

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil Penelitian

Bab ini akan menguraikan hasil penelitian dan pembahasan mengenai pengaruh pemberian ikan kembung (*rastrellinger sp.*) terhadap jumlah sel piramid korteks serebrum pada tikus hipotiroid kongenital. Subjek yang digunakan adalah anak tikus (*Sprague Dawley*) sebanyak 30 ekor yang dibagi dalam 6 kelompok masing-masing 5 ekor tikus. Subjek didapatkan dari Farmsi UGM sebanyak 12 ekor induk tikus dan 4 ekor tikus jantan kemudian dilakukan pemeliharaan secara berkelompok di dalam kandang. Dilakukan pengaturan suhu ruang dengan kipas angin pada suhu 25°-30°C dan kelembaban 65-87%. Setiap anak tikus ditempatkan disebuah kandang yang mempunyai faktor lingkungan (suhu dan kelembaban) yang sama agar faktor-faktor luar yang dapat mengganggu hasil penelitian dapat ditekan seminimal mungkin.

Pemeliharaan tikus dipelihara dalam 1 kandang, dalam 1 kandang terdiri dari 5 ekor tikus., pemberian pakan dalam 1 wadah *ed libitum*. Pemeliharaan ringkas memungkinkan bagian pakan yang kurang rata. Pemberian ikan kembung ditaburkan diatas pakan. Hasil dari pengamatan menunjukkan bahwa tikus memakan suplemen ikan kembung tidak berebut, dan bergantian, Sehingga masing-masing tikus mendapatkan suplemen ikan kembung.

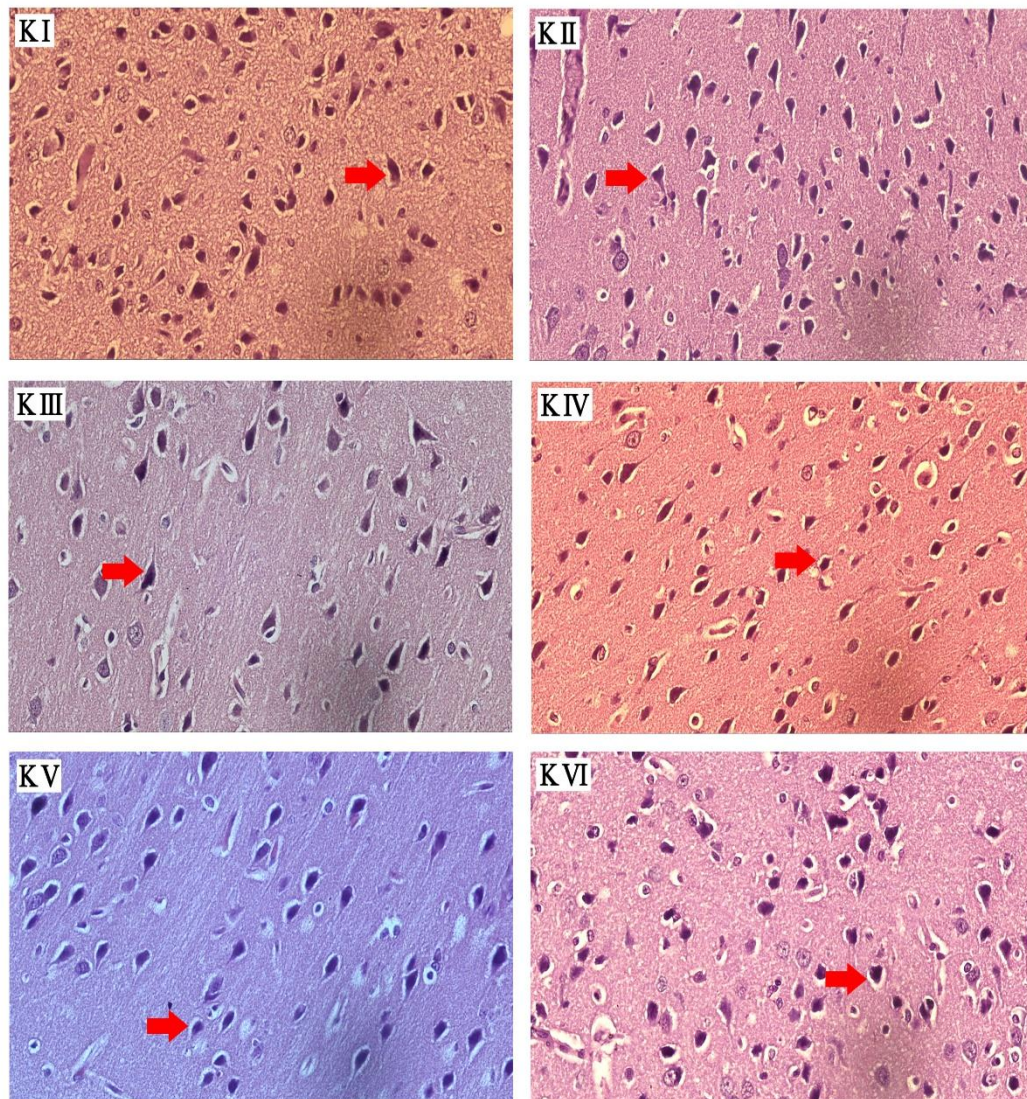
Sebelumnya untuk memastikan dan membuktikan bahwa anak tikus benar-benar berhasil menjadi tikus hipotiroid dari induk yang diinduksi PTU, maka anak tikus diambil darahnya pada usia 3 minggu untuk diambil data FT4 nya. Rata-rata Kadar FT4 Serum Induk Tikus dan Anak Tikus Usia 3 minggu dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 3. Rerata Kadar FT4 Serum Induk Tikus dan Anak Tikus Usia 3 minggu**

Sampel Tikus	Kadar FT4 Serum Rerata ± Standart Deviasi ng/dL
Induk Hipotiroid	0,18 ± 0,09 ng/dL
Anak Hipotiroid Kongenital usia 3 minggu	0,08 ± 0,16 ng/dL

Semua anak tikus mendapatkan perlakuan yang sesuai sampai minggu ke 8. Setelah minggu ke 8 anak-anak tikus dibedah dan otak diambil untuk dibuat preparat. Hasil penghitungan jumlah sel piramid dianalisa secara statistik.

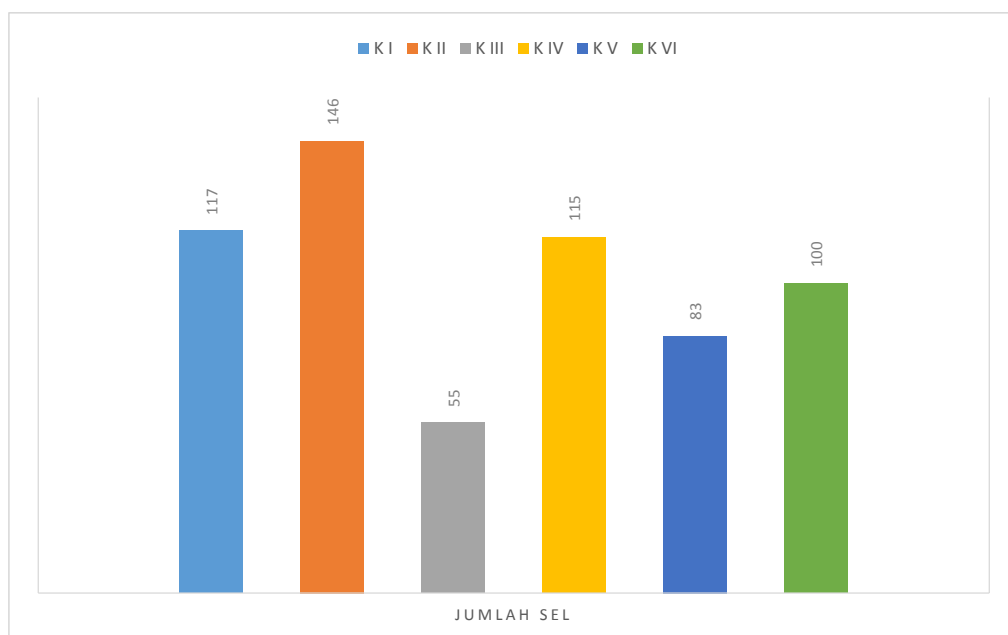
Data yang diambil dari pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran total 40x pada setiap kelompoknya. Mikroskop telah dilengkapi dengan kamera dan dihubungkan dengan komputer. Pada setiap preparat tikus akan diambil lima lapang pandang dengan luas  $52 \times 39 \mu\text{m} = 2067 \mu\text{m}^2$ , kemudian dihitung reratanya. Berikut gambar histologi sel piramid korteks serebrum dari kelompok I hingga kelompok VI.



**Gambar 10. Gambaran histologi sel piramid korteks serebrum (Hematoksilin Eosin, Perbesaran 40x, dan luas lapang pandang  $52 \times 39 = 2067 \mu\text{m}$ ) KI: normal, KII: normal+ikan kembung, KIII: hipotiroid, KIV: hipotiroid+ikan kembung, KV: hipotiroid+tiroksin, KVI: hipotiroid+ikan kembung+tiroksin.  $\rightarrow$  = sel Piramid**

**Tabel 4. Rerata jumlah sel Piramid pada korteks serebrum (dengan pembulatan) → sel per satuan lapang pandang**

No	Kelompok	N	Rerata ± SD jumlah sel/lapang pandang
1.	Normal Tanpa Perlakuan (K I)	5	117 ± 18
2.	Normal dengan Ikan Kembung (K II)	5	146 ± 24
3.	Hipotiroid (K III)	5	55 ± 6
4.	Hipotiroid dengan Ikan Kembung (K IV)	5	115 ± 6
5.	Hipotiroid dengan Tiroksin (K V)	5	83 ± 3
6.	Hipotiroid dengan Tiroksin dan Ikan Kembung (K VI)	5	100 ± 9



**Gambar 11. Histogram perbandingan jumlah sel Piramid Korteks Serebri tikus Hipotiroid KOngenital antar kelompok perlakuan**

Berdasarkan pada Tabal 4. Di atas maka dapat disimpulkan bahwa jumlah sel piramid terbanyak terdapat pada kelompok II, yaitu tikus normal yang diberikan ikan kembung. Sedangkan jumlah sel piramid paling sedikit terdapat pada kelompok III, yaitu tikus hipotiroid kongenital tanpa adanya perlakuan ataupun terapi.

Setelah hasil didapatkan, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas untuk mengetahui distribusi datanya dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, karena jumlah data yang diperoleh adalah 30. Hasil uji ini pada seluruh kelompok menunjukkan hasil  $p > 0,05$ , menunjukkan bahwa data sel Piramid tersebut memiliki distribusi yang normal. Analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji *One Way Annova*. Hasil uji *One Way Annova* menunjukkan hasil  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) sehingga dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan rerata jumlah sel Piramid yang bermakna diantara keenam kelompok tersebut. Setelah diketahui ada perbedaan bermakna diantara keenam kelompok tersebut, dilakukan uji LSD (*Least Significant Difference*) dalam post hoc test untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda.

Berdasarkan hasil uji LSD sebagian besar didapatkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok. Perbedaan tidak bermakna ditemukan antara kelompok normal (K I) dengan kelompok hipotiroid+ikan kembung (K IV), kelompok normal (K I) dengan kelompok hipotiroid+tiroksin (K V), kelompok hipotiroid+ikan kembung (K IV) dengan kelompok hipotiroid+ikan kembung +tiroksin (K VI) dan kelompok tirokrin (K V) dengan kelompok

hipotiroid+ikan kembung+tiroksin (K VI). Nilai signifikansi antar kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 5. Nilai sigifikansi 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*		0,343
K VI	0,380	0,000*	0,000*	0,475	0,343	

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

**Keterangan:**

K I: Normal

K II: Normal Ikan Kembung

K III: Hipotiroid

K IV: Hipotiroid Ikan Kembung

K V: Hipotiroid Tiroksin

K VI: Hipotiroid Ikan Kembung dan Tiroksin

**B. Pembahasan**

Dalam penelitian ini tikus dibuat hipotiroid dengan diinduksi menggunakan *propiltiourasil* sebagai anti-tiroid agen (Albaar & Adam, 2009). *Propiltiourasil* dapat merusak kelenjar tiroid sehingga menghambat pembentukan hormon tiroid (Hardiningsih & Nurhidayat, 2006) serta dapat menekan aktivitas kelenjar tiroid (Furi & Wahyuni, 2011).

Penelitian ini mengamati pengaruh pemberian ikan kembung yang memiliki kadar omega-3 tinggi (Doddy, 2008) terhadap jumlah sel piramid korteks serebrum pada tikus hipotiroid kongenital. Hasilnya menunjukkan terjadi peningkatan jumlah sel piramid yang signifikan pada semua 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.

Abdallah *et al.* (2013) 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.

Penelitian ini menunjukkan bahwa tikus hipotiroid 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 degeneratif yang diamati pada manusia (Morris *et al.*, 2003) dan pada hewan coba tikus (Florent *et al.*, 2006; Ozen *et al.*, 2008). 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 serebellum. Keluarga protein Bcl-2, yang meliputi anggota anti-apoptosis seperti Bcl-2 dan Bcl-x<sub>L</sub> bersama dengan anggota *pro-apoptosis Bax*, mengatur regulasi integritas mitokondria selama proses apoptosis (Sinha *et al.*, 2009). 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.

Pal *et al.* (2013) 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 yang menyebabkan rendahnya kadar hormon tiroid.

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 glia dan sel neuron serta migrasi dan diketahui gen yang berperan dalam proses tersebut diregulasi oleh hormon tiroid (Bernal, 2007).

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 terutami dari ibu (Shan *et al.*, 2009).

Bioavaibiliti hormon tiroid di uterus dipengaruhi oleh perkembangan aksis hipotalamus-pituitari-kelenjar tiroid janin dan melimpahnya hormon tiroid transporter dan deiodinases yang mempengaruhi bioaktivasi hormon pada jaringan. Konsentrasi T4 dan T3 pada janin juga dipengaruhi oleh usia gestasi, nutrisi dan kondisi endokrin di dalam uterus, permeabilitas plasenta terhadap hormon tiroid maternal (Forhead & Fowden, 2014).

Hormon tiroid dibutuhkan untuk pertambahan umum selama masa janin dan untuk memicu perkembangan diskret dalam otak janin dan jaringan sejak awal kehamilan. Hormon ini juga mempengaruhi diferensiasi terminal dari jaringan janin dan memberi efek pematangan *prepartum* dari *glukokortikoid* yang akan menjamin kelangsungan hidup bayi (Forhead & Fowden, 2014).

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 akselersi jaringan dan dan diferensiasi, hormon tiroid janin memastikan aktivasi proses fisiologis penting untuk kelangsungan hidup saat lahir seperti pertukaran gas di paru, *thermogenesis*, *glukogenesis hepatic* dan adaptasi kardiak (Forhead & Fowden, 2014).

Dilaporkan bahwa maternal hipotiroidisme dan hipotiroidisme yang terjadi pada awal kehamilan dapat berbahaya terhadap perkembangan otak embrio-fetal dan dapat menyebabkan retardasi intelektual (Shan et al., 2009). Sebuah penelitian mengemukakan bahwa pada hipotiroid menunjukkan terjadinya penurunan volume *hippocampus* dan otak pada hewan coba. Penemuan morfologi yang paling signifikan adalah menurunnya kepadatan neuron disemua lapisan sel piramid hippocampus di kedua hemisphere serta menurunnya jumlah sel yang masih hidup pada tikus hipotiroid muda (Cattani et al., 2013).

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 (Cattani et al., 2013).

Di sistem saraf pusat, *astrocit* merupakan pelindung neuron paling utama dari *eksitotoksitas* dan perlindungan ini diperantarai terutama oleh glutamat ekstraselular. Dalam astrocit, enzim *glutamin sintetase* dengan cepat mengubah glutamat menjadi glutamin yang berfungsi sebagai prekursor penting untuk neurotransmitter eksitatori utama oleh neuron melalui enzim *glutaminase* (Cattani *et al.*, 2013). 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 (Coulter & Eid, 2012). Pada penelitian dengan hewan coba menemukan bahwa pada prenatal hipotiroid terjadi peningkatan aktivitas apoptosis sel neuron otak (Zararsiz *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2009). Apoptosis adalah bentuk regulasi secara genetik 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, *pynosis* inti (penyusutan) dan *cariorrhesis* (inti berfregmen) (Zararsiz *et al.*, 2006).

Sehubungan dengan peristiwa diatas, Sinha *et al.* (2009) dalam penelitiannya mengemukakan bahwa diet omega-3 mampu menjadi agen anti-apoptosis dalam perkembangan serebellum 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 (Calder, 2014). Asam lemak omega-3 ini dapat ditemukan dalam ikan kembung dengan kadar yang cukup tinggi (Doddy, 2008).