

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1. Gambaran Kadar AChE pada Tikus di Setiap Kelompoknya

Tikus yang telah terpilih sebagai sampel penelitian diambil darahnya melalui aorta untuk diukur kadar AChE di dalam serum darahnya. Kadar AChE pada 4 ekor tikus normal atau pada penelitian ini digolongkan dalam kelompok kontrol negatif menunjukkan kadar rata-rata sebesar 132,750 nmol/L. Kadar AChE pada 4 ekor tikus di kelompok kontrol positif (KP) yang dipapar dengan organofosfat jenis *dichlorvos* dosis 2mg/kgBB/hari menunjukkan kadar rata-rata sebesar 61,000 nmol/L. Kadar AChE pada 4 ekor tikus di kelompok Ekstrak Kulit Manggis (EKM) dosis 800mg yang dipapar dengan *dichlorvos* 2 mg/kgBB/hari, tetapi ditambah dengan pemberian EKM 800mg/kgBB/hari, menunjukkan kadar rata-rata sebesar 113,667 nmol/L.

Kadar AChE pada 4 ekor tikus di kelompok EKM dosis 1200mg yang dipapar dengan *dichlorvos* 2mg/kgBB/hari, ditambah dengan pemberian EKM 1200mg/kgBB/hari, menunjukkan kadar rata-rata sebesar 76,750 nmol/L. Kadar AChE pada 4 ekor tikus di kelompok Xanthone dosis 70mg yang dipapar dengan *dichlorvos* 2mg/kgBB/hari ditambah dengan pemberian antioksidan Xanthone 70mg/kgBB/hari, menunjukkan kadar rata-rata sebesar 53,697 nmol/L. Kadar AChE pada 4 ekor tikus di kelompok Xanthone dosis 140mg yang dipapar dengan *dichlorvos* 2mg/kgBB/hari ditambah dengan pemberian Xanthone 140mg/kgBB/hari, menunjukkan kadar rata-rata sebesar 52,000 nmol/L.

Setelah seluruh data kadar AChE setiap hewan coba yang terbagi dalam 6 kelompok diperoleh, kemudian diambil rata-rata kadar AChE di setiap kelompok perlakuan. Data ini kemudian dianalisis menggunakan uji normalitas Shapiro-wilk yang membuktikan bahwa sebaran data kadar AChE dalam penelitian ini normal karena nilai $p > 0,05$. Setelah itu, data dianalisis menggunakan uji homogenitas Levene yang menunjukkan bahwa sebaran data kadar AChE homogen, karena nilai $p > 0,05$. Setelah data kadar AChE dipastikan memiliki populasi yang normal dan sebaran data yang homogen, baru dapat dilanjutkan dengan uji one-way ANOVA untuk mengetahui signifikansi data dan uji *post hoc* LSD untuk menganalisa korelasi antar kelompok perlakuan.

Tinggi atau rendahnya kadar AChE dipengaruhi oleh umur, status gizi dan paparan organofosfat. Ketika diklorvos yang merupakan salah satu jenis organofosfat menghambat kerja asetilkolinesterase (AChE), sinyal yang dikirim antara sel-sel saraf dan otot-otot terganggu. Bentuk asetilkolinesterase yang terfosforilasi ini tidak mampu menghidrolisis asetilkolin. Jika asetilkolinesterase dihambat, asetilkolin terakumulasi di sinaps (Munaf, 1997). Pengikatan yang irreversibel pada kolinesterase dan kemudian menginaktivasinya, diyakini sebagai mekanisme utama toksisitas organofosfat. Apabila kolinesterase terikat, maka enzim tersebut tidak dapat melaksanakan tugasnya sehingga syaraf dalam tubuh terus menerus mengirimkan perintah kepada otot-otot tertentu. Dalam keadaan demikian otot-otot tersebut senantiasa bergerak-gerak tanpa dapat dikendalikan (tremor otot) (Shenouda et al., 2009).

Teori ini sesuai dengan hasil penelitian yang telah disebutkan diatas, karena terbukti kadar AChE menurun pada kelompok kontrol positif karena paparan diklorvos selama 21 hari. Hasil penelitian ini juga diperkuat dengan hasil

uji one-way ANOVA dan *post hoc* LSD yang menyatakan bahwa pemberian diklorvos menurunkan kadar AChE secara signifikan bila dibandingkan dengan kadar normal AChE pada kelompok kontrol negatif yang tidak dipapar dengan diklorvos. Kadar AChE yang menurun, menyebabkan AChE terkumpul di celah sinaps dan menimbulkan gejala tremor otot yang mulai dapat diamati sejak hari ke-13 dari pemberian diklorvos 2mg/kgBB pada kelompok kontrol positif. Tremor otot ini terus menetap hingga hari ke-21 pemberian diklorvos tetapi tidak sampai menyebabkan kematian hewan coba.

Sedangkan pada kelompok EKM 800mg, EKM 1200mg, xanthone 70mg dan xanthone 140mg kadarnya tetap lebih rendah dari kadar normal AChE dari kelompok kontrol negatif. Hal ini disebabkan karena efek dari pemberian diklorvos masih tetap kuat dalam menginhibisi AChE, meskipun telah ditambahkan *treatment* antioksidan xanthone dan antioksidan-antioksidan yang terkandung dalam EKM. Pada kelompok EKM 800mg, EKM 1200mg, xanthone 70mg dan xanthone 140mg tidak ditemukan tremor otot di semua hewan coba yang ada pada setiap kelompoknya hingga hari ke-21 atau hari terakhir pemberian diklorvos. Hasil ini menunjukkan bahwa meskipun kadar AChE pada keempat kelompok perlakuan tersebut tidak mampu mencapai ataupun melebihi kadar normal seperti pada kelompok kontrol negatif, tetapi terbukti bahwa pemberian antioksidan (EKM dan xanthone) mampu mengurangi efek samping dari pemberian diklorvos, yaitu mencegah timbulnya tremor otot pada hewan coba.

EKM dosis 800mg/kgBB merupakan dosis paling efektif bila dibandingkan dengan EKM dosis 1200mg/kgBB, xanthone dosis 70mg/kgBB dan xanthone dosis 140mg/kgBB, yang dapat meningkatkan kadar AChE hingga mendekati kadar normal AChE seperti pada kelompok kontrol negatif. EKM dosis 800mg/kgBB

yang diberikan pada hewan coba yang juga diinjeksi organofosfat *dichlorvos* selama 21 hari (toksisitas subkronik *dichlorvos*) terbukti efektif dalam meningkatkan kadar AChE hingga sekitar 52,667 nmol/L. Sedangkan pemberian xanthone dengan dosis 70mg/kgBB dan 140mg/kgBB dalam penelitian ini tidak mampu meningkatkan kadar AChE hingga mendekati kadar normalnya. Uji one-way ANOVA menunjukkan bahwa pemberian EKM dosis 800mg/kgBB, EKM dosis 1200mg/kgBB, Xanthone 70mg/kgBB dan Xanthone 140mg/kgBB dapat memodulasi peningkatan kadar AChE secara signifikan hingga mendekati kadar AChE normal. Hasil uji *post hoc* LSD menunjukkan bahwa dosis EKM 800mg/kgBB menghasilkan perbedaan yang bermakna dalam meningkatkan kadar AChE bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan Xanthone Dosis 70 mg/kgBB dan Xanthone Dosis 140 mg/kgBB, namun bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan EKM dosis 1200 mg/kg tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan bahwa peningkatan dosis EKM dan Xanthone memiliki pengaruh yang kurang signifikan dalam meningkatkan kadar AChE dalam serum. Sehingga, penggunaan dosis EKM 800mg/kgBB lebih dianjurkan daripada dosis EKM 1200mg/kgBB dan Xanthone 70mg/kgBB lebih dianjurkan daripada dosis Xanthone 140mg/kgBB. Dosis EKM 800mg/kgBB juga memberikan pengaruh yang paling signifikan dalam memodulasi peningkatan kadar AChE hingga mendekati kadar AChE normal, bila dibandingkan dengan EKM dosis 1200mg/kgBB, xanthone 70mg/kgBB dan xanthone 140mg/kgBB.

1.2. Gejala Tremor Otot yang Ditemukan pada Tikus

Intoksikasi organofosfat terutama disebabkan oleh fosforilasi enzim *acetylcholinesterase* (AChE) pada ujung saraf. Hasilnya adalah hilangnya AChE yang tersedia, sehingga organ efektor menjadi terlalu terstimulasi secara berlebihan karena kelebihan asetilkolin (ACh, substansi impuls-transmisi) pada *nerve ending*. Enzim ini sangat penting untuk mengontrol transmisi impuls saraf normal dari serat saraf ke sel-sel otot rangka, sel-sel kelenjar, ganglia otonom, dan dalam sistem saraf pusat (SSP) (DuBois, 1971).

Pada dosis yang cukup, hilangnya fungsi enzim memungkinkan akumulasi ACh di perifer *cholinergic neuroeffector junction* (efek muskarinik), persimpangan saraf-otot skeletal, dan ganglia otonom (efek nikotik), serta system saraf pusat. Pada persimpangan saraf kolinergik dengan otot polos dan sel-sel kelenjar, konsentrasi ACh yang tinggi menyebabkan kontraksi otot dan sekresi. Pada persimpangan otot rangka, kelebihan ACh mungkin menyebabkan otot berkedut ataupun tremor otot, tetapi juga dapat melemahkan atau melumpuhkan sel dengan depolarisasi *end-plate*. Pada SSP, konsentrasi ACh tinggi menyebabkan gangguan sensorik dan perilaku, inkoordinasi, depresi fungsi motorik dan depresi pernafasan (Pasquet, 1976).

Beberapa gejala awal yang paling sering dilaporkan termasuk sakit kepala, mual, pusing, hipersekresi, berkeringat, hipersalivasi, lakrimasi, dan rhinorrhea. Otot yang berkedut, kelemahan, dan tremor otot, serta inkoordinasi, muntah, kram perut, dan diare merupakan gejala keracunan lambat. Miosis sering merupakan tanda yang membantu diagnostik dan pasien mungkin mengeluhkan penglihatan kabur dan/atau gelap (DuBois, 1971).

Teori ini sesuai dengan hasil pengamatan tremor otot pada setiap tikus di setiap kelompok penelitian. Hasil pengamatan pada kelompok kontrol negatif yang

tidak diinjeksi dichlorvos dan hanya diberi pakan PARS, tidak menunjukkan tremor otot dari hari pertama hingga hari ke-21.

Sedangkan pada kelompok kontrol positif yang diinjeksi diklorvos 2mg/kgBB/hari secara subkutan menunjukkan adanya tremor otot ringan yang mulai terlihat sejak hari ke-13 dari awal perlakuan. Tremor otot ini terjadi akibat akumulasi Ach yang berlebihan di celah sinaps, sehingga menghasilkan impuls yang terus menerus. Tremor otot ringan ini terus berlangsung hingga hari ke-20 dan mengalami peningkatan intensitas menjadi tremor otot sedang sejak hari ke-21 atau hari terakhir perlakuan. Sedangkan pada kelompok perlakuan yang diberi EKM dosis 800mg/kgBB/hari dan diinjeksi diklorvos 2mg/kgBB/hari tidak menunjukkan gejala tremor otot dari hari pertama hingga hari ke-21.

Tikus-tikus pada kelompok perlakuan yang diberi EKM dosis 1200mg/kgBB/hari dan diinjeksi diklorvos 2mg/kgBB/hari juga tidak menunjukkan gejala tremor otot dari hari pertama hingga hari ke-21 penelitian. Pada kelompok perlakuan yang diberi xanthone dosis 70mg/kgBB/hari dan diinjeksi diklorvos 2mg/kgBB/hari tidak menunjukkan gejala tremor otot dari hari pertama hingga hari ke-21. Sedangkan tikus-tikus pada kelompok perlakuan yang diberi xanthone dosis 140mg/kgBB/hari dan diinjeksi diklorvos 2mg/kgBB/hari juga tidak menunjukkan gejala tremor otot dari hari pertama hingga hari ke-21 penelitian.

6.3. Pengaruh Pemberian Xanthone dan EKM pada Tikus yang Dipapar dengan Diklorvos pada kadar AChE dalam Serum dan Gejala Tremor Otot.

Sebelumnya telah dijelaskan bahwa PON-1 dapat mereduksi diklorvos melalui proses hidrolisis substrat paraoxon dari diklorvos. Jumlah diklorvos yang dapat direduksi oleh PON-1 dapat dilihat dari kadar AChE. Semakin tinggi kadar AChE, semakin banyak diklorvos yang tereduksi oleh PON-1. Sedangkan semakin rendah kadar AChE, semakin sedikit diklorvos yang berhasil direduksi oleh PON-1.

Berbagai penelitian *in vitro* dan *in vivo* pada hewan dan manusia telah memberikan bukti awal bahwa antioksidan dapat meningkatkan aktivitas PON-1, dengan melindungi enzim dari inaktivasi akibat stres oksidatif. Penelitian yang dilakukan oleh Kaplan tahun 2001, membuktikan konsumsi jus delima yang kaya akan flavonoid dengan aktivitas antioksidan, pada tikus yang kekurangan Apo-E, terbukti meningkatkan aktivitas serum PON-1 sebesar 26-43%. Penelitian lain juga membuktikan, Konsumsi jus delima oleh sekelompok 13 pria sehat menghasilkan peningkatan aktivitas serum PON-1 sebesar 20% (Aviram, 2000).

Setelah dilakukan pengukuran kadar AChE dengan metode *sandwich* ELISA, data diolah menggunakan *SPSS Statistics 17*. Karena jumlah kelompok yang dibandingkan lebih dari dua, maka uji beda yang digunakan adalah *one-way* ANOVA. Untuk dapat dianalisis dengan metode ANOVA yang adalah statistik parametrik, data harus berdistribusi normal atau mendekati distribusi normal dan homogen. Uji normalitas Shapiro wilk dan Uji homogenitas Levene dilakukan pada masing-masing parameter, dan didapatkan nilai signifikan untuk kadar AChE yaitu 0,051 dan 0,172. Dari hasil tersebut maka dapat disimpulkan bahwa sebaran data normal dan homogen karena nilai signifikan lebih dari 0,05 ($p > 0,05$).

Hasil uji korelasi ANOVA antar kelompok untuk kadar AChE didapatkan nilai signifikan untuk kadar AChE sebesar 0,006 ($p = 0,006$). Hasil tersebut

menunjukkan bahwa pemberian EKM dan xanthone berpengaruh secara signifikan dalam meningkatkan kadar AChE pada *Rattus norvegicus* yang dipapar dengan dichlorvos 2mg/kgBB selama 21 hari. Setelah itu, dilakukan uji multivariat LSD, maka dilanjutkan dengan uji korelasi Pearson untuk mengukur kekuatan korelasi antar variable. Hasil uji *post hoc* LSD menunjukkan bahwa dosis EKM 800mg/kgBB menghasilkan perbedaan yang bermakna dalam meningkatkan kadar AChE bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan EKM dosis 800 mg/kgBB dengan Xanthone Dosis 70 mg/kgBB dan Xanthone Dosis 140 mg/kgBB, namun bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan EKM dosis 1200 mg/kg tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan bahwa peningkatan dosis EKM dan Xanthone memiliki pengaruh yang kurang signifikan dalam meningkatkan kadar AChE dalam serum. Sehingga, penggunaan dosis EKM 1200mg/kgBB lebih dianjurkan daripada dosis EKM 800mg/kgBB dan Xanthone 70mg/kgBB lebih dianjurkan daripada dosis Xanthone 140mg/kgBB.

Pada setiap hewan coba yang dikelompokkan dalam kelompok perlakuan yang diberi antioksidan diamati apakah ada gejala tremor otot. Pada kelompok perlakuan yang diberi EKM dosis 800mg/kgBB dan diinjeksi diklorvos 2mg/kgBB tidak menunjukkan adanya tremor otot, tikus-tikus tersebut tampak sehat dan berat badannya bertambah. Pada kelompok perlakuan yang diberi EKM dosis 1200mg/kgBB dan diinjeksi diklorvos 2mg/kgBB juga tidak menunjukkan adanya tremor otot, tikus-tikus tersebut tampak sehat dan berat badannya bertambah.

Pada kelompok perlakuan yang diberi xanthone dosis 70mg/kgBB dan diinjeksi diklorvos 2mg/kgBB tidak menunjukkan adanya tremor otot, tikus-tikus tersebut tampak sehat dan berat badannya bertambah. Pada kelompok perlakuan yang diberi xanthone dosis 140mg/kgBB dan diinjeksi diklorvos 2mg/kgBB juga

tidak menunjukkan adanya tremor otot, tikus-tikus tersebut tampak sehat dan berat badannya bertambah.

6.4. Keterbatasan Penelitian

Hasil dari penelitian ini menunjukkan adanya hubungan antara pemberian antioksidan terhadap peningkatan kadar AChE yang terlalu drastis karena paparan diklorvos subkronis selama 21 hari, dengan korelasi yang kuat. Tetapi, hasil tes ELISA untuk kadar AChE pada kelompok EKM 800mg, EKM 1200mg, Xanthone 70mg dan Xanthone 140mg tidak menunjukkan korelasi angka yang konsisten. Hal tersebut merupakan keterbatasan penelitian. Adanya keterbatasan dalam penelitian ini antara lain disebabkan karena jumlah sampel yang sedikit, perbedaan respon imun dan metabolisme tubuh tikus yang berbeda serta tidak dilakukannya pembedahan pada salah satu tikus yang dipilih secara acak untuk mengetahui kondisi kesehatan umum organ-organ tikus tersebut. Selain itu, ada faktor lain yang dapat mempengaruhi kadar AChE pada tikus, yaitu umur, status gizi, diet, hormon dan protein fase akut sedangkan dalam penelitian ini hanya melihat kadar AChE yang dipengaruhi oleh paparan subkronis organofosfat saja.