

**TESIS**

**EFEK ANTIINFLAMASI *HYDROGEN-RICH WATER* TERHADAP  
PARU YANG TERPAPAR ASAP ROKOK PADA TIKUS**

**THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF HYDROGEN-RICH  
WATER ON THE LUNGS EXPOSED TO CIGARETTE  
SMOKE IN RATS**

Disusun dan diajukan oleh

**A. SITTI RAHMATULLAH**

**P062201026**



**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2023**

**EFEK ANTIINFLAMASI *HYDROGEN-RICH WATER* TERHADAP  
PARU YANG TERPAPAR ASAP ROKOK PADA TIKUS**

TESIS

SEBAGAI SALAH SATU SYARAT UNTUK MENCAPAI GELAR  
MAGISTER

PROGRAM STUDI

ILMU BIOMEDIK

DISUSUN DAN DIAJUKAN OLEH

A. SITTI RAHMATULLAH

KEPADA

**SEKOLAH PASCASARJANA**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2023**

**LEMBAR PENGESAHAN TESIS**

**EFEK ANTIINFLAMASI *HYDROGEN-RICH WATER* TERHADAP PARU  
YANG TERPAPAR ASAP ROKOK PADA TIKUS**

Disusun dan diajukan oleh

**A. SITTI RAHMATULLAH**  
**P062201026**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi  
Program Magister Ilmu Biomedik Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin

Pada Tanggal 27 Februari 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Pembimbing Utama

dr. Arif Santoso, Sp. P(K), Ph.D, FAPSR

NIP. 19770715 200604 1 012

Pembimbing Pendamping

dr. Muhammad Husni Cangara, Ph.D,

Sp. PA, DFM

NIP. 19770409 200212 1 002

Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Biomedik

dr. Rahmawati, Ph.D, Sp.PD-KHOM, FINASIM

NIP. 19680218199903 2 002

Dekan Sekolah Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed

NIP. 19661231 199503 1 009

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : A. Sitti Rahmatullah  
Nomor Mahasiswa : P062201026  
Program Studi : Ilmu Biomedik – Konsentrasi Aging  
and Regenerative Medicine

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Februari 2023

Yang menyatakan,



A. SITTI RAHMATULLAH

## PRAKATA

Penulis panjatkan puji dan syukur kepada Allah Subhanahu wa Ta'ala atas rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini sebagai salah satu syarat memperoleh gelar master pada program studi Ilmu Biomedik konsentrasi Aging and Regenerative Medicine Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar. Demikian pula shalawat dan salam penulis curahkan kepada baginda Nabi Muhammad Shallallahu 'Alaihi Wasallam yang telah menjadi suri tauladan kita semua.

Dalam menyusun tesis ini, penulis menyadari terdapat berbagai kendala dan kesulitan. Namun, hal tersebut dapat teratasi berkat dukungan, doa, dan bantuan dari berbagai pihak. Maka dari itu, dengan sepenuh hati penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Suami dan anak tercinta, **dr. Riskullah Makmur** dan **Andi Aisyah Shafiyah Riskullah**, yang senantiasa memberikan dukungan, bantuan, doa, cinta, dan kasih sayang, serta pengertian selama proses pendidikan dan penyusunan tesis ini.
2. Kedua orang tua penulis ibunda **Hj. A. Harustiati** dan ayahanda **H. A. Sudirman M. Yusuf**, mertua penulis ibunda **DR. dr. Fatmawati Madya, Sp.OG** dan bapak **Drs. Abdul Kahar Kantao, MM**, serta seluruh anggota keluarga yang telah memberikan motivasi, dukungan, bantuan dan doa selama penulis menjalani pendidikan.
3. **dr. Arif Santoso, Sp.P(K), Ph.D, FAPSR** selaku pembimbing utama yang senantiasa menyempatkan waktu disela-sela kesibukan beliau untuk membimbing, mengarahkan, serta memberi masukan dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.

4. **dr. Muhammad Husni Cangara, Ph.D, Sp. PA, DFM** selaku pembimbing pendamping yang juga senantiasa membimbing serta memberi masukan, saran, dan solusi atas kendala-kendala yang dihadapi oleh penulis.
5. **Dr. dr. Ika Yustisia, M.Sc., dr. Aminuddin, M.Nut&Diet, Ph.D,** dan **Dr. dr. Endy Adnan, Sp.PD-KR, Ph.D** selaku tim penguji yang telah memberikan banyak masukan dan saran sehingga penelitian dan penyusunan tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.
6. Bapak/ibu dosen serta staf Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin atas ilmu, bantuan dan pelayanannya selama penulis menjalani pendidikan.
7. Teman-teman mahasiswa angkatan 2020/1 Program Studi Ilmu Biomedik khususnya konsentrasi Aging and Regenerative Medicine atas dukungan dan kebersamaannya selama menempuh pendidikan di Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
8. Rekan, kerabat, serta seluruh pihak yang telah memberikan bantuan dan turut berkontribusi dalam proses pendidikan, penelitian, dan penyusunan tesis ini. Semoga senantiasa diberi keberkahan dan balasan pahala yang berlipat ganda oleh Allah SWT.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam tesis ini, sehingga diharapkan saran dan masukan yang membangun untuk perbaikan tesis ini di masa depan. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi para pembaca

Makassar, Februari 2023

A. Sitti Rahmatullah

## ABSTRAK

### **A. SITTI RAHMATULLAH.** Efek Antiinflamasi *Hydrogen-Rich Water* Terhadap Paru yang Terpapar Asap Rokok pada Tikus (dibimbing oleh **Arif Santoso** dan **Muhammad Husni Cangara**)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiinflamasi *hydrogen-rich water* terhadap paru yang terpapar asap rokok selama 28 hari pada tikus. Sebanyak 20 ekor tikus dibagi menjadi empat kelompok ( $n=5$ ) yaitu kelompok kontrol I (KI) yang diberi aquades + paparan udara biasa, kelompok kontrol II (KII) yang diberi aquades + paparan asap rokok, kelompok perlakuan I (KPI) yang diberi HRW 5 mL sekali sehari + paparan asap rokok, serta kelompok perlakuan II (KPII) yang diberi HRW 5 mL dua kali sehari + paparan asap rokok. Pemberian HRW/aquades dilakukan 30 menit sebelum paparan asap rokok secara oral melalui kanula. Pemaparan asap rokok berlangsung sekitar 15-25 menit dengan 5 batang rokok/hari selama 28 hari. Selanjutnya dilakukan terminasi dan nekropsi hewan coba. Paru kanan diambil untuk pemeriksaan kadar NF- $\kappa$ B p65 sebagai biomarker inflamasi dengan metode *ELISA*, sedangkan paru kiri diambil untuk pemeriksaan histopatologi paru. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian HRW dapat menurunkan kadar NF- $\kappa$ B p65 yang diinduksi oleh paparan asap rokok, dan signifikan pada kelompok KPII ( $p=0.004$ ). Dari pemeriksaan histopatologi, pemberian HRW menurunkan derajat inflamasi paru yang disebabkan oleh paparan asap rokok secara signifikan pada kelompok KPI ( $p=0.032$ ) dan kelompok KPII ( $p=0.017$ ). Dengan demikian, HRW memiliki efek antiinflamasi terhadap paru yang terpapar asap rokok, dan terkait dengan volume total HRW yang dikonsumsi perhari.

**Kata kunci:** *antiinflamasi, asap rokok, hydrogen-rich water, NF- $\kappa$ B*





## ABSTRACT

**A. SITTI RAHMATULLAH.** *The Anti-Inflammatory Effects of Hydrogen-Rich Water on the Lungs Exposed to Cigarette Smoke in Rats* (supervised by **Arif Santoso** and **Muhammad Husni Cangara**)

This study aims to determine the anti-inflammatory effect of *hydrogen-rich water* on lungs exposed to cigarette smoke for 28 days in rats. A total of 20 rats were divided into four groups, namely control group I (KI) which was given aquades + exposed to free air, control group II (KII) which was given aquades + exposed to cigarette smoke, treatment group I (KPI) which was given HRW 5 mL once a day + exposed to cigarette smoke, and treatment group II (KPII) who were given HRW 5 mL twice a day + exposed to cigarette smoke. HRW/aquades was administered 30 minutes before exposure to cigarette smoke orally through a cannula. Cigarette smoke exposure lasts about 15-25 minutes with 5 cigarettes/day for 28 days. Subsequently, lung necropsy was performed, where the right lung was taken to examine the levels of NF- $\kappa$ B p65 as a biomarker of inflammation using the ELISA method, while the left lung was taken for pulmonary histopathological examination. The results showed that the administration of HRW could reduce the levels of NF- $\kappa$ B p65 induced by cigarette smoke exposure, and significantly in the KPII group ( $p=0.004$ ). From histopathological examination, administration of HRW significantly reduced the degree of lung inflammation caused by exposure to cigarette smoke in the KPI group ( $p=0.032$ ) and the KPII group ( $p=0.017$ ). Thus, HRW has anti-inflammatory effects on the lungs exposed to cigarette smoke, and are related to the total volume of HRW consumed per day.

**Keywords:** *anti-inflammatory, cigarette smoke, hydrogen-rich water, NF- $\kappa$ B*





## DAFTAR ISI

SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN TESIS .....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS .....	iv
PRAKATA .....	v
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
BAB I .....	1
1.1 LATAR BELAKANG MASALAH .....	1
1.2 RUMUSAN MASALAH.....	4
1.3 TUJUAN PENELITIAN.....	4
1.4 MANFAAT PENELITIAN.....	5
BAB II .....	6
2.1 ASAP ROKOK.....	6
2.2 <i>HYDROGEN-RICH WATER</i> .....	8
2.3 <i>NUCLEAR FACTOR KAPPA B</i> .....	11
2.4 PENGARUH ASAP ROKOK TERHADAP AKTIVASI NF-κB DAN INFLAMASI PARU .....	14
2.5 PENGARUH HIDROGEN TERHADAP PENURUNAN AKTIVASI NF-κB DAN INFLAMASI PARU .....	18
2.6 KERANGKA TEORI.....	21

2.7	KERANGKA KONSEP .....	22
2.8	HIPOTESIS .....	22
BAB III	.....	23
3.1	DESAIN PENELITIAN.....	23
3.2	VARIABEL PENELITIAN .....	24
3.3	WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN .....	25
3.4	POPULASI DAN SAMPEL PENELITIAN .....	25
3.5	ALAT DAN BAHAN .....	26
3.6	PROSEDUR PENELITIAN .....	27
3.7	DEFINISI OPERASIONAL.....	32
3.8	IZIN PENELITIAN DAN KELAYAKAN ETIK .....	33
3.9	TEKNIK ANALISIS DATA .....	34
3.10	ALUR PENELITIAN .....	35
BAB IV	.....	36
4.1	HASIL PENELITIAN.....	36
4.2	PEMBAHASAN .....	45
4.3	LIMITASI PENELITIAN .....	52
BAB V	.....	53
4.1	KESIMPULAN .....	53
4.2	SARAN .....	53
DAFTAR PUSTAKA	.....	54
LAMPIRAN	.....	59

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1.</b>	Komponen sistem pensinyalan IKK-I $\kappa$ B-NF $\kappa$ B.....	12
<b>Gambar 2.</b>	Skema aktivasi NF- $\kappa$ B jalur kanonik dan non-kanonik.....	14
<b>Gambar 3.</b>	Model seluler dari efek proinflamasi asap rokok melalui aktivasi jalur NF- $\kappa$ B .....	16
<b>Gambar 4.</b>	Kerangka teori.....	21
<b>Gambar 5.</b>	Kerangka kosep .....	22
<b>Gambar 6.</b>	Skema rancangan penelitian .....	24
<b>Gambar 7.</b>	Ilustrasi pemaparan asap rokok .....	29
<b>Gambar 8.</b>	Bagan alur penelitian .....	35
<b>Gambar 9.</b>	Diagram rata-rata kadar NF- $\kappa$ B tiap kelompok.....	40
<b>Gambar 10.</b>	Diagram rata-rata skor inflamasi dari pemeriksaan histopatologi paru.....	42
<b>Gambar 11.</b>	Hasil pemeriksaan histopatologi jaringan paru tikus.....	43
<b>Gambar 12.</b>	Mekanisme hidrogen dalam menghambat terjadinya Inflamasi.....	51
<b>Gambar 13.</b>	Beberapa alat dan bahan untuk perlakuan hewan coba.....	60
<b>Gambar 14.</b>	Penimbangan hewan coba .....	60
<b>Gambar 15.</b>	Pembuatan dan pemberian HRW.....	60
<b>Gambar 16.</b>	Pemaparan asap rokok.....	61
<b>Gambar 17.</b>	Penampakan makroskopik organ paru.....	61
<b>Gambar 18.</b>	Beberapa alat dan bahan untuk pemeriksaan kadar NF- $\kappa$ B p65 dengan metode ELISA .....	62
<b>Gambar 19.</b>	Pemeriksaan kadar NF- $\kappa$ B p65 dengan metode ELISA.....	62

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 1.</b>	Beberapa senyawa yang terkandung dalam asap rokok.....	8
<b>Tabel 2.</b>	Larutan standar NF- $\kappa$ B p65 .....	30
<b>Tabel 3.</b>	Penilaian skor inflamasi paru.....	32
<b>Tabel 4.</b>	Penilaian skor inflamasi paru.....	33
<b>Tabel 5.</b>	Konsentrasi hidrogen dalam HRW yang diberikan pada kelompok KPI .....	36
<b>Tabel 6.</b>	Konsentrasi hidrogen dalam HRW yang diberikan pada kelompok KPII .....	37
<b>Tabel 7.</b>	Hasil pemeriksaan kadar NF- $\kappa$ B p65 pada semua kelompok.....	39
<b>Tabel 8.</b>	Hasil skor inflamasi dari pemeriksaan histopatologi jaringan paru tikus pada semua kelompok.....	41

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b>	Persetujuan Etik .....	59
<b>Lampiran 2.</b>	Dokumentasi Penelitian .....	60
<b>Lampiran 3.</b>	Data dan Analisa Statistik.....	63

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 LATAR BELAKANG MASALAH

Merokok dapat menyebabkan penyakit dan kecacatan serta membahayakan hampir setiap organ tubuh. Merokok dapat menyebabkan kanker, penyakit jantung, stroke, penyakit diabetes, dan penyakit paru seperti penyakit paru obstruktif kronik (PPOK), yang meliputi emfisema dan bronkitis kronis. Merokok juga meningkatkan risiko tuberkulosis, penyakit mata tertentu, dan masalah sistem kekebalan tubuh, termasuk rheumatoid arthritis (CDC, 2014). World Health Organization (WHO) telah memperingatkan bahwa dalam dekade 2020-2030 tembakau akan membunuh 10 juta orang per tahun, dimana 70% diantaranya terjadi di negara-negara berkembang (WHO, 2007). Angka kejadian penyakit akibat rokok di Indonesia diperkirakan masih tinggi. Per 2016, 39,5% penduduk Indonesia berusia 15 tahun ke atas adalah perokok aktif; proporsi ini adalah 7,4% lebih tinggi dari rata-rata global (Holipah et al., 2020). Adapun data dari Global Adults Tobacco Survey-GATS memperlihatkan bahwa secara keseluruhan, prevalensi perokok tembakau tidak berubah secara signifikan dari tahun 2011 hingga 2021, yaitu 34,8% pada tahun 2011 dan 33,5% pada tahun 2021 (WHO, 2022).

Asap tembakau adalah aerosol kompleks yang terdiri dari lebih dari 5000 konstituen. Asap rokok juga merupakan sumber utama radikal bebas termasuk *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) seperti hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoksida ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), radikal hidroksil ( $\bullet\text{OH}$ ), dan nitrit oksida (NO). Zat reaktif ini dapat masuk ke dalam aliran darah dan menyebabkan stres oksidatif secara langsung, kemudian merangsang aktivasi *Nuclear Factor kappa B* (NF- $\kappa$ B), suatu faktor transkripsi yang terlibat dalam berbagai modulasi



sinyal termasuk inflamasi (Alharbi et al., 2021; Rom et al., 2012; Rom et al., 2013). Dengan demikian, tampaknya ROS dan RNS dalam asap rokok bertanggung jawab atas aktivasi NF- $\kappa$ B dan efek proinflamasi (Rom et al., 2013).

Aktivasi *Nuclear Factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) memicu peningkatan sitokin proinflamasi antara lain *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), *Interleukin-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ) dan *Interleukin-6* (IL-6). Sitokin proinflamasi tersebut pada akhirnya akan menyebabkan disfungsi endotel dan meningkatkan akumulasi monosit pada tunika intima arteri (Helianti, 2020). Mediator inflamasi dan faktor kemotatik lain yang diaktifkan oleh asap rokok seperti *Interleukin-8* (IL-8), *Monocyte Chemoattractant Peptide-1* (MCP-1), *Leukotriene B4* (LTB4), serta sekresi enzim proteolitik (khususnya MMP-9 dan MMP-12) juga berkontribusi terhadap kerusakan paru-paru. Di bawah pengaruh faktor kemotaksis yang disekresikan, khususnya IL-8 dan LTB4, neutrofil bergerak ke saluran pernapasan dan menyebabkan hiperstimulasi kelenjar mukus submukosa dan sel goblet (Angelis et al., 2014).

Pada tahun 2007, Ohsawa et al. pertama kali memberikan bukti bahwa hidrogen dapat secara selektif mereduksi  $\cdot$ OH dan ONOO $^-$  (Ohsawa et al., 2007). Studi lebih lanjut menunjukkan efek perlindungan yang serupa dari hidrogen pada cedera yang disebabkan oleh stres oksidatif di otak, hati, jantung, dan usus (Zhai et al., 2015). Penelitian klinis baru-baru ini telah mengungkapkan bahwa hidrogen merupakan faktor pengaturan fisiologis penting dengan efek perlindungan antioksidan, antiinflamasi dan antiapoptosis (Huang et al., 2010). Hidrogen telah memperlihatkan aktivitas antiinflamasi pada berbagai model cedera. Secara khusus, hidrogen menghambat cedera jaringan inflamasi yang diinduksi stres oksidatif melalui downregulasi sitokin proinflamasi dan inflamasi, seperti IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1, HMGB-1, NF- $\kappa$ B, dan prostaglandin E2 (Ge et al., 2017).

Hidrogen adalah gas diatomik yang tidak berwarna, tidak berbau, non-logam, tidak berasa dan sangat mudah terbakar dengan rumus molekul H<sub>2</sub>.

Hidrogen tidak diproduksi secara endogen dalam sel manusia, karena enzim dengan aktivitas hidrogenase tidak ada pada manusia. Namun, organisme anaerob di usus besar memperolehnya terutama dengan memecah karbohidrat. Lebih dari 12 liter hidrogen per hari secara terus menerus diproduksi dalam tubuh manusia dalam kondisi fisiologis normal, terutama oleh fermentasi karbohidrat yang tidak dapat dicerna oleh mikrobiota di usus besar. Setelah beredar, hidrogen hanya diekskresikan melalui paru-paru (Huang et al., 2010). Hidrogen dapat diberikan dalam berbagai cara, termasuk inhalasi, injeksi *hydrogen-rich saline* (HRS), minum *hydrogen-rich water* (HRW), mandi dengan HRW, atau menggunakan HRS sebagai obat tetes mata (Yang et al., 2020).

Sebuah penelitian tahun 2017 memperlihatkan pemberian *hydrogen-rich water* mengurangi kerusakan paru pada mencit SMP30-KO model PPOK yang diinduksi asap rokok dan menurunkan indeks destruktif, kerusakan oksidatif DNA, dan sel tua prematur pada paru-paru (Suzuki et al., 2017). Penelitian yang dilakukan Chen et al. pada tikus model cedera paru akibat asap rokok juga menemukan bahwa kadar TNF- $\alpha$ , konsentrasi malondialdehid (MDA), ekspresi *Nuclear Factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) p65, dan indeks apoptosis pada kelompok yang diberi *hydrogen-rich saline* menurun secara signifikan dibanding kelompok kontrol yang diberi saline biasa (Chen et al., 2015).

Meskipun gas hidrogen yang dihirup dapat bekerja lebih cepat, metode pemberian ini tidak praktis dalam kehidupan sehari-hari dan tidak cocok untuk dikonsumsi terus menerus sebagai pencegahan penyakit atau terapeutik (Ge et al., 2017). Adapun pemberian hidrogen melalui injeksi bersifat invasif, sulit diterima pasien, dan memiliki potensi risiko infeksi silang. Sehingga, *hydrogen water* mungkin bermanfaat karena merupakan cara yang portabel, mudah diberikan dan relatif aman (Tian et al., 2021).

Berdasarkan uraian-uraian di atas, telah diketahui manfaat hidrogen dari segi kesehatan. Namun, efek antiinflamasi hidrogen dalam sediaan *hydrogen-rich water* terhadap paru yang terpapar asap rokok masih belum banyak dilakukan. Selain itu, penelitian yang membandingkan efek antiinflamasi *hydrogen-rich water* berdasarkan total volume yang dikonsumsi perhari terhadap kadar NF- $\kappa$ B dan histopatologi paru tikus yang dipaparkan asap rokok sejauh pengetahuan peneliti belum pernah dilakukan. Sehingga, peneliti tertarik melakukan penelitian mengenai efek antiinflamasi *hydrogen-rich water* dengan menilai kadar NF- $\kappa$ B dan histopatologi paru yang terpapar asap rokok pada tikus.

## **1.2 RUMUSAN MASALAH**

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka permasalahan yang diangkat dalam penelitian ini adalah bagaimana efek antiinflamasi *hydrogen-rich water* terhadap paru yang terpapar asap rokok selama 28 hari pada tikus?

## **1.3 TUJUAN PENELITIAN**

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

### **1.3.1 TUJUAN UMUM**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiinflamasi *hydrogen-rich water* terhadap paru yang terpapar asap rokok selama 28 hari pada tikus.

### **1.3.2 TUJUAN KHUSUS**

1. Untuk mengetahui efek antiinflamasi *hydrogen-rich water* dengan menilai kadar NF- $\kappa$ B jaringan paru tikus yang terpapar asap rokok selama 28 hari.

2. Untuk mengetahui efek antiinflamasi *hydrogen-rich water* yang diamati melalui pemeriksaan histopatologi jaringan paru dengan menilai derajat inflamasi paru meliputi infiltrasi sel radang serta obstruksi lumen bronkiolar oleh mukus dan debris sel pada tikus yang terpapar asap rokok selama 28 hari.

#### **1.4. MANFAAT PENELITIAN**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat dari berbagai aspek bagi semua pihak yang terlibat baik bagi masyarakat, mahasiswa, dan peneliti lain.

##### **1. MANFAAT PENGEMBANGAN ILMU**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi sumber informasi ilmiah baik bagi mahasiswa, dosen dan masyarakat dalam memahami efek antiinflamasi *hydrogen-rich water* terhadap paru yang terpapar asap rokok pada tikus.

##### **2. MANFAAT PRAKTIS**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan referensi dan sebagai data awal penelitian selanjutnya mengenai efek antiinflamasi *hydrogen-rich water* terhadap paru yang terpapar asap rokok pada tikus.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 ASAP ROKOK

Asap rokok adalah aerosol heterogen yang dihasilkan oleh pembakaran tidak sempurna dari daun tembakau, serta terdiri dari tetesan padat dan cair dalam fase gas (Behr & Nowak, 2002; Lugg et al., 2022). Merokok tembakau yaitu menarik asap pembakaran tembakau ke dalam mulut, dan biasanya hingga ke paru-paru (West, 2017).

Merokok tembakau diperkirakan menyebabkan kematian dini sekitar 6 juta orang di seluruh dunia dan 96.000 di Inggris setiap tahun (West, 2017). Adapun angka kejadian penyakit akibat rokok di Indonesia diperkirakan masih tinggi. Per 2016, 39,5% penduduk Indonesia berusia 15 tahun ke atas adalah perokok aktif; proporsi ini adalah 7,4% lebih tinggi dari rata-rata global (Holipah et al., 2020). Data dari *Global Adults Tobacco Survey (GATS)* memperlihatkan bahwa secara keseluruhan, prevalensi perokok tembakau tidak berubah secara signifikan dari tahun 2011 hingga 2021, yaitu 34,8% pada tahun 2011 dan 33,5% pada tahun 2021 (WHO, 2022).

Merokok dapat menyebabkan kanker, penyakit jantung, stroke, diabetes, dan penyakit paru seperti penyakit paru obstruktif kronik (PPOK), yang meliputi emfisema dan bronkitis kronis. Merokok juga meningkatkan risiko tuberkulosis tertentu, penyakit mata, dan masalah sistem kekebalan tubuh, termasuk rheumatoid arthritis (CDC, 2014).

Lebih dari 4.500 zat telah diidentifikasi dalam asap rokok dan memiliki berbagai efek toksik, mutagenik, dan karsinogenik (Lugg et al., 2022). Beberapa senyawa yang terkandung dalam asap rokok dapat dilihat pada **Tabel 1**. Pembakaran satu batang rokok dapat menghasilkan sekitar 5000 mg gas (92%)

dan bahan-bahan partikel padat (8%) yang berupa droplet aerosol cair dan partikel tar padat submikroskopik (Fitria et al. 2014). Asap rokok mengandung zat kimia beracun, diantaranya nikotin, tar, plumbum (Pb), karbon monoksida, amonia, formalin, kadmium, aseton, metana, urea dan masih banyak lagi. Setiap batang rokok mengandung  $10^{14-16}$  reactive oxygen species (ROS) seperti superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), radikal hidroksil ( $\bullet OH$ ), dan peroksil radikal ( $ROO'$ ) (Firi et al., 2019).

Substansi toksik dalam bentuk gas, seperti karbon monoksida (CO), hidrogen sianida (HCN), oksida nitrogen, serta zat kimia yang volatil seperti nitrosamin dan formaldehid banyak terdapat dalam asap rokok. Zat-zat ini dapat memberikan efek toksiknya dengan mekanisme spesifik pada sel-sel atau unit-unit makromolekuler sel tertentu terutama pada sistem pernapasan (Fitria et al., 2014).

Sumber penting produk radikal bebas adalah nitrit oksida (NO) yang relatif stabil, yang ditemukan dalam asap rokok dalam konsentrasi tinggi. NO dioksidasi menjadi radikal nitrogen dioksida yang lebih reaktif oleh dioksigen. Radikal ini bereaksi dengan isoprena yang memiliki konsentrasi tinggi dalam asap rokok untuk membentuk berbagai radikal organik reaktif yang aktif secara biologis. Selain itu, ekstrak aqueous tar mengkatalisis pembentukan superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan radikal hidroksil ( $\bullet OH$ ), yang sangat beracun dengan adanya oksigen. Reaksi-reaksi ini mungkin karena adanya sistem siklus redoks dalam tar rokok. Saat ini, banyaknya efek buruk asap rokok terhadap kesehatan pernapasan dianggap secara langsung maupun tidak langsung terkait dengan tingginya jumlah radikal bebas yang sangat reaktif yang dihirup oleh perokok (Behr & Nowak, 2002).



**Tabel 1. Beberapa senyawa yang terkandung dalam asap rokok (Behr & Nowak, 2002)**

	Senyawa	Efek
Fase Partikel	Tar	Mutagenik/karsinogenik
	Nikotin	Stimulator atau depresor reseptor N-kolinergik parasimpatis (tergantung dosis)
	Hidrokarbon aromatic	Mutagenik/karsinogenik
	Fenol	Iritan, mutagenik/karsinogenik
	Kresol	Iritan, mutagenik/karsinogenik
	$\beta$ -Naftilamin	Mutagenik/karsinogenik
	Benzo(a)piren	Mutagenik/karsinogenik
	Katekol	Mutagenik/karsinogenik
	Indol	Akselerator tumor
	Karbazol	Akselerator tumor
Fase Gas	Karbon Monoksida	Mengganggu pengikatan oksigen ke hemoglobin
	Oksida dari nitrogen	Iritan, proinflamasi, siliotoksik
	Aldehid	Iritan, proinflamasi, siliotoksik
	Asam Hidrosianat	Iritan, proinflamasi, siliotoksik
	Acrolein	Iritan, proinflamasi, siliotoksik
	Amonia	Iritan, proinflamasi, siliotoksik
	Nitrosamine	Mutagenik/karsinogenik
	Hidrazin	Mutagenik/karsinogenik
Vinil Klorida	Mutagenik/karsinogenik	

## 2.2 HYDROGEN-RICH WATER

Hidrogen adalah gas diatomik yang tidak berwarna, tidak berbau, non-logam, tidak berasa dan sangat mudah terbakar dengan rumus molekul H<sub>2</sub>. Hidrogen tidak diproduksi secara endogen dalam sel manusia, karena enzim dengan aktivitas hidrogenase tidak ada pada manusia. Namun, organisme anaerob di usus besar memperoleh energinya terutama dengan memecah karbohidrat, utamanya dari fraksi polisakarida yang tidak tercerna dari sel tumbuhan dan pati, melalui hidrogenase dan menghasilkan hidrogen. Lebih dari 12 liter hidrogen per hari secara terus menerus diproduksi oleh mikrobiota di usus besar dalam tubuh manusia dalam kondisi fisiologis normal, terutama oleh

fermentasi karbohidrat yang tidak dapat dicerna. Setelah beredar, hidrogen hanya diekskresikan melalui paru-paru (Huang et al., 2010).

Hidrogen dalam tubuh manusia dieliminasi melalui tiga jalur: flatus, ekskresi pernapasan setelah penyerapan ke dalam sirkulasi sistemik dan metabolisme oleh mikrobiota kolon. Bakteri kolon dapat mengeliminasi hidrogen melalui tiga metode metabolisme. Mereka dapat mereduksi hidrogen menjadi hidrogen sulfida ( $4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$ ), mengubah hidrogen menjadi metana ( $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ ) atau menggunakan hidrogen untuk menghasilkan asetat ( $4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$ ). Yang menarik, penelitian terbaru mengungkapkan bahwa hidrogen dalam tubuh manusia dapat berfungsi sebagai modulator transduksi sinyal, seperti molekul sinyal gas lainnya (misalnya nitrit NO, CO dan H<sub>2</sub>S) dan hidrogen telah diusulkan sebagai 'molekul gas pensinyalan keempat' (Huang et al., 2010).

Pada tahun 2007, Ohsawa et al. menemukan bahwa H<sub>2</sub> memiliki sifat antioksidan yang melindungi otak dari cedera iskemik/reperfusi dan stroke dengan menetralkan radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) dan peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) secara selektif (Ohsawa et al., 2007). Sampai saat ini, efek pencegahan dan terapi H<sub>2</sub> telah diamati di berbagai organ, termasuk otak, jantung, pankreas, paru-paru, dan hati. Hidrogen memediasi stres oksidatif dan mungkin menunjukkan efek antiinflamasi dan antiapoptosis (Ge et al, 2017).

Hidrogen dapat diberikan dalam berbagai cara, termasuk inhalasi, injeksi *hydrogen-rich saline* (HRS), minum *hydrogen water* (HW), mandi dengan HW, dan menggunakan obat tetes mata HRS. Selain itu, produksi hidrogen usus oleh bakteri dapat ditingkatkan melalui pemberian acarbose dan laktulosa secara oral (Yang et al., 2020). Liu C et al. menunjukkan bahwa konsentrasi hidrogen mencapai puncak 5 menit setelah pemberian oral dan intraperitoneal, dan hanya dalam 1 menit setelah pemberian intravena (Liu C et al., 2014).

Meskipun gas hidrogen yang dihirup dapat bekerja lebih cepat, metode pemberian ini tidak praktis dalam kehidupan sehari-hari dan tidak cocok untuk dikonsumsi terus menerus sebagai pencegahan penyakit atau terapeutik (Ge et al., 2017). Adapun pemberian hidrogen melalui injeksi bersifat invasif, sulit diterima pasien, dan memiliki potensi risiko infeksi silang. Sehingga, *hydrogen water* mungkin bermanfaat karena merupakan cara yang portabel, mudah diberikan dan relatif aman (Tian et al., 2021).

Air hidrogen dapat dibuat dengan beberapa cara, antara lain melarutkan hidrogen hasil elektrolisis ke dalam air murni, melarutkan hidrogen ke dalam air bertekanan tinggi, dan mereaksikan magnesium dengan air ( $Mg + 2H_2O \rightarrow Mg(OH)_2 + H_2$ ) (Huang et al., 2010).  $H_2$  dapat dilarutkan dalam air hingga 0,8 mM (1,6 mg/L) di bawah tekanan atmosfer pada suhu kamar tanpa mengubah pH, dan kadar ini efektif memperbaiki obesitas pada model tikus (Ge et al., 2017).

Penelitian Purbo et al. melaporkan bahwa pemberian HRW sebanyak 10 ml dua kali sehari selama 5 hari pada tikus Wistar dapat menurunkan jumlah MDA dan makrofag pasca eksisi kulit (Purbo et al., 2020). Pemberian HRW dengan dosis 3 ml selama 10 hari pada model tikus peritonitis akut, memperlihatkan bahwa HRW dapat meringankan keparahan peritonitis akut dan mengurangi ekspresi NF- $\kappa$ B di jaringan peritoneum (Zhang et al., 2014). HRW yang diberikan sebanyak 1.2 ml tiga kali sehari memperlihatkan efek protektif terhadap cedera hati kronis yang diinduksi EtOH dan mengaktifkan enzim antioksidan melawan stres oksidatif pada tikus (Lin et al., 2017).

Baru-baru ini, Badan Pengawas Obat dan Makanan AS (FDA) mengakui gas hidrogen ( $H_2$ ) sebagai bahan tambahan makanan ketika digunakan dalam air minum atau minuman dan dinyatakan secara umum aman (Sim et al., 2020). Namun, meskipun pemberian HW oral termasuk aman dan nyaman, mengontrol konsentrasi  $H_2$  yang diberikan bisa menjadi sulit, karena menguap dalam air dari

waktu ke waktu dan dapat hilang sebelum diserap di saluran pencernaan (Ge et al., 2017).

### **2.3 NUCLEAR FACTOR KAPPA B**

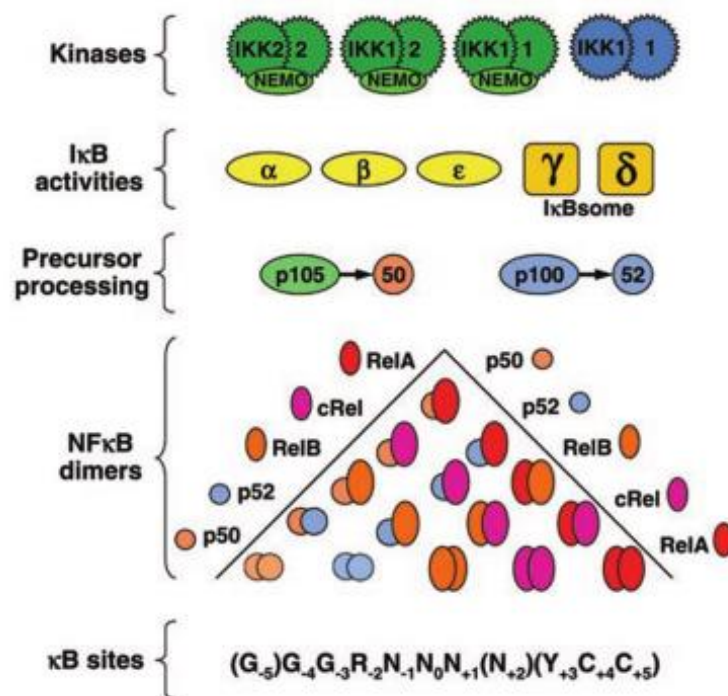
*Nuclear Factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) merupakan suatu faktor transkripsi, yang terlibat dalam inflamasi, respon imun host, adhesi sel, sinyal pertumbuhan, proliferasi sel, diferensiasi sel, dan pertahanan apoptosis. Sen dan Baltimore pertama kali mengisolasi dan mengidentifikasi NF- $\kappa$ B pada tahun 1986, yang merupakan faktor transkripsi baru yang melekat pada sel limfosit B teraktivasi di situs penambah imunoglobulin. Kemudian, penelitian NF- $\kappa$ B secara bertahap berkembang, menunjukkan bahwa ia aktif dalam berbagai bioproses dan tidak terbatas pada sel limfosit B. NF- $\kappa$ B dapat mengubah banyak aspek biologis sel yang terkait dengan profil ekspresi ratusan gen target, yang transkripsinya diatur oleh perilaku transaktivasi atau transrepresinya (Alharbi et al., 2021).

Aktivasi NF- $\kappa$ B mengatur ekspresi sekitar 500 gen, yang sebagian besar berbahaya bagi tubuh manusia. Gen antiapoptosis, gen pengaturan diri, gen faktor pertumbuhan, gen terkait angiogenesis, dan molekul adhesi sel semuanya diatur secara transkripsi oleh NF- $\kappa$ B dan terlibat dalam modulasi gen yang terkait dengan imunosurveilans dan inflamasi. Sinyal stres, radikal bebas, asap rokok, agen infeksi, karsinogen, dan endotoksin bertanggung jawab atas aktivasi NF- $\kappa$ B (Alharbi et al., 2021).

Keluarga faktor transkripsi NF- $\kappa$ B terdiri dari lima protein, diantaranya Rel (cRel), RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50 dan prekursornya p105), dan NF- $\kappa$ B2 (p52 dan prekursornya p100). Protein NF- $\kappa$ B memiliki domain homologi Rel, N-terminal, yang sangat terkonservasi dan memungkinkan pengikatan DNA, dimerisasi dengan anggota keluarga NF- $\kappa$ B lainnya, serta asosiasi dengan inhibitor yaitu protein I $\kappa$ B. Subunit cRel, RelA, dan RelB memiliki domain transaktivasi terminal-

C yang memberikan aktivitas transkripsi, dan meskipun p50 dan p52 tidak memiliki domain transaktivasi, mereka dapat mempromosikan transkripsi dengan dimerisasi dengan subunit NF- $\kappa$ B yang mengandung domain transaktivasi (Alvira, 2014).

Sistem pensinyalan NF- $\kappa$ B terdiri dari heterodimer NF- $\kappa$ B atau homodimer dari polipeptida yang mengandung domain homologi Rel (RHD) dan protein penghambat stoikiometrinya, I $\kappa$ Bs. RHD dalam lima monomer – RelA, RelB, cRel, p50 dan p52 – memediasi dimerisasi, pengikatan DNA, interaksi dengan I $\kappa$ Bs dan translokasi nukleus. Lima monomer membentuk 15 dimer potensial. Generasi semua monomer diatur secara transkripsi, tetapi p50 dan p52 juga diatur oleh pemrosesan protein prekursor masing-masing, yaitu p105 dan p100 (Gambar 1). Dengan demikian, berbagai kompleks dimerik NF- $\kappa$ B diekspresikan secara spesifik berdasarkan tipe sel dan stimulusnya. Beberapa dimer yang penting secara fisiologis adalah RelA:p50, cRel:p50 dan RelB:p52 (Shih et al., 2011).

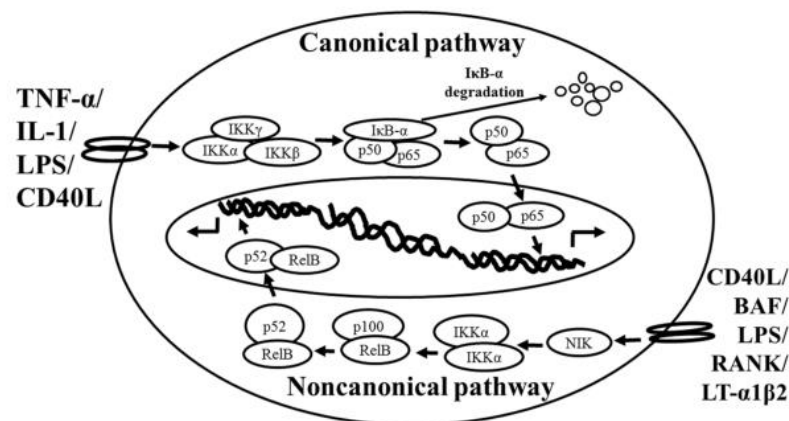


**Gambar 1.** Komponen sistem pensinyalan IKK-I $\kappa$ B-NF $\kappa$ B (Shih et al., 2011).

Terdapat dua jalur pensinyalan *Nuclear Factor kappa B*, yaitu jalur kanonik yang memediasi respon inflamasi, dan jalur nonkanonik yang terlibat dalam diferensiasi dan pematangan sel imun serta organogenesis limfoid sekunder (Gambar 2). Respon inflamasi dan imun yang cepat dan reversibel biasanya terjadi melalui aktivasi jalur kanonik, sedangkan respons perkembangan yang lebih lambat dan ireversibel biasanya terjadi melalui jalur nonkanonik (Shih et al., 2011).

Jalur NF- $\kappa$ B kanonik dapat diaktifkan oleh berbagai macam rangsangan, termasuk TNF- $\alpha$ , IL-1, *lipopolysaccharide* (LPS), dan *toll-like receptors ligand* (seperti CD40L). Inisiasi jalur kanonik melalui TLR atau pensinyalan reseptor sitokin bergantung pada kompleks inhibitor of  $\kappa$ B kinase (IKK), yang terdiri dari kinase IKK $\alpha$  dan IKK $\beta$ , dan subunit pengatur IKK $\gamma$  (NEMO). IKK yang diaktifkan memfosforilasi subunit penghambat I $\kappa$ B $\alpha$ , sehingga I $\kappa$ B $\alpha$  terdegradasi. Dimer NF- $\kappa$ B yang dilepaskan (p50-p65) bertranslokasi ke nukleus dan berikatan dengan situs  $\kappa$ B kromosom untuk menginduksi transkripsi gen target NF- $\kappa$ B. Jalur non-kanonik diaktifkan oleh rangsangan spesifik termasuk *B cell activating factor* (BAF) milik reseptor keluarga TNF, LPS, lymphotoxin (LT)  $\alpha$ 1 $\beta$ 2, *receptor activator of NF- $\kappa$ B* (RANK), dan CD40L. Ketika jalur non-kanonikal ini distimulasi, NIK diaktifkan dan merekrut IKK $\alpha$  ke kompleks p100 untuk memfosforilasi p100, sehingga terjadi ubiquitinasi p100. P52, produk pemrosesan p100, menghasilkan kompleks p52/RelB NF- $\kappa$ B teraktivasi, yang mampu bertranslokasi ke nukleus dan menginduksi ekspresi gen (Shih et al., 2015).





**Gambar 2. Skema aktivasi NF-κB jalur kanonik dan non-kanonik (Shih et al., 2015)**

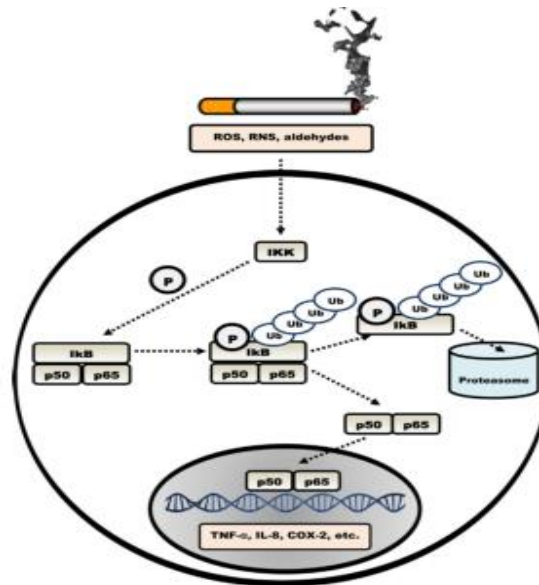
Sitokin proinflamasi, protein virus, lipopolisakarida, bakteri, limfosit T, dan mitogen sel limfosit B, RNA untai ganda, stres oksidatif, pH ekstrem, asap rokok, asbes, *heat shock protein 60*, paparan timbal, partikel silika, asam lemak, logam, serta agen kemoterapi adalah stimulus yang bertanggung jawab untuk aktivasi NF-κB dan pada patofisiologi penyakit inflamasi paru. Peradangan adalah komponen kunci dari banyak gangguan pernapasan umum, seperti asma, PPOK, kanker paru-paru, dan fibrosis paru serta pada penyakit menular seperti pneumonia, TBC, dan COVID-19. Antioksidan, RNA/DNA kecil, peptida, polipeptida, protein mikroba dan virus semuanya telah dikenal sebagai inhibitor jalur aktivasi NF-κB (Alharbi et al, 2021).

## **2.4 PENGARUH ASAP ROKOK TERHADAP AKTIVASI NF-κB DAN INFLAMASI PARU**

Asap tembakau adalah aerosol kompleks yang terdiri lebih dari 5000 konstituen (Rom et al., 2013). Salah satu efek utama asap rokok pada saluran pernapasan adalah menginduksi inflamasi. Reaksi inflamasi ini meliputi ciliototoxicity, peningkatan sekresi mukus, dan akumulasi sel-sel inflamasi pada saluran pernapasan. Beberapa konstituen asap tembakau bersifat iritan,

sedangkan konstituen lain seperti asam, amonia, dan aldehida dapat memberikan efek toksik pada epitel saluran napas sehingga menyebabkan kerusakan atau kematian sel serta peradangan lokal. Selain itu, fungsi clearance normal dari epitel terganggu oleh efek ciliotoxic dari senyawa-senyawa seperti nitrogen oksida, aldehid, asam hidrosianid, akrolein, dan amonia (Tabel 1). Bersama dengan hiperplasia sel goblet dan peningkatan produksi mukus, penurunan clearance menginduksi retensi mukus di saluran napas, dan menjadi predisposisi untuk kolonisasi bakteri dan infeksi, yang pada akhirnya menyebabkan eksaserbasi inflamasi (Behr & Nowak, 2002).

Asap rokok juga merupakan sumber utama radikal bebas termasuk ROS dan RNS seperti hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ), radikal hidroksil ( $\bullet OH$ ) dan nitrit oksida (NO). Zat reaktif ini dapat memasuki aliran darah dan memicu stres oksidatif langsung. Stres oksidatif diketahui merangsang aktivasi NF- $\kappa$ B. Selain itu, asap rokok merupakan sumber paparan aldehida beracun. Setelah pirolisis, gula dalam tembakau dipecah menjadi campuran asam organik dan berbagai aldehida beracun seperti kromonaldehida dan akrolein (Rom et al., 2012). Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa aldehida ini dapat mempengaruhi respon inflamasi dengan aktivasi NF- $\kappa$ B. Adapun proses aktivasi NF- $\kappa$ B oleh asap rokok yang disimpulkan oleh Rom et al. (Gambar 3), yaitu sel inflamasi dan sel sistem saluran napas yang terpapar asap rokok dan komponennya termasuk ROS, RNS dan aldehida menyebabkan aktivasi IKK. IKK yang teraktivasi memfosforilasi I $\kappa$ B, yang menyebabkan degradasi proteasomalnya dan memungkinkan translokasi NF- $\kappa$ B dari sitoplasma ke dalam nukleus kemudian mengatur ekspresi gen proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-8 dan COX-2. Mekanisme ini dapat menjelaskan dampak proinflamasi dari asap rokok yang dimediasi oleh jalur NF- $\kappa$ B (Rom et al., 2013).



**Gambar 3. Model seluler dari efek proinflamasi asap rokok melalui aktivasi jalur NF-κB (Rom et al., 2013)**

Pensinyalan NF-κB paru yang berkelanjutan menginduksi peradangan kronis dan emfisema. Peningkatan penanda aktivasi jalur NF-κB telah ditemukan di makrofag dahak selama eksaserbasi PPOK dan biopsi bronkial pasien stabil dengan PPOK. TLR pada permukaan sel mendeteksi Lipopolisakarida yang terhirup ke dalam alveoli paru, menyebabkan reaksi imun terhadap patogen dalam makrofag dan perkembangan mediator inflamasi sebagai respons terhadap patogen. TLR (TLR4, TLR2) diturunkan regulasinya pada tikus model COPD, sementara NF-κB p65 dan IκB terfosforilasi diregulasi. Efek kurkumin pada PPOK akibat asap rokok diselidiki oleh Qiuping Li et al. Mereka menyimpulkan bahwa modulasi jalur pensinyalan PPAR $\gamma$ -NF-κB terjadi karena peradangan yang disebabkan oleh asap tembakau (Alharbi et al, 2021).

Peningkatan sitokin-sitokin proinflamasi akibat dari aktivasi NF-κB seperti *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), *interleukin-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ) dan *interleukin 6* (IL-6), menyebabkan aktivasi endotel, ditandai dengan peningkatan ekspresi molekul adhesi seperti *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) dan *intracellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1) pada permukaan endotel, sehingga menurunkan

sifat *anti-adhesive* endotel. Keadaan ini merupakan tanda terjadinya disfungsi endotel. VCAM-1 dan ICAM-1 berperan dalam aterogenesis melalui adhesi monosit dan limfosit ke endotel sehingga meningkatkan akumulasi monosit pada tunika intima arteri (Helianti, 2020).

Oksidan dalam asap rokok telah terbukti menginduksi sekuestrasi neutrofil dan monosit di paru-paru yang juga menembus endotelium dan dapat ditemukan dalam jumlah yang meningkat dalam cairan *bronchoalveolar lavage* (BAL). Oksidan dapat menonaktifkan antiprotease penting pada paru, seperti inhibitor  $\alpha$ -proteinase, dan inhibitor leukoprotease sekretori. Protease lain diaktifkan oleh oksidasi. Secara bersama-sama, efek oksidan ini menghasilkan ketidakseimbangan protease/antiprotease yang mendukung aktivitas proteolitik yang juga menginduksi kerusakan jaringan dan inflamasi. Produk proteolitik dari sel inflamasi, jika tidak diimbangi dengan sistem antiprotease protektif, menyebabkan cedera bronkus dan kerusakan struktur alveolar (Behr & Nowak, 2002).

Mediator inflamasi dan faktor kemotatik lain yang diaktifkan oleh asap rokok seperti interleukin IL-8, MCP-1, LTB<sub>4</sub> serta sekresi enzim proteolitik (khususnya MMP-9 dan MMP-12) juga berkontribusi terhadap kerusakan paru-paru. Di bawah pengaruh faktor kemotaksis yang disekresikan, khususnya IL-8 dan LTB<sub>4</sub>, neutrofil bergerak ke saluran pernapasan kemudian menyebabkan hiperstimulasi kelenjar mukus submukosa dan sel goblet (Angelis et al., 2014). Neutrofil mensekresi protease serin, salah satunya neutrofil elastase yang dapat merusak epitel pernapasan dan meningkatkan produksi mukus oleh sel goblet. Hal ini kemudian meningkatkan IL-8, yang dengan sendirinya merupakan *chemoattractant* ampuh untuk neutrofil (Behr & Nowak, 2002; Vlahos & Bozinovski, 2014).

## **2.5 PENGARUH HIDROGEN TERHADAP PENURUNAN AKTIVASI NF- $\kappa$ B DAN INFLAMASI PARU**

Sejak Ohsawa et al. menemukan bahwa hewan yang menghirup hidrogen dosis kecil (2%, 35 menit) dapat secara signifikan memperbaiki cedera otak iskemia-reperfusi, hidrogen, telah terbukti menjadi antioksidan baru. Antioksidan ini melalui mekanisme pengurangan selektif radikal hidroksil ( $\bullet$ OH) dan peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), yang paling sitotoksik dari spesies oksigen reaktif (ROS) dan spesies nitrogen reaktif (RNS), sambil mempertahankan reaksi oksidasi-reduksi metabolik dan ROS lainnya, seperti anion superoksida dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  yang kurang sitotoksik (Huang et al., 2010; Yang et al., 2020). Dalam beberapa tahun terakhir, sejumlah penelitian juga menemukan hidrogen memiliki efek yang baik pada regulasi antiinflamasi dan antiapoptosis jalur transduksi sinyal selain efek antioksidan selektif (Huang, 2010).

Hidrogen memiliki keunggulan unik dalam aplikasi klinis. Zat ini secara efektif menembus biomembran untuk mencapai inti sel dan mitokondria, dan dapat dengan mudah menembus sawar darah-otak dengan difusi gas, sementara sebagian besar senyawa antioksidan tidak bisa (Ge et al., 2017).

Kerusakan eksogen karena faktor-faktor seperti radiasi menginduksi produksi ROS seluler yang berlebihan. Hidrogen menembus biomembran dan efektif mencapai inti sel, kemudian secara selektif menangkal  $\bullet$ OH dan  $\text{ONOO}^-$  dan dengan demikian mencegah kerusakan DNA. Hidrogen juga menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi dan inflamasi, seperti IL- $1\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1, dan HMGB-1, dan faktor proapoptosis, seperti caspase-3, caspase-12, caspase-8 dan Bax.  $\text{H}_2$  meningkatkan ekspresi faktor antiapoptosis, seperti Bcl-2 dan Bcl-xL (Ge, et al., 2017).

Hidrogen telah menunjukkan aktivitas antiinflamasi di berbagai model cedera. Pada tahap awal inflamasi,  $\text{H}_2$  dapat mengurangi infiltrasi neutrofil dan

makrofag M1, serta pelepasan faktor proinflamasi dengan menurunkan regulasi ekspresi *intercellular cell adhesion molecule-1* (ICAM-1), *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GMCSF), dan *granulocyte colony-stimulating factor* (GCSF) (Yang et al., 2020).

Hidrogen menghambat cedera jaringan inflamasi yang diinduksi stres oksidatif melalui downregulasi sitokin proinflamasi dan inflamasi, seperti IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1, HMGB-1, *Nuclear Factor kappa B* (NF- $\kappa$ B), dan prostaglandin E<sub>2</sub>. H<sub>2</sub> meningkatkan tingkat kelangsungan hidup dan mengurangi kerusakan organ tikus inseptik dengan menurunkan regulasi sitokin proinflamasi awal dan akhir dalam serum dan jaringan. Hal ini menunjukkan potensi penggunaan H<sub>2</sub> sebagai agen terapeutik untuk kondisi yang berhubungan dengan sepsis terkait peradangan/sindrom disfungsi organ multipel. Selain itu, H<sub>2</sub> yang dilepaskan dari bakteri usus telah diusulkan dapat menekan peradangan (Ge et al., 2017).

Beberapa penelitian sebelumnya juga memperlihatkan adanya efek menguntungkan dari hidrogen terhadap cedera atau inflamasi pada paru. Huang et al. menganalisis cedera paru-paru yang disebabkan oleh iskemik/reperfusi usus pada model tikus, dan melaporkan bahwa pemberian *hydrogen-rich saline* menurunkan infiltrasi neutrofil, peroksidasi membran lipid, aktivasi NF- $\kappa$ B serta kadar sitokin proinflamasi di jaringan paru-paru dibandingkan dengan tikus yang diberi saline (Huang et al., 2010).

Zhai et al. yang melakukan penelitian tentang *hydrogen-rich saline* terhadap cedera paru akut yang diinduksi dengan tusukan dan ligasi cecal (CLP), menyimpulkan bahwa bahwa injeksi peritoneal *hydrogen-rich saline* memperbaiki histologis paru dan nilai fungsional pada model tikus acute lung injury (ALI) yang diinduksi CLP dimana infiltrasi neutrofil berkurang 8 jam setelah CLP, serta secara signifikan menghambat aktivasi p-p38 dan NF- $\kappa$ B sambil menekan produksi beberapa mediator proinflamasi (Zhai et al, 2015).

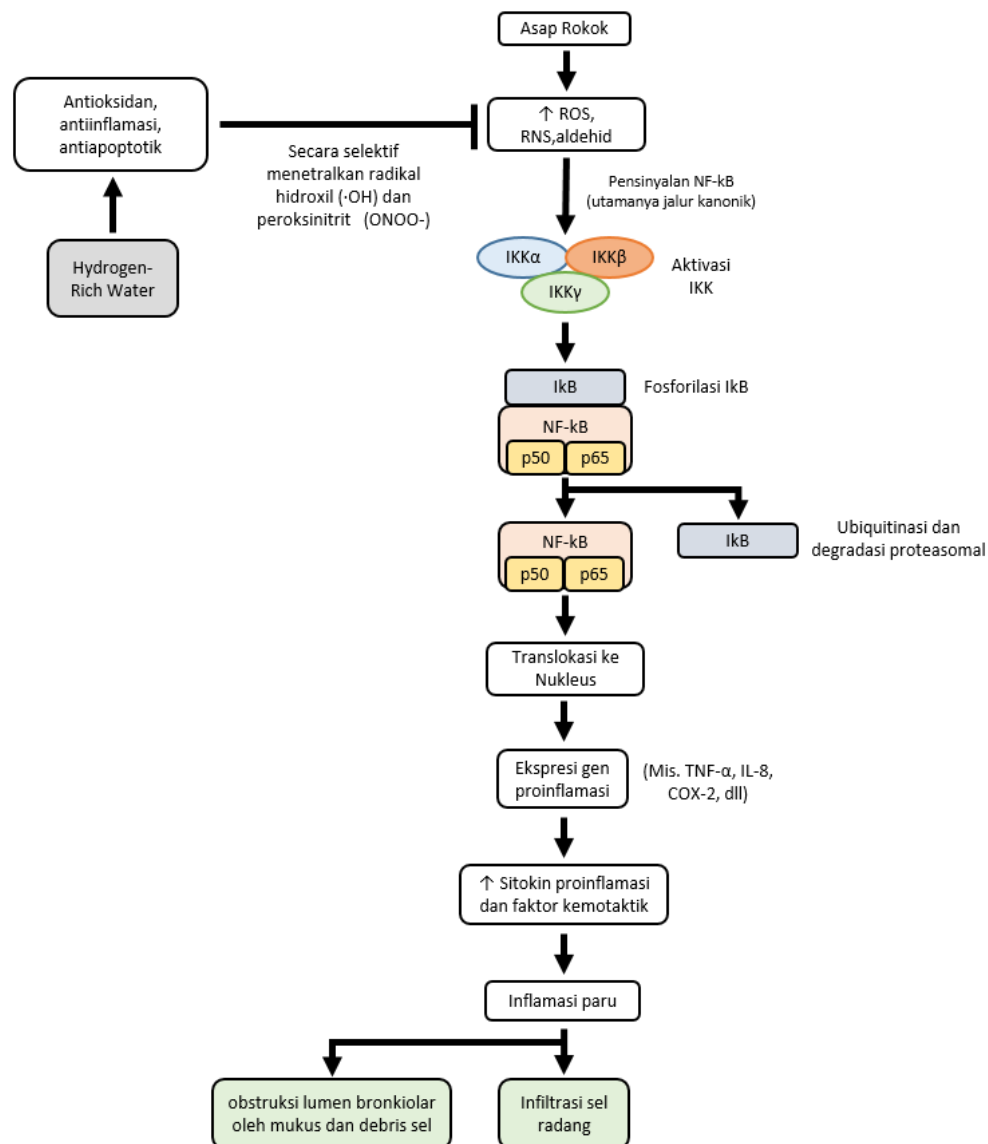
Xiao et al. melaporkan bahwa *hydrogen-rich saline* yang diberikan melalui intraperitoneal dengan dosis yang lebih tinggi (10 mL/kg) lebih menurunkan aktivasi NF- $\kappa$ B p65 yang terfosforilasi pada tikus model asma dibanding yang diberi dosis lebih rendah (5 mL/kg). Hal ini menunjukkan bahwa efek *hydrogen-rich saline* pada peradangan saluran napas dan remodeling paru bergantung pada dosis. (Xiao et al., 2013).

Pemberian *hidrogen-rich saline* intraperitoneal secara efektif mengurangi kerusakan paru-paru yang disebabkan oleh cedera inhalasi, melemahkan induksi sitokin proinflamasi ke dalam jaringan paru-paru, meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, menurunkan tingkat peroksidasi lipid, dan dikaitkan dengan penghambatan apoptosis. Chen et al. mengamati peningkatan ekspresi NF- $\kappa$ B p65 di paru-paru setelah cedera inhalasi asap, sedangkan pemberian HRS secara signifikan memperlambat keadaan ini. Sehingga, diusulkan bahwa HRS dapat memperbaiki cedera paru-paru sebagian melalui penghambatan aktivasi NF- $\kappa$ B untuk mengatur ekspresi gen terkait (Chen et al., 2015).

Sebuah penelitian tahun 2017 memperlihatkan pemberian *hydrogen-rich water* mengurangi kerusakan paru pada mencit jantan SMP30-KO model PPOK yang diinduksi asap rokok dan menurunkan indeks destruktif, kerusakan oksidatif DNA, dan sel tua prematur pada paru-paru (Suzuki et al., 2017). Studi pada tahun 2011 oleh Liu S, et al. pada model tikus jantan dengan cedera paru akut yang diinduksi paraquat, melaporkan bahwa kelompok tikus yang diberi HW menunjukkan derajat cedera paru yang lebih rendah secara signifikan, seperti volume efusi pleura yang lebih kecil, akumulasi protein dan jumlah sel total yang lebih sedikit di saluran udara, dan kelainan morfologi yang lebih sedikit, jika dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi HW (Liu S, et al., 2011). Menggunakan model tikus yang sama, studi Sato et al. menunjukkan bahwa gambaran histologis infiltrasi sel inflamasi dan fibrosis relatif lebih rendah pada

kelompok yang diberi HW (Sato et al., 2015). Penelitian lain pada manusia menunjukkan bahwa konsumsi 1,5 L HRW selama 4 minggu menurunkan angka kematian sel dan respons inflamasi dengan memodulasi jaringan transkripsi pensinyalan TLR-NF- $\kappa$ B (Sim, et al., 2020).

## 2.6 KERANGKA TEORI



Keterangan :

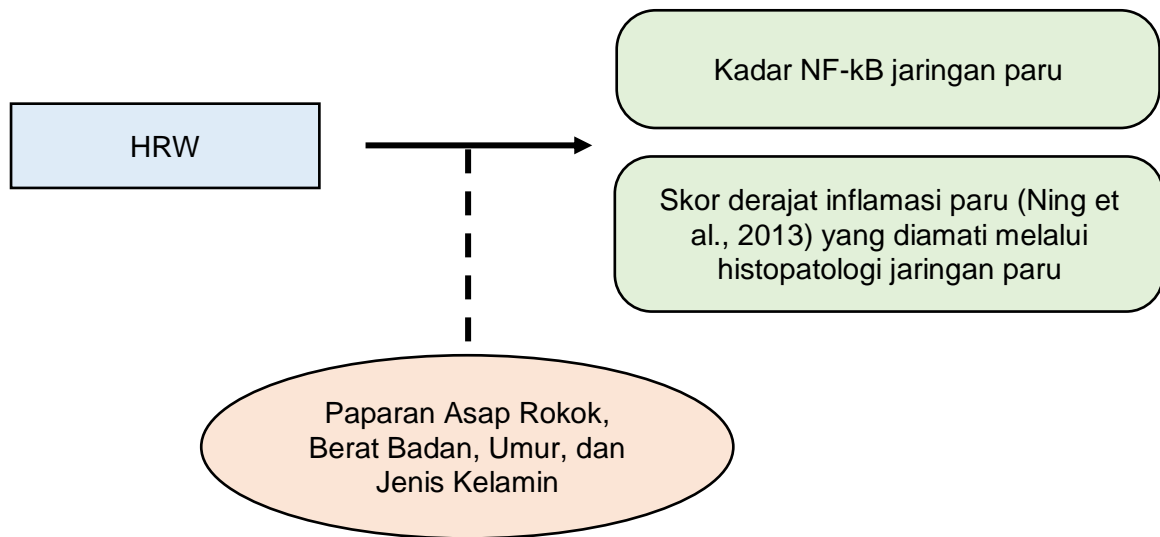
→ : Menyebabkan

⊣ : Menghambat

**Gambar 4. Kerangka Teori**



## 2.7 KERANGKA KONSEP



**Gambar 5. Kerangka Konsep**

### Keterangan:

- : Variabel independen
- : Variabel dependen
- : Variabel kontrol

## 2.8 HIPOTESIS

### 1. Hipotesis Nol (H<sub>0</sub>)

Tidak terdapat efek antiinflamasi dari *hydrogen-rich water* terhadap paru yang terpapar asap rokok pada tikus.

### 2. Hipotesis Alternatif (H<sub>A</sub>)

Terdapat efek antiinflamasi dari *hydrogen-rich water* terhadap paru yang terpapar asap rokok pada tikus.