

Perubahan Gambaran Histopatologi Paru pada Paparan Debu Batubara Memakai Alat Model 2010

Nia Kania,¹ Bambang Setiawan,² Nurdiana,³ M. Aris Widodo,³ HMS Chandra Kusuma⁴

¹Bagian Patologi Anatomi, Rumah Sakit Umum Daerah Ulin, Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin

²Bagian Kimia Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru

³Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

⁴Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Rumah Sakit Umum Daerah Syaiful Anwar, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Tambang batubara di permukaan tanah mendorong pembuatan alat paparan debu batubara skala laboratorium. Optimasi alat paparan debu batubara model 2010 dilakukan untuk menentukan lokasi akumulasi debu batubara serta perubahan histopatologi paru. Penelitian eksperimental dilakukan pada kontrol (K), paparan debu batubara 14 hari (BB1), dan debu batubara 28 hari (BB2). Karakterisasi debu batubara dilakukan dengan *scanning electron microscope* (SEM) dan *X-ray fluorescence* (XRF) di Laboratorium Fisika Universitas Negeri Malang. Pemeriksaan histopatologis paru dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Ulin Banjarmasin. Penelitian dilakukan periode Agustus–November 2010. *Scanning electron microscope* paru menunjukkan diameter partikel <10 µm dan akumulasi partikel di alveolus. Parenkim paru berupa struktur alveolus tipis (K), penebalan alveolus dan edema epitel edematous (BB1), peningkatan edematous dan penyempitan rongga alveolus (BB2). Epitel bronkus dilapisi epitel silindris, epitel goblet, sel radang yang minimal (K), perpanjangan epitel silindris, hiperplasia epitel goblet dan mukus (BB1). Sel epitel menjadi menipis, lebih banyak mukus dan morfologi epitel menjadi tidak jelas (BB2). Epitel bronkoalveolus dilapisi epitel silindris, minimal sel goblet dan sel radang (K). Hiperplasia epitel goblet yang mendominasi disertai mukus (BB1). Epitel silindris dengan proliferasi sel goblet, mukus, taburan sel radang, dan fibrosis (BB2). Simpulan, alat paparan model 2010 memicu akumulasi debu batubara di alveolus serta perubahan histopatologi berupa inflamasi, hiperplasia sel goblet, dan fibrosis. [MKB. 2011;43(3):127–33].

Kata kunci: Alveolus, debu batubara, histopatologi, paru

Lung Histopatology Changed in Coal Dust Exposure with Model 2010 Equipment

Abstract

Coal mining on surface ground stimulate to create coal dust exposure equipment on laboratory scale. Optimisation of model 2010 coal dust exposure equipment focus on coal dust accumulation and histopathologic of lung. This experimental study was done in control (K), coal dust exposure for 14 days (BB1), and coal dust exposure for 28 days (BB2). Coal dust characterization was done by scanning electron microscope (SEM) and X-ray fluorescence in Physics Laboratory Malang State of University. Histopathologic analysis was done in Pathologic Laboratory Ulin General Hospital. Research was done August–November 2010. Lung SEM showed particle diameter 10 µm and particle accumulated in alveolus. Lung parenchym showed thin alveolus structure (K), thickening of alveolus and edematous epithelial (BB1), increased edematous and narrower alveolus space (BB2). Epithelial in bronchus layering by cylindrical and goblet epithelial, inflammation cell (K), elongation of cylindrical epithelial, hyperplasia goblet epithelial and mucous (BB1). Epithelial became thick, more mucous, and epithelial morphology became unclear (BB2). Bronchoalveolus epithelial layering by cylindrical epithelial, minimal goblet cell and inflammation cell (K). Goblet cell hyperplasia and mucous (BB1). Cylindrical epithelial with goblet cell proliferation, mucous inflammation cell, and fibrosis (BB2). In conclusions, coal dust exposure with model 2010 equipments trigger coal dust accumulation in avelous and histopathologic changes of inflamation, goblet cell hyperplasia, and fibrotic. [MKB. 2011;43(3):127–33].

Key words: Alveolus, coal dust, histopathologic, lung

Korespondensi: dr. Nia Kania, SpPA(K), Bagian Patologi Anatomi, Rumah Sakit Umum Daerah Ulin Banjarmasin, jalan A. Yani Km 2 No.43, Banjarmasin- Kalimantan Selatan, *mobile* 0811504532, *e-mail:* kaniazairin@yahoo.com

Pendahuluan

Batubara adalah bahan bakar fosil berupa batuan organik, bersedimen, dan mudah terbakar yang terbentuk dari perubahan tanaman melalui konsolidasi di antara strata batuan akibat pengaruh tekanan dan panas.¹ Debu batubara adalah campuran kompleks berbagai proporsi mineral, *trace metal*, dan bahan organik dengan derajat yang berbeda dari partikulat batubara.²

Berbagai penelitian telah mengungkap efek paparan debu batubara terhadap kesehatan. Debu batubara dapat memicu perkembangan penyakit *simple coal workers pneumoconiosis* (CWP), *progressive massive fibrosis* (PMF), bronkitis kronik, dan emfisema.^{3,4} Mulloli dkk.⁵ menemukan peningkatan jumlah penderita asma pada anak yang tinggal di dekat atau jauh dari lokasi pertambangan batubara terbuka. Penelitian Hendryx dan Zullig⁶ didapatkan peningkatan secara bermakna risiko penyakit kardiovaskular (OR=1,22; 95%IK=1,14–1,30), penyakit jantung koroner (OR=1,29; 95%IK=1,19–1,39) dan serangan jantung (OR=1,19; 95%IK=1,10–1,30) yang sebanding antara pria dan wanita. Gambaran histopatologi paparan debu batubara meliputi inflamasi paru makrofag-limfosit granulomatosa yang diikuti oleh abnormalitas dan akumulasi matriks ekstraselular.⁷

Untuk mempelajari efek debu batubara terhadap kesehatan, para peneliti melakukan pendekatan secara epidemiologi, *in vivo* maupun *in vitro*. Metode *in vivo* dilakukan dengan model hewan coba terpapar debu batubara. Penelitian Ghanem dkk.⁸ memaparkan debu batubara yang diberikan secara instilasi intratrakea. Instilasi dosis 2,5, 10, 20, dan 40 debu batubara/tikus selama 14 hari didapatkan perubahan histopatologis berupa hiperplasia dan hipertrofi alveolar tipe 2, makrofag yang mengingesti debu berada di rongga alveolus maupun jaringan interstitial paru. Metode ini bersifat invasif dan harus dilakukan oleh ahli berpengalaman dalam instilasi intratrakea serta memerlukan fasilitas laboratorium yang memadai. Penelitian Armutcu dkk.⁴ memaparkan tikus pada udara ambien tambang debu batubara di bawah tanah selama 7, 14, dan 28 hari diperoleh perubahan histopatologis berupa kongesti alveolar, peningkatan makrofag alveolus, emfisema, infiltrasi neutrofil di interstitial, dan fibrosis. Di Indonesia semua tambang batubara berada di permukaan tanah, sehingga paparan tikus pada udara ambien tambang batubara sangat sulit untuk mengendalikan faktor cuaca. Dengan demikian, untuk mempelajari efek paparan debu batubara diperlukan alat paparan debu batubara.

Alat paparan debu batubara model 2010 adalah alat yang berfungsi menciptakan lingkungan udara

ambien yang mengandung debu batubara dan akan terinhalasi oleh hewan coba. Syarat ideal untuk alat paparan debu batubara meliputi diameter debu batubara terukur, dapat dilakukan penentuan dosis paparan, kecepatan aliran udara dapat diatur sesuai aliran udara luar, alat tahan lama dan tidak mudah rusak, alat mudah dibersihkan, serta nyaman bagi hewan coba. Pada alat paparan model 2010 diameter debu batubara yang dipaparkan <10 µm, dosis paparan ditentukan melalui penimbangan debu batubara per 0,5 m³ sebagai luas kotak paparan, terdapat pengaturan kecepatan udara, alat dapat dibersihkan dengan mudah, serta dilengkapi dengan tabung oksigen. Selain itu, untuk menjaga agar alat tahan lama dan tidak mudah rusak diletakkan dalam ruangan berpendingin udara.

Untuk mengetahui daya kerja sebuah alat, perlu dilakukan optimasi untuk menentukan efektivitas alat agar memberikan hasil yang nyata dalam penelitian. Pada penelitian ini akan dilakukan optimasi alat paparan debu batubara melalui kajian efek terhadap paru tikus. Target pembuktian optimasi alat model 2010 meliputi lokasi akumulasi debu batubara <10 µm di paru dan perubahan histopatologi yang ditimbulkan.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental secara kualitatif. Subjek penelitian ini adalah tikus Wistar jantan dengan bobot 200–250 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Kelompok pada penelitian ini dibedakan atas kelompok kontrol (K), kelompok paparan debu batubara 14 hari (BB1), dan kelompok paparan debu batubara 28 hari (BB2). Lama paparan didasarkan penelitian Ghanem dkk.⁸ dan Armutcu dkk.⁴ Jumlah tikus setiap kelompok sebanyak 5 ekor. Penelitian ini terbagi atas tiga tahap, yaitu tahap pembuatan debu batubara, tahap paparan, serta tahap pemeriksaan parameter. Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat.

Pembuatan debu batubara dilakukan dengan menghancurkan debu batubara dengan alat *Pulverizer* yang terdiri atas *Ball mill*, *Ring mill*, dan *Raymond Mill* di *Carsurin Coal Laboratories*, Banjarmasin. Alat tersebut akan menghasilkan debu batubara diameter <75 µm, kemudian akan disaring lebih lanjut dengan *mesh microSieve* (BioDesign, USA), sehingga didapatkan debu batubara diameter <10 µm sebagai *respirable particulate matter*. Karakteristik debu batubara akan dianalisis dengan *scanning electron microscope* (SEM) dan *X-ray fluorescence* di



Gambar 1 Alat Paparan Debu Batubara Model 2010

Laboratorium Fisika dan Laboratorium Sentral FMIPA Universitas Negeri Malang.

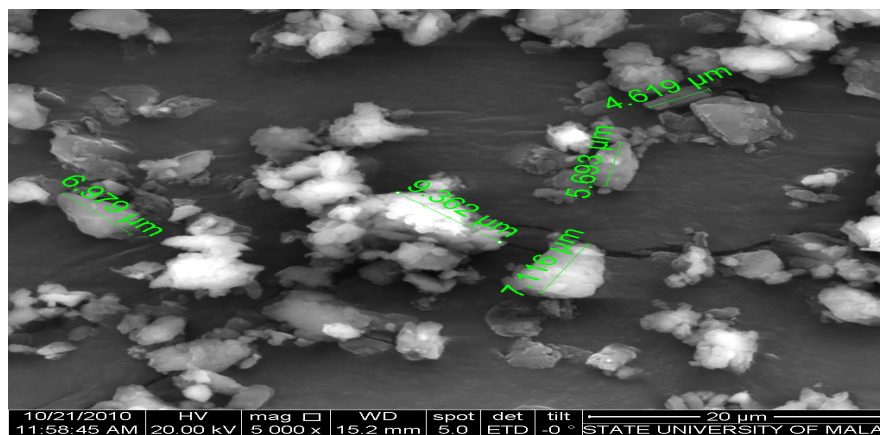
Pemaparan debu batubara menggunakan alat *coal dust exposure* dengan volume $0,5 \text{ m}^3$ yang didesain dan tersedia di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Prinsip alat tersebut adalah menyediakan lingkungan ambien yang mengandung debu batubara sebagai *particulate matter* yang dapat terinhalasi ke saluran napas hewan coba. Aliran udara pada *blower* di alat tersebut adalah $1,5\text{--}2$ liter/menit. Kecepatan ini sesuai dengan kecepatan aliran udara di lingkungan pertambangan batubara. Dosis paparan debu batubara mengikuti penelitian sebelumnya, yakni dosis tinggi sebesar $12,5 \text{ mg/m}^3$ dengan lama paparan 1 jam per hari.⁸ Pemaparan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan pemeriksaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Ulin Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin.

Setelah dilakukan pemaparan selama 14 dan 28 hari dilakukan pembedahan pada tikus yang dimasukkan bak plastik berisi kapas

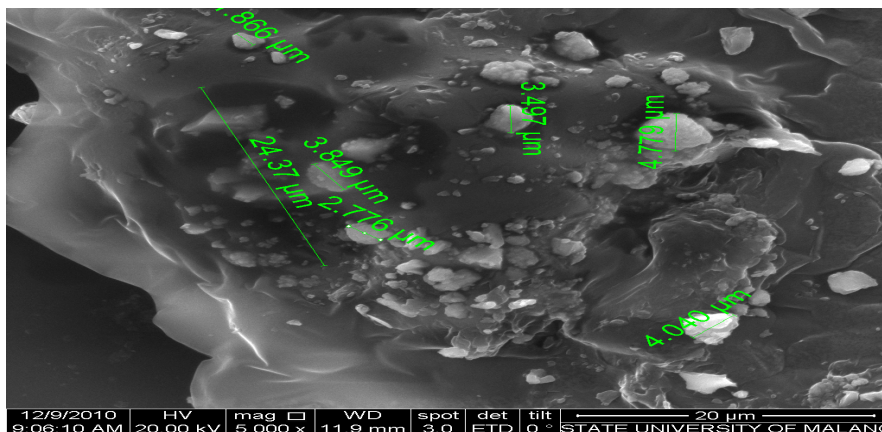
mengandung eter. Pembedahan dilakukan pada tikus yang masih mempunyai detak jantung dengan membuka abdomen, memotong kosta, dan membuka rongga dada untuk menemukan paru. Paru kemudian diambil lalu dibagi untuk pemeriksaan histopatologi serta *scanning electron microscope* dan diamati secara kualitatif.

Hasil

Dengan menggunakan teknik pembuatan debu batubara seperti pada metode, didapatkan karakteristik debu batubara dengan diameter partikel terbesar $<10 \mu\text{m}$ yang terlihat pada hasil *scanning electron microscope*. Bentuk partikel debu batubara $<10 \mu\text{m}$ adalah berbagai bentuk dengan sifat bergerombol. Selanjutnya dengan menggunakan *X-ray fluorescence* diperoleh informasi kandungan mineral anorganik meliputi Fe 36,9%; Si 17,9%; Mo 15%; Al 10%; Ca 8,67%; S 4,7%; Ti 3,65%. Mineral yang lain berada di bawah $<1\%$ meliputi K, V, Cr, Mn, Ni, Cu, dan Yb. Selanjutnya dengan *scanning electron*



Gambar 2 *Scanning Electron Microscope* Membuktikan Ukuran Debu Batubara $<10 \mu\text{m}$ (Perbesaran 5.000 Kali)



Gambar 3 Scanning Electron Microscope Paru Membuktikan Akumulasi Debu Batubara di Alveolus (Perbesaran 5.000 Kali)

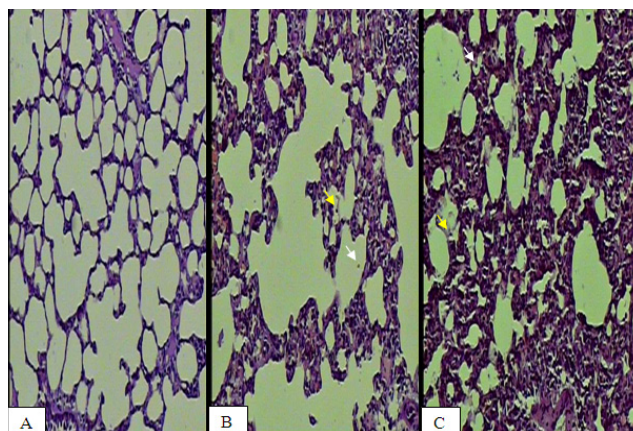
microscope pada jaringan paru dibuktikan bahwa debu batubara $<10 \mu\text{m}$ dan mengalami akumulasi di alveolus.

Gambaran histopatologi parenkim paru memperlihatkan struktur alveolus yang tipis pada tikus kontrol. Untuk paparan 14 hari ditemukan penebalan alveolus dan gambaran epitel yang edematous. Rongga alveolus sedikit melebar disertai perdarahan dan taburan eritrosit. Untuk paparan 28 hari didapatkan proses edematous yang semakin bertambah, taburan sel radang lebih masif disertai dengan penyempitan rongga alveolus. Perdarahan sudah tidak tampak lagi. Deposit debu batubara ditemukan pada alveolus atau matriks interstitial pada paparan 14 hari atau 28 hari.

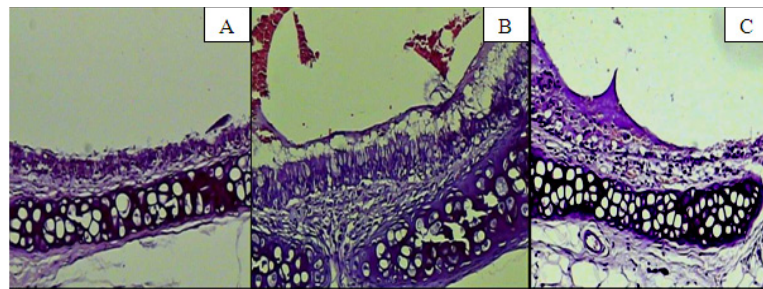
Untuk tikus kontrol, epitel bronkus (yang ditandai dengan tulang rawan) dalam keadaan

normal dilapisi epitel silindris disertai epitel goblet minimal dengan taburan sel radang yang minimal. Pada tikus terpapar 14 hari terdapat perpanjangan epitel silindris disertai hiperplasia epitel goblet dan mukus pada permukaan yang masif. Stroma di bawahnya ditaburi sel radang masif. Untuk paparan 28 hari ditemukan penipisan sel epitel disertai mukus yang banyak dan morfologi epitel menjadi tidak jelas.

Gambaran histopatologi epitel bronkoalveolus tikus kontrol didapatkan epitel dilapisi epitel silindris disertai dengan sel goblet minimal, sekeliling rongga bronkoalveolus ditaburi sel radang minimal. Pada paparan 14 hari ditemukan hiperplasia epitel sel goblet yang mendominasi disertai mukus di atasnya, sekeliling bronkoalveolus ditaburi sel radang masif. Untuk paparan 28 hari ditemukan lapisan epitel silindris dengan proliferasi sel goblet



Gambar 4 Gambaran Histopatologi Parenkim Paru Tikus Kontrol (A) Kelompok Paparan Debu Batubara 14 hari (B) dan Kelompok Paparan Debu Batubara 28 Hari (C) dengan Perbesaran 100 Kali. Anak panah menunjukkan lokasi partikel debu batubara dalam alveolus (panah putih) dan matriks interstitial (panah kuning)



Gambar 5 Gambaran Histopatologi Epitel Bronkus Tikus Kontrol (A) Kelompok Paparan Debu Batubara 14 Hari (B) dan Kelompok Paparan Debu Batubara 28 Hari (C) dengan Perbesaran 100 Kali

dan mukus di atasnya serta tampak taburan sel radang di sekitar bronkoalveolus disertai fibrosis.

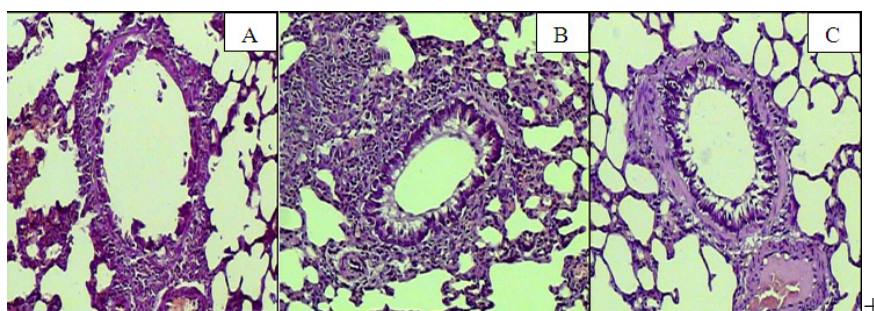
Pembahasan

Metode yang digunakan untuk pembuatan debu batubara didapatkan diameter debu batubara $<10 \mu\text{m}$ dengan bentuk partikel yang tidak beraturan serta bergerombol. Sifat bergerombol diduga disebabkan oleh adanya gaya tarik antar muatan atom partikel debu batubara dalam bentuk kation atau oksoion (kation yang bergabung dengan moleku oksigen). Diameter debu batubara $<10 \mu\text{m}$ yang digunakan pada penelitian ini (Gambar 2) lebih kecil daripada diameter debu batubara penelitian Pinho dkk.⁹ ($<15 \mu\text{m}$), akan tetapi lebih besar dibandingkan dengan penelitian Ghanem dkk.⁸ ($3,4 \mu\text{m}$) dan Armutcu dkk.⁴ ($0,5-5 \mu\text{m}$). Debu batubara tersebut dapat masuk ke dalam saluran napas sampai terakumulasi di alveolus seperti terbukti pada SEM (Gambar 3) paru serta gambaran histopatologis (Gambar 4). Lokasi akumulasi debu batubara pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Ghanem dkk.⁸ dan Green dkk.¹⁰

Berkaitan dengan penimbunan debu dalam

saluran pernapasan, terdapat tiga mekanisme. Mekanisme pertama melalui inersi. Mekanisme ini terjadi pada saat udara membelok ketika melewati jalan napas yang berbelok, maka debu batubara diameter kecil akan didorong oleh aliran udara. Untuk partikel debu yang berukuran besar tidak dapat mengikuti aliran udara, akibatnya menempel/mengendap pada tempat berlekuk di mukosa saluran napas. Mekanisme kedua dengan cara sedimentasi. Sedimentasi terjadi pada bronkus dan bronkiolus yang kecepatan aliran udara kurang dari 1 cm/detik (sangat rendah), akibat adanya gaya gravitasi menyebabkan partikel debu mengendap. Mekanisme ketiga berupa gerak *brown*, mekanisme ini terjadi terutama pada partikel debu yang mempunyai ukuran $0,1 \mu\text{m}$ yang memungkinkan partikel debu membentur dinding alveoli dan akhirnya tertimbun.

Pada penelitian ini, debu batubara mengandung Fe 36,9%; Si 17,9%; Mo 15%; Al 10%; Ca 8,67%; S 4,7%; Ti 3,65%. Debu yang terakumulasi di alveolus akan difagosit oleh makrofag. Peran penting makrofag alveolar terhadap debu batubara didapatkan dari beberapa pengamatan yang mengungkapkan bahwa subjek hewan coba yang dipapar secara



Gambar 6 Gambaran Histopatologi Epitel Bronkoalveolus Tikus Normal (A) Kelompok Paparan Debu Batubara 14 Hari (B) dan Kelompok Paparan Debu Batubara 28 Hari (C) dengan Perbesaran 100 Kali

kronik oleh mineral mengalami peningkatan makrofag alveolar untuk mengingesti partikel. Status fagositosis makrofag selama masa aktivasi merupakan rentang yang panjang untuk membentuk produk berupa oksidan, lipid bioaktif, sitokin, faktor pertumbuhan, protease, dan antiprotease. Beberapa sel di paru akan menjadi target mediator primer tersebut, yaitu fibroblas, sel epitel, dan sel endotel. Selanjutnya, sel target akan melepaskan mediator sekunder. Fagositosis oleh makrofag mencerminkan pembersihan partikel dalam fase lambat dan cepat tersaturasi, sehingga terjadi kelebihan muatan partikel yang akan berdampak negatif terhadap sel epitel.¹¹

Respons paru terhadap debu batubara berupa reaksi nonneoplasma akibat inhalasi komponen mineral atau organik dan merupakan resultan perubahan pada struktur paru.^{12,13} Partikel debu batubara akan mencapai dua sel target utama, yaitu sel makrofag dan sel epitel. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan gambaran histopatologi pada berbagai kelompok paparan. Penimbunan sel radang derajat ringan terjadi pada 14 hari dan menjadi masif pada 28 hari. Hal ini disebabkan oleh perekrutan sel inflamasi dari darah perifer (monosit dan neutrofil) oleh faktor yang dilepaskan makrofag aktif atau sel yang lain di paru. Perekrutan neutrofil menyebabkan peningkatan dan menetapnya status inflamasi di regio alveolus yang disebut alveolitis.¹¹ Hiperplasia sel goblet serta mukus mulai ditemukan pada 14 hari dan semakin meningkat pada 28 hari. Hal ini didasari oleh interaksi antara sel epitel dan debu batubara yang memicu hiperplasia sel goblet dan kelenjar pada dinding bronkus, sehingga meningkatkan produksi mukus serta gangguan pembersihan mukus.¹¹ Fibrosis ditemukan pada paparan 28 hari. Terjadinya fibrosis paru pada penelitian ini disebabkan oleh peranan fibroblas yang mensekresi kolagen dan komponen matriks interstitial yang lain. Fibrosis dikarakterisasi oleh pergantian parenkim paru normal oleh matriks kolagen.¹¹ Derajat perubahan histopatologis pada penelitian ini sesuai dengan yang ditemukan Armutcu dkk.⁴ pada paparan tambang batubara bawah tanah selama 14 hari dan 28 hari.

Dengan demikian untuk penelitian *in vivo* di laboratorium, pemakaian alat paparan debu batubara model 2010 dengan diameter debu <10 µm membuktikan akumulasi debu batubara di alveolus serta memberikan gambaran histopatologi (inflamasi, hiperplasia sel goblet, dan fibrosis) yang mengindikasikan efek akumulasi debu terhadap sel makrofag, sel epitel, dan sel fibroblas paru. Perubahan histopatologis penelitian ini sesuai dengan perubahan histopatologis paparan debu batubara di tambang batubara bawah tanah, sehingga alat tersebut dapat berguna untuk

penelitian efek paparan debu batubara di Indonesia dalam skala laboratorium. Simpulan, alat paparan model 2010 memicu akumulasi debu batubara di alveolus, serta perubahan hispatologi berupa inflamasi, hiperplasia sel goblet, dan fibrosis.

Daftar Pustaka

1. Huang X, Finkelman RB. Understanding the chemical properties of macerals and minerals in coal and its potential application for occupational lung disease prevention. *J Toxicol Environ Health*. 2008;11(1):45–67.
2. Dalal NS, Newman J, Pack D, Leonard S, Vallyathan V. Hydroxyl radical generation by coal mine dust: possible implication to coal workers' pneumoconiosis. *Free Rad Biol Med*. 1995;18(5):1–20.
3. Naidoo NR, Robins GT, Murray J, Green YHF, Vallyathan V. Validation of autopsy data for epidemiologic studies of coal miners. *Am J Ind Med*. 2005;47:83–90.
4. Armutcu F, Gun BD, Altin R, Gurel A. Examination of lung toxicity, oxidant/antioxidant status and effect of erdoesteine in rats kept in coal mine ambience. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2007;24:106–13.
5. Mulloli PT, Howel D, Prince H. Prevalence of asthma and other respiratory symptoms in children living near and away from opencast coal mining sites. *Int J Epidemiol*. 2001;30:556–63.
6. Hendryx M, Zullig KJ. Higher coronary artery disease and heart attack morbidity in Appalachian coal mining regions. *Preventive Med*. 2009;49:355–9.
7. Altin R, Kart L, Tekin I, Armutcu F, Tor M, Ornel T. The presence of promatrix metalloproteinase-3 and its relation with different categories of coal worker pneumoconiosis. *Mediators Inflamm*. 2004;13(2):105–9.
8. Ghanem MM, Porter D, Batteli LA, Vallyathan V, Kashon ML, Ma JY, dkk. Respirable coal dust particle modify cytochrome P4501A1 expression in rat alveolar cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31:171–87.
9. Pinho RA, Silveira PCL, Silva LA, Steck EL, Dal-Pizzol F, Moreira JCF. N-acetylsisteine and deferoxamine reduce pulmonary oxidative stress and inflammation in rats after coal dust exposure. *Environ Res*. 2005;99:355–60.
10. Green FHY, Vallyathab V, Hahn FF. Comparative pathology of environmental lung disease: an overview. *Toxicol Pathol*. 2007;35:136–47.

11. Schins RPF, Born PJA. Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *Annu Occup Hyg.* 1999;43(1):7–33.
12. Honma K, Abraham JL, Chiyotani K, De Vuyst P, Dumortier P, Gibbs AR, dkk. Proposed criteria for mixed-dust pneumoconiosis: definition, descriptions, and guidelines for pathologic diagnosis and clinical correlation. *Hum Pathol.* 2004; 35:1515–23.
13. Fishwick D. Pneumoconiosis. *Med J.* 2008; 36(5):258–60.