

BAB 4

HASIL PENELITIAN

A. Gambaran Umum Penelitian

Subyek penelitian didapatkan dari Laboratorium Farmasi UGM sebanyak 12 ekor induk dan 4 ekor jantan. Setiap anak-anak tikus ditempatkan disebuah kandang yang mempunyai faktor lingkungan (suhu dan kelembapan) yang sama agar faktor-faktor luar yang dapat mengganggu hasil penelitian dapat ditekan seminimal mungkin. Pemeliharaan hewan uji dilakukan di kandang secara berkelompok dengan suhu ruangan 25⁰-30⁰ C dan menggunakan pengatur suhu kipas angin. Kelembaban ruangan 25-80 dan mendapat cahaya matahari 12 jam. Tikus diberikan pakan dasar AD II dan diberi air minum yang berasal dari air rebusan. Pemberian ikan kembung dan tiroksin diberikan pada neonates hari ke 21. Kemudian kadar FT4 diukur pada induk dan anak tikus. Tidak semua anak tikus diukur kadar FT4nya karena ukuran tikus yang kecil sehingga mudah mati kekurangan darah apabila diambil darahnya.

Penelitian ini menggunakan anak-anak tikus putih (*Sprague Dawley*) sebanyak 30 ekor yang baru lahir dari induknya yang telah diinduksi menggunakan *prophylthiouracil* (PTU). Anak-anak tikus tersebut dibagi menjadi 6 kelompok, masing masing kelompok terdapat 5 ekor.

Semua anak-anak tikus mendapatkan perlakuan yang sesuai sampai minggu ke 8. Setelah minggu ke 8 anak-anak tikus diambil otaknya dan dibuat preparat. Hasil penghitungan jumlah sel *purkinje* dianalisis secara statistik.

B. Hasil Penelitian

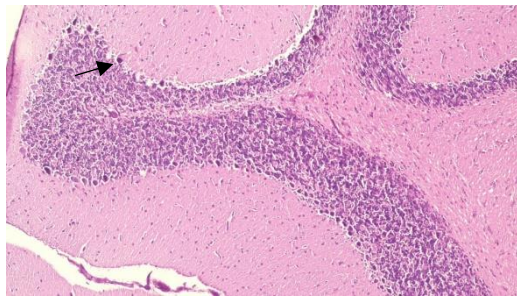
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian suplemen ikan kembung terhadap jumlah sel *purkinje* pada lapisan ganglionare serebelum tikus hipotiroid kongenital. Pengamatan yang dilakukan yaitu penghitungan jumlah sel *purkinje* pada lapisan ganglionare serebelum.

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 2.

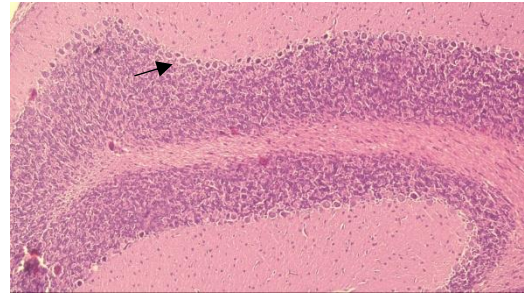
Sampel Tikus	Kadar FT4 Serum Rerata ± Standart Deviasi (ng/dL)
Induk Hipotiroid	0,18 ± 0,09
Anak Hipotiroid Kongenital usia 3 minggu	0,08 ± 0,16

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskop perbesaran total 40x pada seluruh kelompok, didapatkan gambaran histologi sel *purkinje* pada Kelompok normal yang tidak mendapatkan perlakuan apapun pada ke 5 tikus rata-rata didapatkan jumlah sel *purkinje* sebanyak 60 ± 12 sel/lapang pandang. Hasil ini dapat dilihat pada gambar 12. Pada Kelompok normal ikan kembung, didapatkan jumlah sel *purkinje* pada 5 tikus masing-masing 5 pandang rata-rata sebanyak 71 ± 16 sel/lapang pandang. Hasil ini dapat dilihat pada gambar 13. Pada Kelompok hipotiroid yang mendapat *prophyl thiourasil* dari Kimia Farma 15 ppm selama kebuntingan, didapatkan jumlah sel *purkinje* pada 5 tikus masing-masing 5 pandang

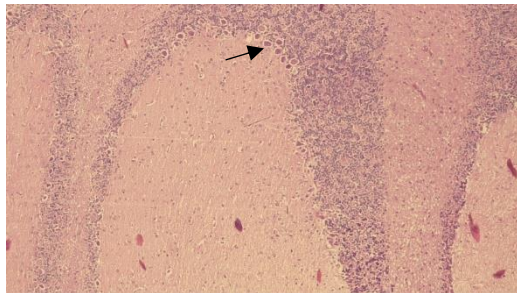
rata-rata sebanyak 40 ± 6 sel/lapang pandang. Hasil ini dapat dilihat pada gambar 14. Pada Kelompok Hipotiroid ikan kembung yang mendapat *prophyl thiourasil* dari Kimia Farma 15 ppm selama kebuntingan dan mendapat perlakuan pemberian suplemen daging ikan kembung didapatkan jumlah sel *purkinje* pada 5 tikus masing-masing 5 pandang rata-rata sebanyak 64 ± 7 sel/lapang pandang. Hasil ini dapat dilihat pada gambar nomor 15. Pada Kelompok hipotiroid yang mendapat *prophyl thiourasil* dari Kimia Farma selama kebuntingan dan mendapat tiroksin dari Kimia Farma, didapatkan jumlah sel *purkinje* pada 5 tikus masing-masing 5 pandang rata-rata sebanyak 70 ± 17 sel/lapang pandang. Hasil ini dapat dilihat pada gambar 16. Pada Kelompok hipotiroid tiroksin dan ikan kembung yang mendapat *prophyl thiourasil* selama kebuntingan dan mendapat tiroksin serta mendapat perlakuan pemberian ikan kembung didapatkan jumlah sel *purkinje* pada 5 tikus masing-masing 5 pandang rata-rata sebanyak 65 ± 20 sel/lapang pandang. Hasil ini dapat dilihat pada gambar 17.



Gambar 12.



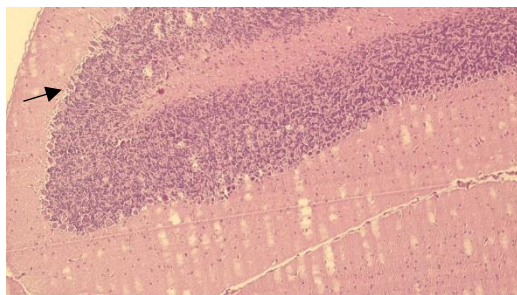
Gambar 13.



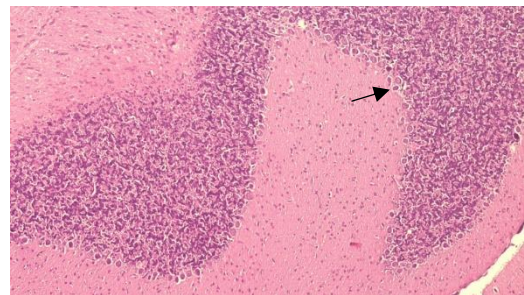
Gambar 14.



Gambar 15.



Gambar 16.



Gambar 17.

Keterangan :

Gambar diatas adalah Gambaran Histologi Sel *Purkinje* Serebelum Tikus (Hematoksilin Eosin, Perbesaran 40x, dan luas lapang pandang $52 \times 39 = 2067 \mu\text{m}$).

Gambar 12. : Kelompok normal tanpa perlakuan.

Gambar 13. : Kelompok Normal + ikan kembung.

Gambar 14. : Kelompok hipotiroid tanpa pengobatan.

Gambar 15. : Kelompok hipotiroid + ikan kembung.

Gambar 16. : Kelompok hipotiroid dengan pengobatan tiroksin.

Gambar 17. : Kelompok hipotiroid dengan pengobatan tiroksin + ikan kembung.

Keterangan \rightarrow : Sel *purkinje*

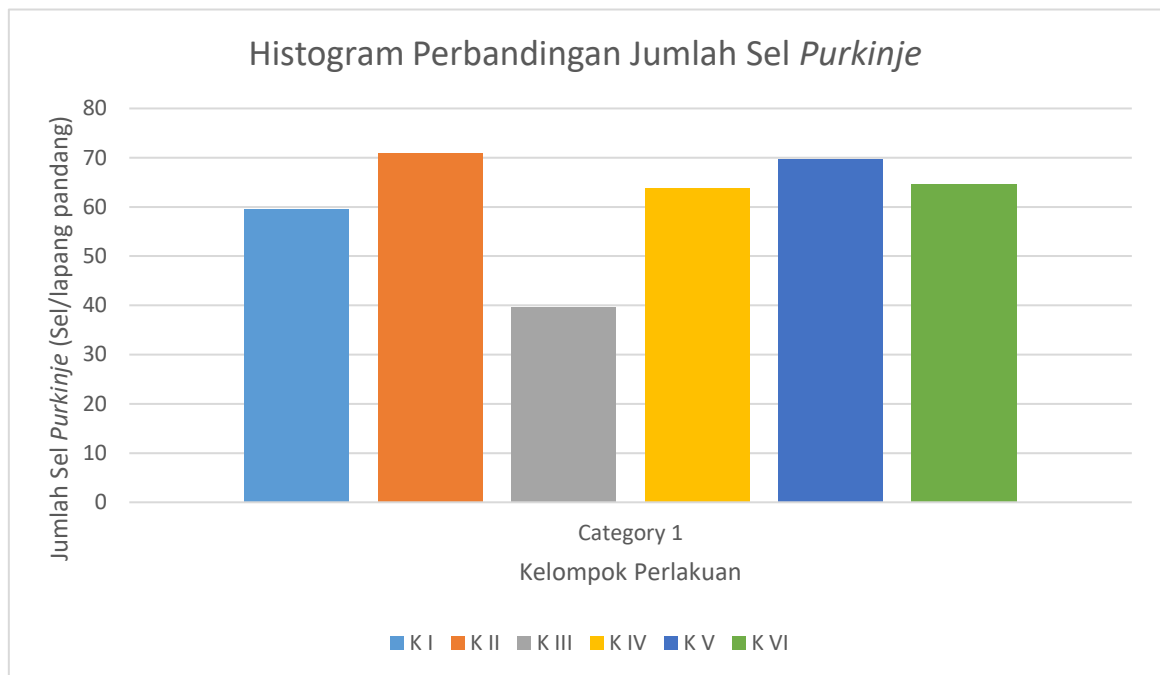
Pengambilan data dilakukan dengan pemeriksaan histologi untuk menghitung jumlah sel *purkinje* pada lapisan ganglionare serebelum setiap kelompok perlakuan. Pengambilan gambar dilakukan dengan mikroskop yang dilengkapi dengan kamera digital dengan perbesaran 40x dalam 5 lapang pandang dengan pengulangan sebanyak 3x.

Pada penelitian ini, nilai rata-rata kuantitatif dari hasil penghitungan sel *purkinje* seluruh kelompok hewan uji adalah sebesar 61, sedangkan jumlah rata-rata sel *purkinje* pada tiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata jumlah sel *purkinje* lapisan ganglionare serebelum ($X \pm SD$) anakan tikus per lapang pandang

No	Kelompok	Jumlah Sampel (n)	Rata-rata jumlah sel \pm SD (sel/lapang pandang)
1	Normal Tanpa Perlakuan	5	60 \pm 8
2	Normal + Ikan Kembung	5	71 \pm 11
3	Hipotiroid Tanpa Pengobatan	5	40 \pm 4
4	Hipotiroid + Ikan Kembung	5	64 \pm 5
5	Hipotiroid dengan Pengobatan Tiroksin	5	70 \pm 14
6	Hipotiroid dengan Pengobatan Tiroksin + Ikan Kembung	5	65 \pm 12

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa rata-rata jumlah sel *purkinje* pada *serebelum* terbanyak ada pada kelompok II dan yang terendah pada kelompok III.



Gambar 18. Histogram perbandingan jumlah sel *purkinje* serebelum ($\bar{x} \pm SD$) tikus dengan berbagai perlakuan

Keterangan :

KI : Normal tanpa perlakuan

KII : Normal + ikan kembung

KIII : Hipotiroid tanpa pengobatan

KIV : Hipotiroid + ikan kembung

KV : Hipotiroid dengan pengobatan tiroksin

KVI : Hipotiroid dengan pengobatan tiroksin + ikan kembung

Sebelum melanjutkan uji beda statistik, dilakukan uji normalitas dengan menggunakan metode deskriptif dan metode analitik uji *Sapiro-wilk* karena jumlah sampel 30. Hasil uji seluruh data menunjukkan bahwa $p = 0,704$ ($p > 0,05$) yang dapat dilihat di lampiran 2. Hal berarti menunjukkan distribusi jumlah sel *purkinje* normal, sehingga dapat dilanjutkan dengan menggunakan uji *One Way Anova*. Hasil *One Way Anova* menunjukkan terdapat perbedaan rata-rata jumlah sel *purkinje* yang bermakna di antara keenam kelompok tersebut yaitu $p = 0,001$ ($p < 0,05$). Setelah diketahui ada perbedaan bermakna diantar keenam kelompok

tersebut, selanjutnya dilakukan uji LSD (*Least Significant Difference*) dalam *post hoc test* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda.

Hasil uji LSD didapatkan adanya perbedaan bermakna pada K I dengan K III, K II dengan K III, K III dengan K IV, K III dengan K V, dan K III dengan K VI. Perbedaan yang tidak bermakna terlihat pada rata-rata jumlah sel *purkinje* antara perlakuan. Nilai Signifikasi antar perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 4. Nilai signifikansi antar perlakuan

Kelompok	K I	K II	K III	K IV	K V	K VI
K I		0,531	0,048*	0,989	0,644	0,970
K II	0,531		0,001*	0,874	1,000	0,928
K III	0,048*	0,001*		0,012*	0,001*	0,008*
K IV	0,989	0,874	0,012*		0,937	1,000
K V	0,644	1,000	0,001*	0,937		0,970
K VI	0,970	0,928	0,008*	1,000	0,970	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level

Keterangan :

KI : Normal tanpa perlakuan

KII : Normal + ikan kembung

KIII : Hipotiroid tanpa pengobatan

KIV : Hipotiroid + ikan kembung

KV : Hipotiroid dengan pengobatan tiroksin

KVI : Hipotiroid dengan pengobatan tiroksin + ikan kembung

C. Pembahasan

Pada penelitian ini, didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok hipotiroid terhadap kelompok normal, normal ikan kembung, hipotiroid ikan kembung, hipotiroid tiroksin, dan hipotiroid tiroksin ikan

kembang. Kelompok normal diharapkan menjadi acuan terhadap kelompok lain (kontrol), karena kelompok ini tidak mendapatkan perlakuan apapun, sehingga tidak terdapat hal yang dapat mempengaruhi jumlah dari sel *purkinje* pada lapisan ganglionare korteks serebelum.

Kelompok normal (kontrol) memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok hipotiroid nilai $p < 0,05$. Perbedaan jumlah rata-rata sel *purkinje* per lapang pandang pada kelompok tersebut adalah 60 dibanding dengan 40. Hal tersebut terjadi karena pada kelompok hipotiroid kekurangan hormone tiroid. Hormon tiroid diperlukan untuk mengembangkan system saraf pusat dan mengatur diferensiasi neuronal dan migrasi, *synaptogenesis*, dan *mielinisasi*. Kekurangan hormon tiroid ini akan mengurangi kemampuan motorik melalui pertumbuhan abnormal dan diferensiasi sel yang buruk dari otak kecil (Faustino & Carvalho, 2014). Hipotiroidism ini akan menyebabkan kerusakan otak yang irreversible. Otak hipotiroid menunjukkan ruang intraseluler dipadatkan dan penurunan berat otak. Pematatan ruang intraseluler ditandai berkurangnya pertumbuhan *aksonal* dan *arbor dendritik*. Di otak kecil, perkembangan koneksi *axodendritic* antara sel *Purkinje* dan neuron granul diatur oleh TH. Hypothyroidism akan menghasilkan perkembangan sel *purkinje* yang tidak normal (Anderson, 2008). Kekurangan hormone tiroid dalam serebelum akan menunda proliferasi dan migrasi dari sel-sel lapisan granul eksterna ke lapisan granular internal. Selain itu, kekurangan hormon tiroid mengurangi pertumbuhan *aksonal* dan *arborisasi dendritik* dalam korteks serebral, penglihatan dan korteks pendengaran, hipokampus, dan serebelum (Gong et al. 2010).

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) adalah *neurotrophin* yang nampak pada perkembangan serebelum. Thyroid hormone akan mengatur peningkatan BDNF di postnatal serebelum tikus (Neveu et al, 1996). Koibuchi et al. melaporkan bahwa Tiroid Hormon mengatur ekspresi BDNF menurut promotor dengan cara yang berbeda pada tahap perkembangan otak (Koibuchi et al. 1999). Di serebelum tersebut, ekspresi BDNF mRNA 1 telah ditekan oleh tiroid hormon pada postnatal 2, sedangkan mRNAs II, III dan IV diregulasi oleh tiroid hormon pada postnatal 15 dan 30. Efek fungsional dari tiroid hormon mungkin akan mengaktivasi BDNF selama perkembangan otak yang telah diuji secara *invivo*. BDNF dapat dilihat dan menunjukkan penundaan migrasi selsel granular dan defisit *dendritik arborization* sel *Purkinje* pada serebelum tikus hipotiroid. Penelitian lain menggunakan BDNF *overexpressing cell line* dan sel ini ditanamkan ke serebelum tikus pada postnatal 3. penanaman tersebut mengakibatkan ekspresi berlebihan dari BDNF di serebelum hipotiroid yang menyelamatkan sel-sel granular internal dari kematian sel akibat hipotiroidism. (Neveu et al, 1996).

Kelompok normal tidak memiliki perbedaan yang signifikan secara statistik jika dibandingkan dengan kelompok tiroksin. Hal ini tidak selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Pal et al, 2013 yang mengatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara jumlah kerusakan sel *purkinje* pada serebelum. Pal et al 2013 menunjukkan jumlah sel *purkinje* pada kelompok normal lebih banyak dibandingkan dengan kelompok yang diberikan obat standar. Terdapat perbedaan obat standar pada penelitian ini. Pal et al 2013 menggunakan *potassium iodide*

sebagai obat standar untuk menangani masalah hipotiroid, sedangkan penelitian ini menggunakan tiroksin.

Pada kelompok normal tidak memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok normal ikan kembung, walaupun terdapat peningkatan jumlah rata-rata sel *purkinje* pada serebelum. Kelompok ini tidak terjadi kerusakan yang signifikan karena tidak ada intervensi yang membuat sel *purkinje* di serebelum menjadi rusak.

Kelompok normal juga tidak memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok hipotiroid tiroksin ikan kembung. Hasil ini sesuai dengan penelitian pal et al. 2013, yang menyatakan bahwa kelompok normal tidak memiliki perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok hipotiroid yang mendapatkan terapi obat standar menggunakan *potassium iodide* yang dikombinasikan dengan suplemen omega-3.

Kelompok tiroksin dan hipotiroid tiroksin ikan kembung memiliki perbedaan yang signifikan. Pengganti hormon tiroksin (T4) akan terdeiodinasi menjadi *3,3',5-triiodo-L-thyronine* (T3) yang dilakukan oleh *type 2 deiodinase* (D2) yang terekspresi di otak. Hampir 80% T3 dihasilkan dari proses tersebut (Berbel et al, 2007). T3 memiliki peran sebagai *dendritogenesis* sel *purkinje* pada serebelum. T3 memiliki target gen yang memiliki program genetik untuk migrasi sel, proliferasi sel dan pematangan sel (Heuer and Mason, 2003). *Granular cell precursor* GCPs membutuhkan *T3-regulated neurotrophic factors* (*neurotrophin 3, insulin-like growth factor-1, Sonic hedgehog, and brain-derived neurotrophic*

factor) yang berfungsi untuk migrasi dan proliferasi sel tersebut menjadi sel *purkinje* (Doughty et al, 1998).

Pal et al. 2013 juga menyatakan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok hipotiroid yang dibandingkan dengan kelompok hipotiroid yang mendapatkan terapi obat standar dan yang mendapat terapi kombinasi obat standar dan omega-3. Akan tetapi, didalam penelitian tersebut menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok hipotiroid yang mendapatkan terapi obat standar dibandingkan dengan yang mendapatkan terapi kombinasi.

Kelompok normal ikan kembung dan hipotiroid ikan kembung juga memiliki perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok hipotiroid, hal ini disebabkan karena Ikan kembung memiliki kandungan omega 3 yang cukup tinggi, yaitu 2,6 gram per 100 gram ikan kembung. Kandungan yang dimiliki ikan kembung ini lebih tinggi dibandingkan ikan tuna, udang, dan ikan salmon (Nettleton, 1995).

Asam lemak *omega-3* sangat penting bagi pertumbuhan otak, terutama pada anatomi, histologi, dan aspek biokimia otak (Songour., 2004). Disamping itu. DHA yang berasal dari bahan makanan yang memiliki bahan dasar ikan ini bisa terlihat dan ditemukan pada membran seluler dari otak. DHA yang terdapat melimpah di otak ini terlibat dalam memodulasi komunikasi dari neuron-neuron otak (Simopoulos., 2000). Efek *ω 3-PUFA* endogen pada BDNF berkaitan dengan *autophagy* yang baru-baru ini telah dikaitkan dengan faktor *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) yang merupakan salah satu *neurotrophic* mamalia yang telah terbukti menjadi factor pertumbuhan yang bermanfaat bagi fungsi syaraf

(Chen et al. 2013). BDNF memberikan efek dengan cara mengikat *reseptor tirosin kinase B* (TrkB) dan p75 (lessman et al. 2009) (massa et al. 2010). BDNF yang matur memicu tiga *cascade* sinyal intraseluler, MAPK, PI3K, dan PLC γ yang dominan (Meng et al. 2005).

Dalam studi ini, terdapat tingkat BDNF yang lebih tinggi di serebelum tikus yang ditentukan oleh *immunoblotting*, sementara TrkB tidak berubah. Hasil ini diperkuat dengan peningkatan *immunofluorescence* dari intensitas BDNF, tetapi tidak dengan TrkB dalam sel *purkinje*. Efek trofik BDNF yang mengikat TrkB adalah karena aktivasi berbagai sinyal *cascade*, termasuk *extracellular signalregulated kinase* (ERK) termasuk jalur PI3K. dalam hal ini, jalur sinyal PI3K/Akt/mTOR/p70S6K dianggap penting dalam mengatur *autophagy* (Chen et al. 2013) (sun et al. 2008). Disaat ditemukan level BDNF lebih tinggi pada sel *purkinje* serebelum, lalu kemudian memonitor regulasi dari sinyal TrkB menggunakan Phospho-akt. Thr308 *phosphorylation* of Akt meningkat pada lemak tikus dibandingkan dengan kelompok control (Chen et al, 2013).

Untuk mengevaluasi lebih lanjut mengenai efek fosforilasi Akt, maka perlu memantau *Ser133 phosphorylation* dari *cAMP response element-binding protein* (CREB) sejak CREB menjadi target regulasi dari *protein kinase Akt28*. Pengaktifan CREB di Neuron dapat menstimulasi ekspresi dari molekul neuroprotektif, seperti *anti-apoptotic protein* dan Bcl-2, yang memiliki manfaat dalam kelangsungan hidup sel setelah iskemik atau zat neurotoksik (jin et al. 2001) (park et al. 2013). *Ser133 phosphorylation* dari CREB meningkat di serebelum tikus dibandingkan dengan control. Data-data ini mendukung bahwa pemberian ω 3 dapat menstimulasi

aktifitas BDNF dengan cara mengaktivasi Akt dan CREB dengan cara meningkatkan Thr308 phosphorylation dari Akt dan Thr 133 phosphorylation dari CREB (Bak et al, 2015).

Kelompok normal kembung tidak memiliki perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan hipotiroid ikan kembung, walaupun terdapat penurunan jumlah rata-rata sel *purkinje* serebelum. Ikan kembung yang memiliki omega 3 yang cukup tinggi dapat memperbaiki jumlah sel *purkinje* akibat kerusakan yang ditimbulkan oleh kekurangan iodium, sehingga pada kelompok hipotiroid ikan kembung, perbaikan jumlah sel *purkinje* hampir seperti kelompok normal yang di beri suplemen ikan kembung (Sinha, 2009).

Seseorang perlu untuk menambah suplemen yang bisa meningkatkan potensi kecerdasan dan bisa mencegah kerusakan otak. Ikan kembung memiliki kandungan omega-3 yang tinggi sehingga bisa digunakan oleh setiap orang untuk suplemen. Suplemen ini bisa digunakan oleh orang yang normal dan menderita hipotiroid. Pada orang normal, suplemen ini akan meningkatkan potensi kecerdasan dan menjaga kesehatan sel otak. Pada penderita hipotiroid, suplemen ini akan memperbaiki sel-sel otak, sehingga bisa meminimalisir dampak negatif yang diakibatkan oleh hipotiroid. Penelitian ini sesuai dengan tinjauan pustaka dan penelitian terdahulu dari Bak et al, 2015, Neveu et al, 1996 dan pal et al, 2013, dimana ikan kembung yang mengandung iodium dan omega-3 yang cukup tinggi dapat memperbaiki jumlah sel *purkinje* pada serebelum tikus hipotiroid kongenital.