

PENGARUH PEMBERIAN IKAN KEMBUNG (*Rastrelliger Sp.*) TERHADAP JUMLAH SEL PIRAMID KORTEKS SEREBRUM PADA TIKUS HIPOTIROID KONGENITAL

AULIA RAHMAH

*UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH YOGYAKARTA

ABSTRAK

Background: Congenital hypothyroid is congenital endocrine disorder that most common in childhood and common cause of preventable mental retardation. Hypothyroidism can cause brain cells damage. Some studies showed that omega-3 has a role as neuroprotective agent. Indian mackerel have been selected for having an omega-3 is quite high compared with the fish commonly consumed in Indonesia. **Purpose:** To know the effect of indian mackerel (*Rastrelliger sp.*) to pyramid cells in cerebrum cortex. **Method:** Experimental study with posttest only control group design was done in 30 Sprague Dawley rats were divided into 6 groups with 5 rats each group. Four groups was induced by PTU on 5 days of gestation until 15 days of neonates, and two other groups was normal. Tyroxine and mackerel was gave on 21 days of birth until 8 weeks. Later, rat's brain was taken for histology preparation with HE staining and cerebrum cortex pyramid cells observation under microscope. Data analyzing using statistic test One Way Anova. **Result:** The average number of pyramidal cells cerebrum cortex in each groups; positive control, normal with mackerel, hypothyroid, hypothyroid with mackerel, hypothyroid with thyroxin, and hypothyroid with mackerel and thyroxin is 117 ± 18 , 146 ± 24 , 55 ± 6 , 115 ± 6 , 83 ± 3 and 100 ± 9 per field of vision. The statistic test show significant result ($p < 0,05$). **Conclusion :** There is effect of giving indian mackerel to pyramid cells in cerebrum cortex in congenital hypothyroid rats.

Key words: indian mackerel, pyramidal cell, congenital hypothyroid

INTISARI

Latar belakang: Hipotiroid kongenital merupakan kelainan endokrin bawaan yang paling umum terjadi pada masa kanak dan merupakan penyebab umum retardasi mental yang dapat dicegah. Hipotiroidisme dapat menyebabkan kerusakan sel-sel otak. Berdasarkan beberapa penelitian sebelumnya mengemukakan bahwa asam lemak omega-3 dapat berperan sebagai agen neuroprotektif. Oleh karena itu, ikan kembung dipilih karena memiliki kandungan omega-3 yang cukup tinggi dibandingkan dengan ikan-ikan yang biasa dikonsumsi di Indonesia. **Tujuan:** Untuk mengetahui pengaruh pemberian daging ikan kembung terhadap jumlah sel piramid pada korteks serebrum. **Metode:** Merupakan penelitian eksperimental dengan posttest only control group design dilakukan pada 30 ekor anak tikus putih galur Sprague Dawley dibagi menjadi 6 kelompok masing-masing 5 ekor. Empat kelompok diinduksi PTU pada hari ke 5 kebuntingan sampai kelahiran hari ke 15, dan dua kelompok lainnya normal. Tiroksin dan ikan kembung diberikan pada hari ke 21 setelah kelahiran hingga minggu ke 8. Kemudian tikus diambil otaknya dan dibuat preparat histologi dengan pewarnaan HE untuk diamati dibawah mikroskop dan dihitung jumlah sel piramid korteks serebrum. Analisis data menggunakan uji statistik One Way Anova. **Hasil:** Rerata jumlah sel piramid korteks serebrum pada kelompok kontrol normal, normal dengan ikan kembung,

hipotiroid, hipotiroid dengan ikan kembung, hipotiroid dengan tiroksin, dan hipotiroid dengan ikan kembung dan tiroksin masing-masing sebanyak 117 ± 18 , 146 ± 24 , 55 ± 6 , 115 ± 6 , 83 ± 3 dan 100 ± 9 sel per lapang pandang. Hasil uji statistik menunjukkan hasil peningkatan yang signifikan pada tikus hipotiroid maupun tikus normal ($p < 0,05$). **Kesimpulan:** Ada pengaruh peningkatan pemberian ikan kembung terhadap jumlah sel piramid korteks serebrum tikus hipotiroid kongenital.

Kata kunci: *ikan kembung, sel piramid, hipotiroid kongenital*

Pendahuluan

Hipotiroid kongenital adalah kelainan yang disebabkan oleh kelainan perkembangan (disgenesis) atau dishormonogenesis kelenjar hipotiroid yang terjadi sebelum atau saat lahir. Hipotiroid kongenital merupakan gangguan endokrin paling umum dan penyebab keterbelakangan mental yang dapat dicegah pada anak⁽¹⁾.

Secara umum kejadian hipotiroid kongenital di negara berkembang mencapai 1:3000 hingga 1:4000 kelahiran. Prevalensi hipotiroid kongenital di Lebanon mencapai 1:1823 kelahiran, dibagian timurlaut Thailand memiliki perbandingan 3 kali lebih tinggi⁽²⁾. Secara nasional, saat ini Indonesia belum memiliki data secara khusus tentang hipotiroid kongenital. Pada tahun 2000 hingga September 2014, di RSUP dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta dan RS Hasan Sadikin Bandung mencatat 85 dari 213.669 bayi baru lahir menderita hipotiroid atau sebanding dengan 1:2513 kelahiran. Jumlah ini melebihi jumlah rasio secara global⁽¹⁷⁾.

Pada penelitian hewan coba, janin yang kekurangan hormon tiroksin (T4) mengalami perubahan neurogenesis otak sehingga menyebabkan kesalahan pada migrasi neuron saat proses perkembangan

otak janin. Kekurangan hormon tiroksi mempengaruhi proliferasi sel neuron, menurunkan jumlah sel, synaptogenesis dan arborisasi dendritik serta mengubah migrasi sel ke neokorteks dan hipokampus⁽³⁾. Peristiwa tersebut meningkatkan resiko penurunan fungsi kognitif pada bayi dan masa kanak⁽³⁾.

Kejadian hipotiroid di Indonesia sebagian besar disebabkan oleh kurangnya intake iodium maka pemberian makanan yang mengandung banyak iodium dan zat stimulant pertumbuhan saraf perlu digalakkan. Oleh karena itu, penelitian tentang manfaat pemberian ikan kembung yang mengandung banyak iodium dan omega-3 untuk perbaikan struktur otak perlu dilakukan. Iodium merupakan zat gizi mikro yang diperlukan untuk pembentukan hormon tiroid di dalam kelenjar tiroid. Omega-3 adalah asam lemak jenuh tak ganda atau PUFA (*Polyunsaturated fatty acid*) yang mengandung DHA (*Docosahexaenoic acid*) dan EPA (*Eicosapentaenoic acid*). DHA penting bagi system saraf otak untuk proses tumbuh kembang anak dan meningkatkan potensi kecerdasan⁽¹⁸⁾. EPA dapat memperbaiki sistem sirkulasi dan dapat membantu mencegah penyempitan, pengerasan pembuluh darah dan penjudalan darah. Omega-3 ini banyak

terkandung pada minyak ikan, terutama pada ikan kembung⁽¹⁸⁾.

Lembaga Gizi Departemen Kesehatan RI telah mengeluarkan data beberapa jenis ikan laut Indonesia memiliki kandungan/kadar asam lemak omega-3 tinggi (ada yang sampai 10,9 g/100 g) seperti ikan lemuru, sidat, terubuk, tenggiri, kembung, layang, bawal, seren, slengseng, dan tuna⁽¹⁹⁾. Kandungan Asam Lemak Omega-3 per 100 gram pada ikan kembung adalah 2,2 gram pada ikan salmon adalah 1,6 gram⁽²⁰⁾. Dalam penelitian ini dipilih ikan kembung dengan pertimbangan memiliki jumlah yang cukup melimpah dan mudah didapatkan serta memiliki harga yang relatif murah sehingga diharapkan hasil penelitian ini dapat diaplikasikan pada masyarakat luas. Jika tidak dilakukan penelitian ini maka dikhawatirkan semakin banyak anak-anak yang menderita hipotiroid kongenital tidak tertangani dan menurunkan kualitas hidup mereka.

Bahan dan Cara

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium untuk menguji pengaruh pemberian ikan kembung (*Rastrelliger sp*) terhadap jumlah sel piramid korteks serebrum tikus (*Sprague Dawley*) dengan rancangan posttest only control group design.

Sampel yang diteliti adalah 30 ekor anak tikus dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor anak tikus. Terdapat enam kelompok yaitu: kelompok kontrol positif (tikus normal) (K I), kelompok perlakuan yaitu tikus normal dengan ikan kembung (K II); tikus hipotiroid dengan ikan kembung (K III); tikus hipotiroid dengan tiroksin (K IV); tikus hipotiroid dengan ikan kembung dan tiroksin (K V), serta kelompok kontrol negatif (tikus hipotiroid) (K VI).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 30 ekor anak tikus putih *Sprague Dawley*; daging ikan kembung (*Rastrelliger sp.*); *propiltiourasil* yang digunakan untuk menginduksi tikus menjadi hipotiroid; dan *Tiroksin*.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang tikus sebagai tempat perlakuan, pakan tikus, botol air mineral bekas beserta tutup dan selangnya sebagai tempat minuman tikus, kloroform, formalin 10%, toples, peralatan bedah tikus, pot, gelas objek, mikroskop, komputer dan alat hitung.

Penelitian dilakukan di UPHP UMY untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada bulan Februari hingga Juni 2015. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM pada bulan

Juni 2016. Pengambilan gambar preparat dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UMY.

Pelaksanaanya diawali dengan mengelompokkan induk tikus secara acak kemudian diadaptasikan. Induk tikus dikawinkan dan dideteksi dengan swep vagina. Induk tikus bunting diinduksi *propiltiourasil* 15 ppm dalam air minum selama dimulai hari ke-5 bunting hingga hari ke-15 postnatal, pada 2 minggu bunting kadar T4 bebas diukur. Anak-anak tikus yang lahir diberikan perlakuan sesuai dengan kelompoknya yaitu T4 dengan dosis 0,018x100 mg dalam 200 ml air dan ikan kembung yang dikukus dan disangrai dengan perbandingan 70% pakan dan 30% ikan kembung. Diakhir penelitian anak-anak tikus diterminasi, organ otak diambil dan letakkan pada pot berisi formalin 10% untuk dibawa ke bagian Patologi Anatomi FK UGM dan dibuat preparat dengan pengecatan HE (*Hematocilin Eosin*) dan kemudian dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan total perbesaran 40x dengan luas $52 \times 39 \mu\text{m} = 2067 \mu\text{m}^2$ dan dilakukan pengulangan pada lima lapang pandang.

Pengumpulan data melalui pengamatan jumlah sel piramid pada korteks serebrum masing-masing kelompok.

Analisa data menggunakan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji statistik menggunakan *One Way Anova* untuk mengetahui signifikansi antar kelompok.

Hasil

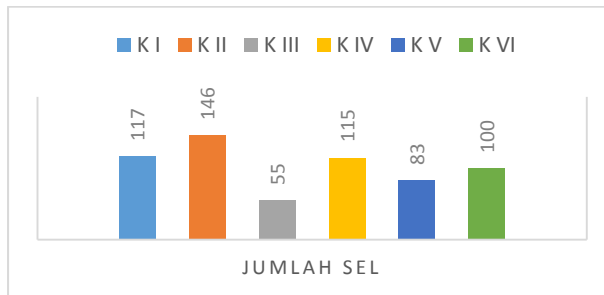
Hasil pengamatan yang dilakukan dengan mencatat jumlah sel piramid korteks serebrum yang diamati pada preparat melalui mikroskop. Hasil pengamatan pada masing-masing kelompok diperlihatkan pada Tabel 1.

Pada tabel 1 tampak bahwa kelompok tikus normal yang diberi ikan kembung memiliki jumlah sel piramid terbanyak yaitu 146, sedangkan kelompok tikus hipotiroid tanpa perlakuan menunjukkan hasil terendah yaitu 55. Kelompok tikus hipotiroid yang di beri ikan kembung menunjukkan jumlah sel piramid yang meningkat dan mendekati dengan jumlah sel piramid pada kelompok kontrol positif yaitu 115.

Tabel 1. Rerata jumlah sel piramid pada korteks serebrum

No	Kelompok	N	Rerata ± SD
1	Normal (K I)	5	117 ± 18
2	Normal + Ikan Kembung (K II)	5	146 ± 24
3	Hipotiroid (K III)	5	55 ± 6
4	Hipotiroid + Ikan Kembung (K IV)	5	115 ± 6

5	Hipotiroid + Tiroksin (K V)	5	83 ± 3
6	Hipotiroid + Tiroksin + Ikan Kembang (K VI)	5	100 ± 9



Gambar 1. Histogram perbandingan rerata jumlah sel piramid masing-masing kelompok

Tabel 2. Nilai signifikansi antar kelompok perlakuan.

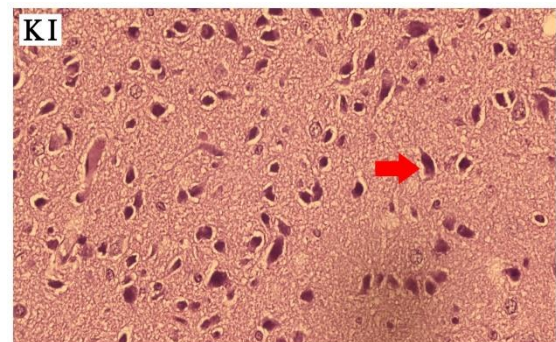
Kelompok	K I	K II	K III	K IV	K V	K VI
K I		0,021*	0,000*	1,000	0,006*	0,380
K II	0,021*		0,000*	0,014*	0,000*	0,000*
K III	0,000*	0,000*		0,000*	0,030*	0,000*
K IV	1,000	0,014*	0,000*		0,008*	0,475
K V	0,006*	0,000*	0,030*	0,008*		
K VI	0,380	0,000*	0,000*	0,475		

*. The mean difference is significant at the 0,05 level

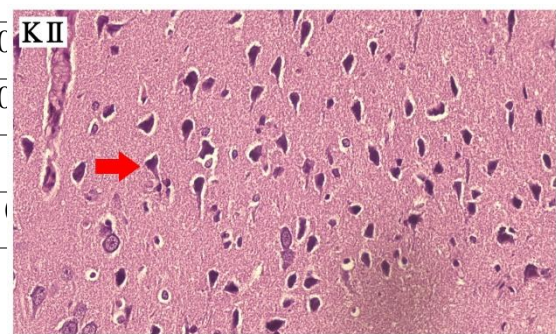
Berdasarkan hasil uji LSD (*Least Significant Difference*) sebagian besar didapatkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok. Perbedaan tidak bermakna ditemukan antara K I dengan K IV, K I dengan K V, K IV dengan K VI dan K V dengan K VI. Nilai signifikansi

antar kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2.

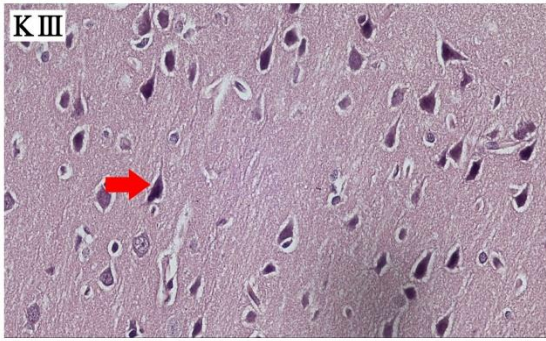
Kelompok tikus hipotiroid yang diberi ikan kembang memiliki hasil yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif diperlihatkan dari nilai signifikansi $p < 0,05$.



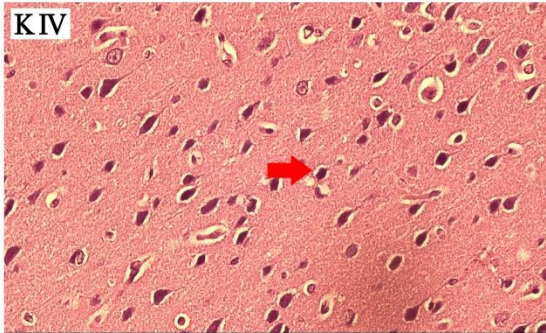
Gambar 2. Gambaran Histologi Sel Piramid Korteks Serebrum Tikus K I Normal pada Lamina Granularis Eksterna sampai Lamina Piramidis Interna (Hematoksilin Eosin, perbesaran total 40x, luas $52 \times 39 \mu\text{m} = 2067 \mu\text{m}^2$) →: Sel Piramid



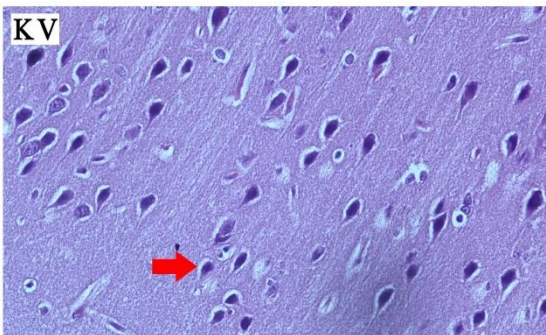
Gambar 6. Gambaran Histologi Sel Piramid Korteks Serebrum Tikus K II Normal dengan pemberian Ikan Kembang pada Lamina Granularis Eksterna sampai Lamina Piramidis Interna (Hematoksilin Eosin, perbesaran total 40x, luas $52 \times 39 \mu\text{m} = 2067 \mu\text{m}^2$) →: Sel Piramid



Gambar 7. Gambaran Histologi Sel Piramid Korteks Serebrum Tikus K III Hipotiroid pada Lamina Granularis Eksterna sampai Lamina Piramidis Interna (Hematoksilin Eosin, perbesaran total 40x, luas $52 \times 39 \mu\text{m} = 2067 \mu\text{m}^2$) → : Sel Piramid

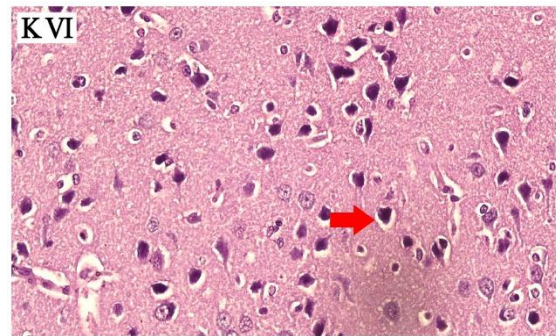


Gambar 8. Gambaran Histologi Sel Piramid Korteks Serebrum Tikus K IV Hipotiroid dengan pemberian Ikan Kembung pada Lamina Granularis Eksterna sampai Lamina Piramidis Interna (Hematoksilin Eosin, perbesaran total 40x, luas $52 \times 39 \mu\text{m} = 2067 \mu\text{m}^2$) → : Sel Piramid



Gambar 9. Gambaran Histologi Sel Piramid Korteks Serebrum Tikus K V Hipotiroid dengan pemberian Tiroksin pada Lamina Granularis Eksterna sampai Lamina Piramidis Interna

(Hematoksilin Eosin, perbesaran total 40x, luas $52 \times 39 \mu\text{m} = 2067 \mu\text{m}^2$) → : Sel Piramid



Gambar 10. Gambaran Histologi Sel Piramid Korteks Serebrum Tikus K VI Hipotiroid dengan pemberian Ikan Kembung dan Tiroksin pada Lamina Granularis Eksterna sampai Lamina Piramidis Interna (Hematoksilin Eosin, perbesaran total 40x, luas $52 \times 39 \mu\text{m} = 2067 \mu\text{m}^2$) → : Sel Piramid

Diskusi

Tiroid hormon (tyroksin [T4], dan 3,5,3'-triiodothyronin [T3]) memiliki efek utama pada proses perkembangan dan fisiologis dan berperan pada hampir semua jaringan, system saraf pusat adalah target yang paling penting. Selama maturasi otak, hormon tiroid berpengaruh secara luas dalam proses perkembangan seperti myelinisasi, diferensiasi sel glial dan sel neuron serta migrasi dan diketahui gen yang berperan dalam proses tersebut diregulasi oleh hormon tiroid⁽⁴⁾.

Data menunjukkan otak janin berkembang dengan sangat cepat selama awal kehamilan (hingga 20 minggu). Sejak janin belum mampu membentuk fungsi

tyroidnya sendiri secara sempurna hingga minggu ke 20 kehamilan, hormon tiroid janin diturunkan terutama dari ibu⁽⁵⁾.

Hormon tiroid dibutuhkan untuk penambahan umum selama masa janin dan untuk memicu perkembangan diskret dalam otak janin dan jaringan somatik sejak awal kehamilan. Hormon ini juga mempengaruhi diferensiasi terminal jari jaringan janin dan memberi efek pematangan prepartum dari glukokortikoid yang akan menjamin kelangsungan hidup bayi⁽⁶⁾.

Hormon tiroid bertindak secara langsung melalui efek anabolik pada metabolisme janin dan stimulasi konsumsi oksigen janin. Hormon ini juga bertindak secara tidak langsung dengan mengontrol bioavailabilitas dan efektivitas hormon lain dan faktor pertumbuhan yang mempengaruhi perkembangan janin seperti katekolamin dan *insulin-like growth factors* (IGFs). Dengan mengatur akselerasi jaringan dan diferensiasi, hormon tiroid janin memastikan aktivasi proses fisiologis penting untuk kelangsungan hidup saat lahir seperti pertukaran gas di paru, termogenesis, glukogenesis hepatic dan adaptasi kardiak⁽⁶⁾.

Dilaporkan bahwa maternal hipotiroidisme dan hipotiroidisme yang terjadi pada awal kehamilan dapat

berbahaya terhadap perkembangan otak embrio-fetal dan dapat menyebabkan retardasi intelektual⁽⁵⁾. Sebuah penelitian mengemukakan bahwa pada hipotiroid menunjukkan terjadinya penurunan volume hippocampus dan otak pada hewan coba⁽⁷⁾.

Hipotiroid yang terjadi selama masa janin dan/atau neonatal menyebabkan terjadinya perubahan histologi pada otak tikus, seperti menurunnya hubungan sinaptik, keterlambatan myelinasi, terganggunya migrasi neuronal dan modifikasi dalam neurotransmisi menyebabkan efek merusak pada perkembangan system saraf pusat dan adanya penurunan jumlah populasi neuron sel glia dan sel piramid pada CA4 dan girus dentatus di hippocampus⁽⁷⁾.

Di sistem saraf pusat, astrosit merupakan pelindung neuron paling utama dari eksitotoksisitas dan perlindungan ini diperantarai terutama oleh glutamate ekstraselular. Dalam astrosit, enzim glutamin sintetase dengan cepat mengubah glutamate menjadi glutamin yang berfungsi sebagai prekursor penting untuk neurotransmitter eksitatori utama oleh neuron melalui enzim glutaminase⁽⁷⁾. Kondisi hipotiroid secara jelas menunjukkan adanya gangguan siklus glutamate-glutamin, dengan mengganggu metabolisme (dengan menghambat

glutamin sintetase) dan transportasi (dengan mengurangi tingkat GLAST dan GLT-1) neurotransmitter eksitatori. Peristiwa ini dapat menyebabkan eksitotoksikasi neuronal karena konsentrasi glutamate ekstraseluler yang berlebihan⁽⁸⁾. Pada penelitian dengan hewan coba menemukan bahwa pada prenatal hipotiroid terjadi peningkatan aktivitas apoptosis sel neuron otak^(9,10). Apoptosis adalah bentuk regulasi secara genetic dari kematian sel (kematian sel terprogram) yang memungkinkan pembuangan yang aman ketika sel-sel mengalami kerusakan atau telah menyelesaikan fungsi biologis mereka. Apoptosis ditandai dengan perubahan morfologi seperti penyusutan sel, budding membrane, penggumbalan kromatin, pycnosis inti (penyusutan) dan cariorrhesis (inti berfregmen)⁽⁹⁾.

Sinha et al. (2009) dalam penelitiannya mengemukakan bahwa diet omega-3 mampu menjadi agen anti-apoptosis dalam perkembangan cerebellum dan dapat mencegah terjadinya kerusakan neuron. Sinha et al. juga mengusulkan omega-3 merupakan agen profilaksis yang potensial untuk mencegah kerusakan otak. Zararsis et al. (2006) dalam penelitiannya terhadap kerusakan sel otak akibat induksi formaldehyde menemukan bahwa omega-3 mampu menurunkan tingkat kerusakan sel

otak tikus dan menunjukkan gambaran sel yang serupa dengan kelompok tikus normal.

Asam lemak omega-3 ini secara signifikan ditemukan dalam jumlah banyak di ikan laut dan makanan laut lainnya⁽¹¹⁾. Asam lemak omega-3 ini dapat ditemukan dalam ikan kembung dengan kadar yang cukup tinggi⁽²⁰⁾.

Penelitian ini mengamati pengaruh pemberian ikan kembung terhadap jumlah sel piramid korteks serebrum pada tikus hipotiroid kongenital. Hasilnya menunjukkan terdapat peningkatan jumlah sel piramid yang signifikan pada kelompok yang diterapi dengan ikan kembung dibandingkan dengan kelompok tikus hipotiroid tanpa perlakuan.

Belum ditemukan adanya penelitian yang spesifik tentang pengaruh ikan kembung terhadap sel piramid pada hipotiroid kongenital. Tetapi, ada beberapa penelitian sebelumnya yang mempelajari peran asam lemak omega-3 terhadap kerusakan sel-sel otak akibat hipotiroid.

Pal et al.⁽¹²⁾ dalam penelitiannya melaporkan bahwa suplementasi omega-3 dapat memulihkan kerusakan seluler dan kognitif secara signifikan serta mampu mencegah bentuk dendrit yang kerdil dan apoptosis pada perkembangan serebelum tikus dengan iodine-defisiensi.

Abdallah et al.⁽¹³⁾ juga dalam percobaannya melaporkan bahwa tikus hipotiroid yang di treatment dengan omega 3 secara signifikan memiliki kadar T3 yang tinggi dan kadar TSH yang rendah dibandingkan dengan tikus hipotiroid tanpa perlakuan. Abdallah et al juga mengemukakan bahwa supplement omega 3 dapat meningkatkan jumlah sel granular girus dentatus pada hippocampus dan menyimpulkan bahwa supplement omega-3 pada hipotiroid onset dewasa dapat digunakan sebagai agen neuroprotektif untuk mencegah kerusakan kognitif⁽¹³⁾.

Penelitian ini menunjukkan bahwa tikus hipitiroid yang diberikan daging ikan kembung jumlah sel piramid pada korteks serebrum mengalami peningkatan jika dibandingkan dengan kelompok hipotiroid tanpa perlakuan dan memiliki jumlah yang tidak jauh berbeda dengan kelompok tikus normal.

Omega-3 Fatty acid dapat mencegah kerusakan neuron pada gangguan degenerative yang diamati pada

manusia⁽¹⁴⁾ dan pada hewan coba tikus^(15,16). Tetapi mekanisme kerja neuroprotektifnya selama perkembangan otak mamalia masih kurang dipelajari. Omega-3 bertindak langsung pada tingkat apoptosis pada mitokondria dengan mengembalikan keseimbangan keluarga protein Bcl-2, yang terganggu karena kekurangan hormon tiroid selama perkembangan cerebellum. Keluarga protein Bcl-2, yang meliputi anggota anti-apoptosis seperti Bcl-2 dan Bcl-x_L bersama dengan anggota pro-apoptosis Bax, mengatur regulasi integritas mitokondria selama proses apoptosis⁽¹⁰⁾.

Sehingga dapat disimpulkan bahwa kadar omega-3 dalam ikan kembung dapat mencegah terjadinya kerusakan dan dapat meningkatkan jumlah sel piramid pada korteks serebrum pada hipotiroid kongenital.

DAFTAR PUSTAKA

1. Agrawal, P., Philip, R., Saran, S., Gutch, M., Razi, M.S., Agroiya, P., et al. (2015). Congenital Hypothyroid. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 19 (2). 211-227.
2. Karamizadeh, Z., Saneifard, H., Amirhakimi, G., Karamifar, H., Alavi, M. (2012). Evaluation of Congenital Hypothyroidism in Fars Province, Iran. *Iran J Pediatr*, 22 (1). P 107-112.
3. Henrichs, J., Ghassabian, A., Peeters, R.P., Tiemeier, H. (2013). Maternal Hypothyroxinemia and Effects on Cognitive Functioning In Childhood: How and Why?. *Clinical Endocrinology*, 79. 152-162.
4. Bernal, Juan. (2007). Thyroid hormone in brain development and function. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3 (3). 249-259.
5. Shan, Z.Y., Chen, Y.Y., Teng, W.P., et al. (2009). A Study for maternal thyroid hormone deficiency during first half of pregnancy in China. *European Journal of Clinical Investigation*, 39. 37-42.

6. Forhead, A., Fowden, A. (2014). Thyroid hormones in fetal growth and parturition maturation. *Thyroid hormone and fetal*, 211(3). 87-103.
7. Cattani, D., Goulart, P.B., Cavalli, V.L.D.L.O., et al. (2013). Congenital hypothyroidism alters the oxidative status, enzyme activities and morphological parameters in the hippocampus of developing rats. *Molecular & Cellular Endocrinology*, 375. 14-26.
8. Coulter, D.A., Eid, T., (2012). Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia* 60, 1215-1226
9. Zararsiz, I., Kus, I., Akpolat, N., Songur, A., Ogeturk, M., Sarsilmaz, M. (2006). Protective Effects Of Omega-3 Essential Fatty Acid Against Formaldehyde-induced Neuronal damage in Prefrontal Cortex of Rat. *Cell Biochemistry and Function*, 24. 237-244.
10. Sinha, R.A., Khare, P., Rai, A., et al. (2009). Anti-apoptotic role of omega-3-fatty acid in developing brain: perinatal hypothyroid rat cerebellum as apoptotic model. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27. 377-383.
11. Calder, P.C. (2014). Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanism and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1-16.
12. Pal, A., Mohan, V., Modi, D.R., Sinha, R.A., Rastogi, L., Kumar, P., et al. (2013). Iodine plus n-3 fatty acid supplementation augments rescue of postnatal neuronal abnormalities in iodine-deficient rat cerebellum. *British Journal of Nutrition*, 110. 659-670.
13. Abdallah, E.S.H., Gomaa, A.M.S., Sayed, M.M. (2014). The Effect of Omega-3 on Cognition in Hypothyroid Adult Male Rats. *Acta Physiologica Hungaria*, 101 (3). 362-376.
14. Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., et al. (2003). Consumption of fish and n-3 fatty acid and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurology*, 60. 940-946.
15. Florent, S., Malaplate-Armad, C., Youssef, I., et al. (2006). Docosahexaenoic acid prevent neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers. *Journal Neurochemical*, 96.. 385-395.
16. Ozen, O.A., Cosar, M., Sahin, O., et al. (2008). The protective effect of fish n-3 fatty acid on cerebral ischemia in rat prefrontal cortex. *Neurology Science*, 29. 147-152.
17. Pusat Komunikasi Publik Sekretariat Jenderal Kementerian Kesehatan RI. (2015, 21 Mei). *Gangguan Akibat Tiroid Sejak Bayi*. Diakses 20 Maret 2016, dari <http://www.depkes.go.id/article/view/15052700009/gangguan-akibat-tiroid-sejak-bayi.html> [Januari 2016]
18. Irianto, H.E., & Soesilo, I. (2007). Dukungan Teknologi Penyediaan Perikanan. *Badan Riset Kelautan dan Perikanan*. 1-20.
19. Yartati, (2007). Omega-3 ikan mengurangi ancaman sakit jantung coroner. <http://yartati.multiply.com/sci-hub.cc/reviews/iterm/65>. [Januari 2016]

