	KONTROL	,0000

F level or tolerance or VDI insufficient for further computation.

Summary Table

Step	Action	Vars	Wilks' Lambda	Sig.	Rao's V	Sig.	Change in V	Sig.	Label
1	CD_4 Entered	1	.52912	.0000	24.89810	.0000	24.89810	.0000	
2	IL_2 Entered	2	.38544	.0000	48.61925	.0000	23.72116	.0000	
3	CD_8 Entered	3	.34402	.0000	53.98977	.0000	4.77051	.0290	

Classification Function Coefficients
 (Fisher's Linear Discriminant Functions)

GROUP	1	2
	PERLAKUAN	KONTROL
IL_2	1.286370	.4925635
CD_4	.7746902	.6682052E-01
CD_8	.6192902	.1759046
(constant)	-8.437134	-1.598853

Canonical Discriminant Functions

Function	Eigenvalue	Percent of Variance	Cumulative Percent	Canonical Correlation	Area	Wilks' Lambda	Chi-Square	D.F.	Significance
1*	1.90414	100.00	100.00	.9019231	1	.344234	28.197	1	.0000

* marks the 1 canonical discriminant functions remaining in the analysis.

Unstandardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IL_2	.71205
CD_4	.58088
CB_8	.16471

STRUCTURE MATRIX:

Pooled-within-groups correlations between discriminating variables and canonical discriminant functions (Variables ordered by size of correlation within function)

	FUNC 1
CD_4	.68190
IL_2	.56421
CB_8	.33724
IG1	-.07377
IL_4	.02901

Unstandardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IL_2	.2968583
CD_4	.2647206
CB_8	.1658120
(constant)	-.646431

Canonical Discriminant Functions evaluated at Group Means (Group Centroids)

Group	FUNC 1
1	1.24788
2	-1.62615

Test of equality of group covariance matrices using Box's M

The p-value and natural logarithm of determinants printed are those of the group covariance matrices.

Group Label	Rank	Log Determinant
1 PERULAKSIAN	3	5.798006
2 KONTROL	3	3.526363
Pooled Within-Groups Covariance Matrix	3	4.508184

Box's M	Approximate F	Degrees of freedom	Significance
19.416	7.8543	6,	5383.4 .0089

----- DISCRIMINANT ANALYSIS -----

On groups defined by GROUP

Analysis number 2
 Direct method: All variables passing the tolerance test are entered.
 Minimum Tolerance Level..... .00100

Canonical Discriminant Functions

Maximum number of functions.....	1
Minimum cumulative percent of variance...	100.00
Maximum significance of Wilks' Lambda....	1.0000

Prior probability for each group is .50000

Classification Function Coefficients
(Fisher's Linear Discriminant Functions)

GROUP	1	2
	PERLAKUAN	KONTROL
IL_2	1.361188	.5606885
IL_4	-.5124025	-.4847154
CD_4	.6434028	-.5751178E-03
CD_8	.9607944	-.5076684
IGA	.5326825	.4810373
[constant]	-10.02306	-2.940958

Canonical Discriminant Functions

Function	Eigenvalue	Percent of Variance	Cumulative Percent	Canonical Correlation	After Function	Wilk's Lambda	Chi-Square	D.F.	Significance
1*	1.42332	100.00	100.00	.813423	0	.7431435	23.260	5	.0001

* marks the 1 canonical discriminant functions remaining in the analysis.

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IL_2	.72723
IL_4	.02126
CD_4	-.57301
CD_8	.37216
IGA	.04868

Structure Matrix:

Pooled-within-groups correlations between discriminating variables and canonical discriminant functions
(Variables ordered by size of correlation within function)

	FUNC 1
CD_4	-.68187
IL_2	.56336
CD_8	.53643
IL_4	.05580
IGA	-.02536

Unstandardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	FUNC 1
IL_2	.2988863
IL_4	.1031104E-03
CD_4	-.2611359
CD_8	.1692001
IGA	-.1928853E-01
[constant]	-2.733769

Canonical Discriminant Functions evaluated at Group Means (Group Centroids)

Group	FUNC 1
1	1.24976
2	-1.42829

Test of equality of group covariance matrices using Box's M

The ranks and natural logarithms of determinants printed are those of the group covariance matrices.

Group Label	Rank	Log Determinant
1 PERLAKUAN	5	8.412820
2 KONTROL	5	7.951804
Pooled Within-Groups Covariance Matrix	5	7.725636

Box's M	Approximate F	Degrees of Freedom	Significance
39.006	2.0888	15,	3023.4 .0082

----- D I S C R I M I N A N T A N A L Y S I S -----

On groups defined by GROUP

Analysis number.. 1

Number of Canonical Discriminant Functions.. 1

List of the 3 Variables used..

Variable Label

IL_2
CD_4
CD_8

Classification Results -

Actual Group		No. of Cases	Predicted Group Membership	
			1	2
Group 1	PERLAKUAN	16	13 81.3%	3 18.8%
Group 2	KONTROL	14	0 .0%	14 100.0%

Percent of "grouped" cases correctly classified: 90.00%

Classification Processing Summary

30 Cases were processed.
0 Cases were excluded for missing or out-of-range group codes.
0 Cases had at least one missing discriminating variable.
30 Cases were used for printed output.

----- D I S C R I M I N A N T A N A L Y S I S -----

On groups defined by GROUP

Analysis number.. 2

Number of Canonical Discriminant Functions.. 1

List of the 5 Variables used..

Variable Label

IL_2
IL_4
CD_4
CD_8
IG1

Classification Results -

Actual Group		No. of Cases	Predicted Group Membership	
			1	2
Group 1	PERLAKUAN	16	12 75.0%	4 25.0%
Group 2	KONTROL	14	0 .0%	14 100.0%

Percent of "grouped" cases correctly classified: 86.67%

Classification Processing Summary

30 Cases were processed.
0 Cases were excluded for missing or out-of-range group codes.
0 Cases had at least one missing discriminating variable.
30 Cases were used for printed output.

Lampiran 16

Uji untuk menentukan pola respons imun mukosal saluran pernapasan

man IL_2 CD_4 CD_8 BY group(1,2)/pri cell (all)/pri homo (all)/pri signif (all)/disc/degig.

30 cases accepted.
 0 cases rejected because of out-of-range factor values.
 0 cases rejected because of missing data.
 2 non-empty cells.
 1 design will be processed.

		CELL NUMBER					
		1	2				
Variable							
GROUP		1	2				
Cell Means and Standard Deviations							
Variable .. IL_2							
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval		
GROUP	PERLAKUAN	7.861	3.811	16	5.832	9.894	
GROUP	KONTROL	1.203	.797	14	.743	1.663	
For entire sample		4.755	4.384	30	1.118	6.392	

Variable .. CD_4							
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval		
GROUP	PERLAKUAN	3.851	2.155	16	2.707	5.000	
GROUP	KONTROL	.064	.080	14	.018	.111	
For entire sample		2.084	2.489	30	1.162	3.006	

Variable .. CD_8							
FACTOR	CODE	Mean	Std. Dev.	N	95 percent Conf. Interval		
GROUP	PERLAKUAN	3.774	2.265	16	2.567	4.981	
GROUP	KONTROL	.544	.476	14	.289	.818	
For entire sample		2.266	2.333	30	1.395	3.138	
* * * * * ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN 1 * * * * *							
EFFECT .. GROUP							

Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 12)							
Test Name	Value	Approx. F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F		
Pillai's	.79806	34.25135	3.00	26.00	.000		
Hotelling's	3.95208	34.25135	3.00	26.00	.000		
Wilks'	.20194	34.25135	3.00	26.00	.000		
Roy's	.79806						

Eigenvalues and Canonical Correlations							
Root No.	Eigenvalue	Pct.	Cum. Pct.	Canon Cor.			
1	3.95208	100.00000	100.00000	.89334			

```

- - - - -
Univariate F-tests with (1,28) D. F.
Variable   Hypoth. SS   Error SS   Hypoth. MS   Error MS           F   Sig. of F
IL_2       331.15609   226.10761   331.15609   8.07527   41.00866   .000
CD_4       107.06778   69.75228   107.06778   2.49115   42.97921   .000
CD_6       77.90556    79.89771    77.90556    2.85349   27.10186   .000

- - - - -
Averaged F-test with (3,84) D. F.
VARIABLES   Hypoth. SS   Error SS   Hypoth. MS   Error MS           F   Sig. of F
1 to 3      316.12943   375.75759   172.04214    4.47330   38.45997   .000

* * * * * ANALYSIS OF VARIANCE -- DESIGN 1 * * * * *

EFFECT .. CONSTANT
- - - - -
Multivariate Tests of Significance (S = 1, M = 1/2, N = 12 )
Test Name      Value   Approx. F   Hypoth. DF   Error DF   Sig. of F
Pillai         .86345   54.80409    3.00        26.00     .000
Hotellings     6.32355   54.80409    3.00        26.00     .000
Wilks         .13655   54.80409    3.00        26.00     .000
Roy's         .86345

- - - - -
Eigenvalues and Canonical Correlations
Root No.      Eigenvalue      Pct.      Cum. Pct.      Canon Cor.
1             6.32355        100.00000  100.00000      .92922

- - - - -
Univariate F-tests with (1,28) D. F.
Variable   Hypoth. SS   Error SS   Hypoth. MS   Error MS           F   Sig. of F
IL_2       613.72985   226.10761   613.72985   8.07527   76.00114   .000
CD_4       114.47910   69.75228   114.47910   2.49115   45.95426   .000
CD_6       139.18950   79.89771   139.18950   2.85349   48.77870   .000

- - - - -
Averaged F-test with (3,84) D. F.
VARIABLES   Hypoth. SS   Error SS   Hypoth. MS   Error MS           F   Sig. of F
1 to 3      667.30845   375.75759   222.12282    4.47330   64.63517   .000

```

Uji beda pengamat ke 1 dan ke 2 untuk variabel penelitian

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Pengamat ke 1 PB Paparan	9,7687	16	4,0526	1,0132
	Pengamat ke 2 Pb paparan	9,2062	16	4,0860	1,0215

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Pengamat ke 1 PB Paparan & Pengamat ke 2 Pb paparan	16	,951	,000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower		Upper
Pair 1	Pengamat ke 1 PB Paparan - Pengamat ke 2 Pb paparan	,5625	1,2790	,3187	-1,190	1,2440	1,759

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Pengamat ke 1 PB Paparan - Pengamat ke 2 Pb paparan	15	,099

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Pengamat ke 1 Pb Kontrol	1286	14	.1500	.0425
	Pengamat ke 2 Pb K	.0979	14	.1352	.0361

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Pengamat ke 1 Pb Kontrol & Pengamat ke 2 Pb K	14	.733	.003

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	Pengamat ke 1 Pb Kontrol Pengamat ke 2 Pb K	.0307	.104	.0295	-.0330	.0945	1.041	.317	

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Pengamat ke 1 cd4 Paparan	4.9712	16	2.7819	.6055
	Pengamat ke 2 cd4 Paparan	4.8500	16	2.8411	.7103

Paired Samples Correlations

Pair		N	Correlation	Sig.
1	Pengamat ke 1 cd4 Paparan & Pengamat ke 2 cd4 Paparan	16	.900	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Pengamat ke 1 cd4 Paparan - Pengamat ke 2 cd4 Paparan	1212	1.2582	.3145	-5497	.7972	.385

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Pengamat ke 1 cd4 Paparan - Pengamat ke 2 cd4 Paparan	15	.706

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Pengamat ke 1 cd4 Kontrol	.9643	14	1.2004	.3208
	Pengamat ke 2 cd4 Kontrol	1.4286	14	.7300	.1951

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Pengamat ke 1 cd4 Kontrol & Pengamat ke 2 cd4 Kontrol	14	.686	.007

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower		Upper
Pair 1	Pengamat ke 1 cd4 Kontrol - Pengamat ke 2 cd4 Kontrol	-.4643	.8785	.2348	-.9715	.0429	-1.578

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Pengamat ke 1 cd4 Kontrol - Pengamat ke 2 cd4 Kontrol	13	.070

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Pengamat ke 1 cd8 Paparan	4.6063	16	2.7647	.6912
	Pengamat ke 2 CD8 paparan	4.2813	16	2.4763	.6191

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Pengamat ke 1 cd8 Paparan & Pengamat ke 2 CD8 paparan	16	.842	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					1
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Pengamat ke 1 cd8 Paparan - Pengamat ke 2 CD8 paparan	.3250	1.4987	.3747	-.4736	1.1236	.867

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Pengamat ke 1 cd8 Paparan - Pengamat ke 2 CD8 paparan	15	.399

T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Pengamat ke 1 CD8 Kontrol	1.4464	14	1.2653	.3382
	Pengamat ke 2 CD4 Kontrol	1.8643	14	1.4020	.3747

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Pengamat ke 1 CD8 Kontrol & Pengamat ke 2 CD4 Kontrol	14	.689	.006

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Pengamat ke 1 CD8 Kontrol - Pengamat ke 2 CD4 Kontrol	-.4179	1.0586	.2629	-1.0291	.1934	-1.477

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Pengamat ke 1 CD8 Kontrol - Pengamat ke 2 CD4 Kontrol	13	.164

T-Test

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair t Pengamat ke 1 II-2 Paparan	8.1125	16	2.9626	.7407
Pengamat ke 2 II-2 paparan	5.5938	16	3.6237	.9059

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 Pengamat ke 1 II-2 Paparan & Pengamat ke 2 II-2 paparan	16	.938	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower		Upper
Pair 1	Pengamat ke 1 II-2 Paparan - Pengamat ke 2 II-2 paparan	.5187	1.3278	.3319	-.1688	1.2263	1.563

Paired Samples Test

	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1 Pengamat ke 1 II-2 Paparan - Pengamat ke 2 II-2 paparan	15	.139

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Pengamat ke 1 IL-2 Kontrol	2.4429	14	1.6171	.4322
	Pengamat ke 2 IL-2 Kontrol	2.7786	14	1.6839	.4501

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Pengamat ke 1 IL-2 Kontrol & Pengamat ke 2 IL-2 Kontrol	14	.757	.002

Paired Samples Test

		Paired Differences				t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference Lower Upper	
Pair 1	Pengamat ke 1 IL-2 Kontrol - Pengamat ke 2 IL-2 Kontrol	-.3357	1.1513	.3077	-1.0005 .3290	-1.091

Paired Samples Test

		df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Pengamat ke 1 IL-2 Kontrol - Pengamat ke 2 IL-2 Kontrol	13	.295

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 Pengamat ke 1 IL-4 Paparan	2.4575	16	1.9289	.4822
Pengamat ke 2 IL-4 Paparan	2.0625	16	2.0807	.5202

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 Pengamat ke 1 IL-4 Paparan & Pengamat ke 2 IL-4 Paparan	16	.813	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower		Upper
Pair 1	Pengamat ke 1 IL-4 Paparan - Pengamat ke 2 IL-4 Paparan	.3950	1.2335	.3084	-.2623	1.0523	1.281

Paired Samples Test

	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1 Pengamat ke 1 IL-4 Paparan - Pengamat ke 2 IL-4 Paparan	15	.220

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Pengamat ke 1 IL-4 Kontrol	2.1500	14	2.1971	.5972
	Pengamat ke 2 IL-4 Kontrol	1.8714	14	1.3842	.3600

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Pengamat ke 1 IL-4 Kontrol & Pengamat ke 2 IL-4 Kontrol	14	.718	.004

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Pengamat ke 1 IL-4 Kontrol - Pengamat ke 2 IL-4 Kontrol	.2786	1.5423	.4122	-.0119	1.1691	.676

Paired Samples Test

		t	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Pengamat ke 1 IL-4 Kontrol - Pengamat ke 2 IL-4 Kontrol	13	.511

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Pengamat ke 1 Iga Paparan	2,7300	16	2,4130	,6093
	Pengamat ke 2 Iga Paparan	2,8125	16	1,9903	,4976

Paired Samples Correlations

Pair		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Pengamat ke 1 Iga Paparan & Pengamat ke 2 Iga Paparan	15	,857	,000

Paired Samples Test

		Paired Differences					t
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Pengamat ke 1 Iga Paparan - Pengamat ke 2 Iga Paparan	-.0625	1,2060	,3016	-.7054	,5804	-.207

Paired Samples Test

Pair		t	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Pengamat ke 1 Iga Paparan - Pengamat ke 2 Iga Paparan	15	,639

T-Test

Paired Samples Statistics

	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1 Pengamt 1 Iga-Kontrol	2.9214	14	2.6470	.7074
Pengmt 2 Iga Kontrol	2.8714	14	3.4026	.9094

Paired Samples Correlations

	N	Correlation	Sig.
Pair 1 Pengamt 1 Iga-Kontrol & Pengmt 2 Iga Kontrol	14	.938	.000

Paired Samples Test

		Paired Differences					1
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		
					Lower	Upper	
Pair 1	Pengamt 1 Iga-Kontrol - Pengmt 2 Iga Kontrol	.0500	1.2990	.3472	-.7000	.8000	.144

Paired Samples Test

	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1 Pengamt 1 Iga-Kontrol - Pengmt 2 Iga Kontrol	13	.868

DEPARTEMEN PERTANIAN DIREKTORAT JENDERAL PRODUKSI PETERNAKAN

Wisma RM No. 3
Jl. Raya Minggu Jakarta 12550
Kotak Pos 1108 / JKS. JAKARTA 12011

Telp. : (021) 7815583 - 8
Fax. : (021) 7815561
7815583

PUSAT VETERINARIA FARMA
Jl. Raya Jenderal A. Yani No. 58 - 70
KABUPATEN BOGOR Kotak Pos WO. 3
Telp. : (031) 8291125
Faks. : (031) 8291183

Surabaya, 15 Oktober 2000

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan dibawah ini saya,

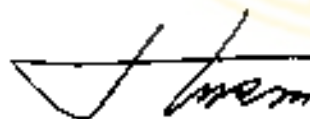
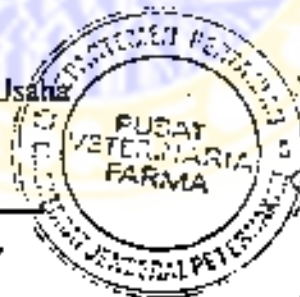
Nama : Drh. Imam Suryanto M.Kes
NIP : 080 065 536
Golongan/Ruang : Pembina/ IV a
Jabatan : Kepala Instalasi Kandang Hewan Percobaan
PUSVETMA

Menerangkan bahwa saudara Sudarso MSc. NIM 099813118 D
kandidat Doktor UNAIR sebelum melakukan penelitian untuk disertasi
telah mengajukan permintaan " Ethical Clearance " yang sesuai dengan
metode penelitian dan prosedur yang berlaku pada perlakuan hewan
coba.

Sekian surat keterangan ini untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Mengetahui
Kepala Bagian Tata Usaha
PUSVETMA

Yang menerangkan


Drh. Hardono
NIP. 080 055 886

Drh. Imam Suryanto M.Kes
NIP. 080 065 536