

Efek Hirupan Benzene (C₆H₆) pada Sel Darah Merah dan Sel Darah Putih Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar

*Indra Setiawan¹, Wahyu Estu Septyah Margowati², Desy Andari³, Miftha Churochman⁴

¹Ilmu Kedokteran Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala Leher Fakultas Kedokteran Univ. Muhammadiyah Malang

²Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang

³Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang

Universitas Muhammadiyah Malang

⁴Staff Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang

*) Correspondence Author

Indra Setiawan

Ilmu Kedokteran Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala Leher

Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang

Jl. Bendungan Sutami No. 188A, 65145, Malang, Indonesia, (0341) 551149

indra@umm.ac.id

Abstract

In industry, "benzene" is frequently employed as a basic or compound substance. Exposure to "benzene" has hematotoxic effects on blood cell values, such as pancytopenia. In cases of cytopenia that cannot be explained, a blood smear evaluation is usually employed as a confirmation test and extra diagnostic help. The purpose of this study was to see how benzene inhalation affected blood smear examination in white male rats (*Rattus norvegicus*) of the Wistar strain. True experimental design with simply a post-test control group. A total of 20 rats were separated into four groups. The non-benzene inhalation exposure group (K-) served as the negative control. The treatment groups ("P1, P2, P3") were given benzene inhalation at concentrations of 1, 10, and 100 parts per million, respectively. The exposure lasted 28 days, 8 hours per day, 5 days per week. The results were achieved by counting rat blood cells and examining their morphology under a microscope, after which an average number was calculated. Research and Discussion According to the ANOVA and Kruskal-Wallis test, the number of neutrophils and monocytes increased dramatically, whereas lymphocytes declined. Each group had a varied number of eosinophils, although the difference was not statistically significant. In the group exposed to 100 ppm benzene, the "Bonferoni and Mann-Whitney" post hoc test revealed a significant rise in the number of neutrophil segments and a decrease in the number of lymphocytes "(p0.05)". In the group exposed to 10 ppm benzene, there was a substantial rise in monocytes (p 0,05). The morphology of erythrocytes, leukocytes, and platelets yielded no aberrant results. Benzene inhalation exposure significantly affects the number of neutrophils segments, lymphocytes and monocytes, but has no effect on the number of other types of leukocytes. No abnormal morphology was found in erythrocyte, leukocyte, and platelets.

Keywords: benzene, blood smear evaluation, inhalation, rat.

Abstrak

Penggunaan benzena sangat banyak digunakan pada aktivitas industri jadi bahan dasar atau bahan campuran. Paparan benzena menyebabkan efek hematotoksik berupa pansitopeni. Evaluasi hapusan darah biasa digunakan sebagai pemeriksaan konfirmasi (tes konfirmasi) dan alat bantu diagnosis tambahan dalam kasus sitopeni yang tidak dapat dijelaskan. Mengetahui dampak paparan benzena perinhalasi pada evaluasi hapusan darah tikus putih jantan. Metode: Penelitian eksperimental dengan “*post-test control only group design*”. Tikus putih jantan berjumlah 20 ekor terbagi 4 kelompok. Kelompok “kontrol negatif (K⁻)” ialah kelompok tanpa paparan inhalasi benzena. Kelompok perlakuan (“P1, P2, P3”) diberikan paparan inhalasi benzena beriringan 1, 10, 100 ppm. Paparan diberikan sampai 8 jam/hari 5 hari/minggu selama 28 hari. Penelitian ini menghitung jumlah sel darah tikus serta mengevaluasi morfologinya menggunakan mikroskop serta tersaji jadi nilai rata-rata. Hasil uji “ANOVA” dan Kruskal-Wallis menunjukkan adanya perbedaan yang artinya jumlah rerata leukosit jenis neutrofil segmen, limfosit dan monosit. Terdapat perbedaan jumlah rerata eosinofil pada tiap kelompok, tetapi tidak bermakna secara statistik. Hasil uji post hoc Bonferoni dan Mann-Whitney didapatkan peningkatan jumlah neutrofil segmen dan penurunan jumlah limfosit ($p < 0,05$) di kelompok yang dipapar benzena 100 ppm dan didapatkan peningkatan monosit ($p < 0,05$) di kelompok yang dipapar benzena 10 ppm. Evaluasi morfologi eritrosit, leukosit dan trombosit tidak didapatkan hasil yang abnormal. Kesimpulan: Paparan inhalasi benzena berpengaruh secara signifikan terhadap jumlah neutrofil segmen, limfosit dan monosit, namun tidak berpengaruh terhadap jumlah leukosit jenis lainnya pada tikus putih jantan. Tidak ditemukan morfologi yang abnormal pada eritrosit, leukosit, dan trombosit.

Kata Kunci: benzena, evaluasi hapusan darah, inhalasi, tikus.

PENDAHULUAN

Anemia aplastik adalah kegagalan hematopoietik dengan tanda pansitopenia serta hipoplasia sumsum tulang. Insiden anemia aplastik lebih tinggi di Asia daripada di Eropa juga Amerika Serikat. Dua hingga 6 kasus per 1 juta orang per tahun, dan insiden puncak di usia kerja adalah 15 sampai 25 tahun. Anemia aplastik banyak dikaitkan bersama terkena bahan kimia serta obat-obatan. Bahan kimia yang diketahui dapat menyebabkan anemia aplastik adalah benzena [1].

“Benzena” ialah senyawa hidrokarbon aromatik yang banyak dipakai di industri. *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) telah menemukan bahwa sekitar 9,8 juta pekerja terpapar benzena. Terutama dalam pembuatan cat, perekat, degreaser, bahan pewarna, polimer, serta tekstil, tinta cetak, pertanian serta obat-obatan. *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) memperkirakan, “sekitar 238.000 pekerja di Amerika Serikat terpapar benzena selama penyulingan minyak, penyimpanan dan transportasi bensin, produksi plastik, dan produksi karet” [2]. Di Indonesia, 68,9% kasus anemia ditemukan di pekerja tubuh yang memakai benzena jadi pelarut cat [3].

Diagnosis pertama anemia aplastik adalah ditemukannya pansitopenia di hitung darah lengkap/*complete blood count* (CBC). Karena gejala pansitopenia ini, apusan darah harus diperiksa untuk menentukan apakah ada kelainan morfologis [4].

Berdasarkan penjelasan di atas, maka diteliti tentang dampak paparan benzena inhalasi pada evaluasi hapusan darah tepi tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar.

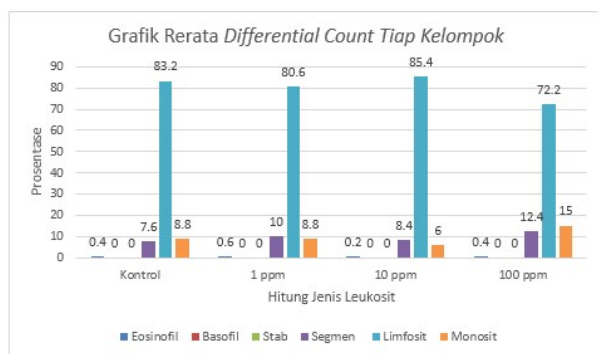
METODE

Studi ini (ter)masuk penelitian eksperimental dengan *post-test control only group design*. Sebanyak 20 ekor tikus putih jantan terbagi ke empat kelompok. Kelompok kontrol negatif (K) adalah kelompok yang tidak menghirup benzena. Kelompok perlakuan (P1, P2, P3) diberi paparan benzena 1, 10, dan 100 ppm. Paparan adalah 8 jam/hari, 5 hari/minggu selama 28 hari. Hasil studi diperoleh lewat hitung jumlah sel darah tikus serta evaluasi morfologinya menggunakan mikroskop serta tersaji nilai rerata yang kemudian dianalisis menggunakan SPSS dengan uji: *one way ANOVA*, *Kruskal Wallis*, *post hoc Bonferoni* serta *Mann Whitney*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparat diamati menggunakan *software* optilab pada perbesaran 100x dan 1000x. Evaluasi apusan darah pada 1 ppm dan 10 ppm pada kelompok kontrol negatif menunjukkan eritrosit normokrom normositik, gambaran jumlah leukosit yang normal, dan gambaran jumlah trombosit yang normal. Pada kelompok 100 ppm didapatkan sel darah merah normokrom normositik, kesan jumlah sel darah putih, dan kesan jumlah trombosit normal.

Hasil hitung jenis leukosit didapatkan hasil rerata seperti pada gambar 5.1.



Gambar 5.1 Grafik rerata *differential count* pada perlakuan kontrol, 1 ppm, 10 ppm, dan 100 ppm

Persentase jenis eosinofil, kelompok kontrol menunjukkan rerata tertinggi yaitu 0,4%. Selain itu, didapatkan hasil nol untuk jenis basofil dan neutrofil stab untuk setiap perlakuan. Dilanjutkan pada jenis neutrofil segmen, nilai rerata pada kelompok perlakuan 100 ppm paling tinggi yaitu 12,4%. Selanjutnya untuk jenis limfosit, rata-rata tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan 10 ppm (yaitu) sebesar 85,4%. Terakhir, untuk jenis monosit, jumlah rata-rata tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan 100ppm 15%

Hasil uji normalisasi (*Saphiro-Wilk*) pada jenis leukosit eosinofil, didapatkan sebaran data tidak normal, lalu dilanjutkan uji Kruskal-Wallis dan didapatkan hasil “Asymp. Sig. $p=0,663$ ($p>0,05$)” berarti tidak ada dampak signifikan pada leukosit jenis eosinofil. Hasil uji normalitas (*Saphiro-Wilk*) pada jenis leukosit neutrofil segmen, sebaran data normal serta homogen, lalu dilanjutkan ke uji “one way ANOVA” dan dihasilkan “ $p=0,018$ ($p<0,05$)” berarti terdapat dampak signifikan pada leukosit jenis neutrofil segmen. Hasil uji normalitas (*Saphiro-Wilk*) pada jenis leukosit limfosit, sebaran data normal dan homogen, lalu dilanjutkan ke uji “one way ANOVA” serta dihasilkan “ $p=0,000$ ($p<0,05$)” berarti terdapat dampak yang signifikan pada leukosit jenis limfosit. Hasil uji normalitas *Saphiro-Wilk* pada jenis leukosit monosit, didapatkan sebaran data normal tetapi tidak homogen. Selanjutnya dilaksanakan uji “Kruskal-Wallis”, yang hasilkan “Asymp. Sig. $p=0,011$ ($p>0,05$)” berarti terdapat dampak signifikan pada leukosit jenis monosit.

Hasil uji “Post Hoc” jenis neutrofil segmen, didapatkan pengaruh yang bermakna pada kelompok kontrol terhadap kelompok 100 ppm, sedangkan antar kelompok perlakuan 1 ppm, dan 10 ppm terdapat perbedaan yang tidak bermakna. Hasil uji “Post Hoc” jenis limfosit dihasilkan pengaruh yang bermakna di semua kelompok pada kelompok 100 ppm sedangkan antar kelompok perlakuan kontrol, 1 ppm, dan 10 ppm terdapat perbedaan yang tidak bermakna. Hasil uji “Post Hoc” jenis monosit diperoleh pengaruh yang bermakna di semua kelompok pada kelompok 10 ppm sedangkan antar kelompok perlakuan kontrol, 1 ppm, dan 100 ppm terdapat perbedaan yang tidak bermakna.

Hasil penelitian menunjukkan pengaruh yang beragam pada perlakuan paparan benzena perinhalasi

di evaluasi hapusan darah “tikus putih jantan *Rattus norvegicus strain wistar* yang dipapar benzena perinhalasi sampai 8 jam/hari 5hari/minggu pada 28 hari. Terjadi penurunan persentase eosinofil dari 0,6% pada kelompok 1 ppm menjadi 0,2% pada kelompok 10 ppm, ini selaras bersama penelitian Singh, et al., 2014 pada 54 petugas pom bensin di Kota Muzaffarnagar, Ia menjelaskan hal ini mungkin disebabkan oleh karena supresi sumsum tulang akibat metabolit benzena [5]. Terjadi peningkatan neutrofil segmen dari 7,6% pada kelompok kontrol menjadi 12,4% pada kelompok 100 ppm, hal ini diduga karena terjadi peningkatan IL8 yang berkorelasi baik dengan peningkatan neutrofil sebagai respon imun bawaan [6]. Terjadi penurunan limfosit dari 85,4% pada kelompok 10 ppm menjadi 72,2% pada kelompok 100 ppm, sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa metabolit benzena yakni *muconal acid* yang bekerja sama dengan polutan memegang peran kunci induksi apoptosis dari sel limfosit pada tikus [7]. Terjadi peningkatan monosit dari 6% pada kelompok 10 ppm menjadi 15% pada kelompok 100 ppm, hal ini mungkin terjadi akibat adanya *subclinical* inflamasi dan reaksi alergi [8].

Hasil penelitian terhadap morfologi sel darah tepi (eritrosit, leukosit, dan trombosit) tidak ditemukan hasil yang abnormal. Hal ini mungkin disebabkan karena perubahan morfologi sel darah butuh waktu paparan lebih lama serta dosis lebih tinggi [9,10].

Didapatkan kesan jumlah leukosit menurun pada kelompok paparan benzena 100 ppm, sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menjelaskan mekanisme toksisitas benzena terhadap darah melalui mekanisme apoptosis *hematopoietic stem cell* (HSC) pada hewan coba tikus. Tubuh yang dimasuki “Benzena” dengan perinhalasi akan diabsorpsi paru serta disebarkan pembuluh darah ke jaringan serta organ, kemudian mengalami metabolisme di “hepar (primer)” serta di “bone marrow (sekunder)”. Metabolisme benzena di hepar diperankan oleh enzim “CYP2E1” jadi benzena oksida. Benzena oksida lalu dimetabolisme jadi “*t-t muconaldehyde*” serta “hidrokuinon”. Hidrokuinon akan dioksidasi lewat dua jalur; “(1) lewat metabolisme sekunder oleh enzim *myeloperoxidase* (MPO) di sumsum tulang jadi metabolit benzokuinon, (2) Oksidasi oleh enzim CYP2E1 jadi 1, 2, 4 benzenetriol”. Lalu 1, 2, 4 benzenetriol juga alami oksidasi enzim MPO di sumsum tulang, benzokuinon yang efeknya toksik langsung hasilkan “*Reactive Oxygen Species* (ROS) atau radikal bebas yang sangat reaktif” di sumsum tulang. “Benzokuinon, 1, 2, 4 benzenetriol, dan *t-t muconaldehyde*” yang sifatnya toksik pada sel hematopoiesis di sumsum tulang lewat mekanisme apoptosis “*hematopoietic stem cells* (HSC)” yang jadi sel pluripoten pada pembuatan eritrosit, leukosit, serta trombosit [11].

Hasil *Post Hoc Bonferroni* menunjukkan dosis yang paling berpengaruh terhadap peningkatan neutrofil

dan penurunan limfosit yaitu 100 ppm, sedangkan peningkatan monosit terjadi pada dosis 10 ppm, hal ini menunjukkan bahwa rekomendasi 1 ppm batas aman paparan perinhalasi benzena oleh OSHA dan 0,5 ppm oleh Kementerian Ketenagakerjaan dan Transmigrasi dalam “UU No.13/MEN/X/2011 mengenai nilai ambang batas (NAB) bahan kimia di udara tempat kerja”, dinilai sudah tepat.

SIMPULAN

- Paparan benzena perinhalasi berdampak pada evaluasi hapusan darah tikus putih jantan (“*Rattus norvegicus*”) strain wistar.
- Paparan benzena perinhalasi berdampak pada prosentase hitung jenis leukosit pada evaluasi hapusan darah tikus putih jantan (“*Rattus norvegicus*”) strain wistar.
- Paparan benzena perinhalasi tidak berdampak pada morfologi sel darah (eritrosit, leukosit, dan trombosit) pada tikus putih jantan (“*Rattus norvegicus*”) strain wistar
- Paparan benzena 10 ppm perinhalasi berdampak pada peningkatan monosit, sedangkan paparan benzena 100 ppm perinhalasi berpengaruh terhadap penurunan limfosit dan peningkatan neutrofil segmen pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar.

REFERENSI

1. Widjanarko, A., Sudoyo, A. A. & Salonder, H., 2015. Anemia Aplastik. In: A. W. Sudoyo, et al. eds. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: Interna Publishing, pp. 1116-1126.
2. Winata, S. D., 2017. Dampak dan Monitoring pada Pekerja Terpapar Benzena. *ejournal ukrida*, p. 1.
3. Mahawati, E., Suhartono & Nurjazuli, 2006. Hubungan Antara Kadar Fenol Dalam Urin Dengan Kadar Hb, Eritrosit, Trombosit Dan Leukosit (Studi Pada Tenaga Kerja Di Industri Karoseri CV Laksana Semarang). *Jurnal Kesehatan Lingkungan Indonesia*, Volume V.
4. Adewoyin, A. & Nwogoh, B., 2014. *Peripheral Blood Film - A Review*. *Ann Ib Postgrad Med*, 12(2), p. 71–79. PMID: 25960697
5. Singh, D. et al., 2014. Eosinophil count in petrol pump workers in and around the Muzaffarnagar City. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 4(2), p.118. DOI:10.5455/njppp.2014.4.290920132
6. Moro, A. M., Brucker, N., Charão, M. F., Sauer, E., Freitas, F., Durgante, J., Garcia, S. C., 2015. Early hematological and immunological alterations in gasoline station attendants exposed to benzene. *Environmental Research*, Volume 137, p. 349–356. DOI: 10.1016/j.envres.2014.11.003
7. Martínez-Velázquez, M. et al., 2006. Benzene metabolites induce apoptosis in lymphocytes. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 58(1), p. 65–70. DOI: 10.1016/j.etp.2006.03.010
8. Mistry, H. et al., 2016. Study of Leukocyte Count and Its Association with Blood Pressure in Petrol Pump Workers of Surat City. *International Journal of Basic and Applied Physiology*, 5(1), pp. 71-78. DOI: 10.5455/njppp.2016.6.04122015105
9. Rothman, N., Li, G.L, Dosemeci, M., Bechtold, W., Marti, G., Wang, Y. Z., Linet, M., 2016. Hematotoxicity Among Chinese Workers Heavily Exposed to Benzene. *American Journal of Industrial Medicine*, 29(3), pp. 236-246. DOI:10.1002/(SICI)1097-0274(201603)29:3<236::AID-AJIM3>3.0.CO;2-O
10. Sonawane, B. & Bayliss, D. L., 2018. Toxological Review of Benzene Effect (Noncancer Effect). 1 ed. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.
11. Martínez-Velázquez, M. et al., 2006. Benzene metabolites induce apoptosis in lymphocytes. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 58(1), p. 65–70. DOI: 10.1016/j.etp.2006.03.010