

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hipotiroidisme adalah penyakit yang disebabkan defisiensi iodium, ditandai dengan tingginya antibodi terhadap peroksidase tiroid di sirkulasi, dan kegagalan kelenjar tiroid memproduksi hormon T3 dan T4 (Gunawan, 2012). Hipotiroidisme diklasifikasikan menjadi hipotiroidisme primer, sekunder, tersier, serta resistensi jaringan tubuh terhadap hormon tiroid. Hipotiroidisme primer disebabkan oleh kelenjar tiroid tidak mencukupi untuk produksi hormon tiroid, hipotiroidisme sekunder disebabkan oleh defisiensi hormon *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) yang dihasilkan oleh hipofisis, hipotiroidisme tersier disebabkan oleh defisiensi *Thyrotropin Releasing Hormone* (TRH) yang dihasilkan oleh hipotalamus (Devdhar, 2007).

Hipotiroidisme merupakan suatu penyakit kronis yang sering ditemukan dimasyarakat. Angka prevalensi hipotiroidisme di Indonesia cukup tinggi mengingat sebagian besar penduduk bermukim didaerah defisiensi iodium. Di negara Barat penyebab hipotiroidisme adalah *autoimun tiroiditis*. Angka prevalensi hipotiroidisme mencapai 10% sering menyerang pada wanita (Schott, 2006). Dalam studi *The Third National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III) yang dilakukan di Amerika Serikat angka prevalensi hipotiroidisme 4,6% dari 17.353 individu (0,3% adalah hipotiroidisme klinis dan 4,6% adalah hipotiroidisme subklinis) (Chistiakov, 2005).

Hipotiroidisme juga menyerang hewan, khususnya anjing yang dewasa dan usia lanjut, antara usia 4-10 tahun. Beberapa ras anjing dinilai memiliki

kecenderungan hipotiroid yang lebih kuat, yakni anjing yang berukuran tubuh antara sedang hingga besar dan tipe pemburu (Shiel, 2007). Menurut Elaine (2005) ras anjing yang terserang hipotiroidisme adalah *Doberman Pinscher*, *Golden Retriever*, *Irish Setter*, *Great Dane*, *Shetland sheepdog*, *Dachshund*, *Miniature schnauzer*, *Greyhounds*, *Cocker Spaniel*, *Poodle*, *Airedale Terriers*, dan *Boxer*. Pada anjing, 50% T3 berasal dari kelenjar tiroid, sementara separuh lainnya berasal dari jaringan-jaringan lain di dalam tubuhnya. Hipotiroidisme pada anjing lebih dari 95% disebabkan karena hipotiroidisme primer.

Gejala klinis hipotiroidisme sering tidak khas, hipotiroidisme dapat ditemukan pada orang normal atau penyakit-penyakit lain, sehingga untuk penegakan diagnosa dilakukan pemeriksaan fungsi tiroid. Pemeriksaan faal tiroid yang sudah tervalidasi adalah kadar TSH dan *free* T4. Kesalahan dalam mendiagnosa hipotiroidisme dapat menyebabkan efek yang tidak diinginkan oleh terapi hormon tiroid, sementara penyakit dasar yang sebenarnya tidak terdiagnosa. Gejala hipotiroidisme pada usia dewasa adalah cepat lelah, tidak tahan dingin, berat badan naik, konstipasi, gangguan siklus haid dan kejang otot (Purnamasari, 2007).

Ikan teri (*Stolephorus spp.*) adalah kelompok dari ikan pelagis berada di perairan pesisir yang tersebar sangat luas. Ukuran tubuh ikan teri (*Stolephorus spp.*) kecil, memanjang, umumnya tidak berwarna atau berwarna putih, memiliki sisik yang tipis (Nugrahani, 2014). Ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin mengandung *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) (Simopolus, 2002), protein 10,3 g per 100 g,

dan kalsium 972 mg per 100 g. Ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin juga terdapat kandungan iodium alami yang diharapkan efektif dalam membantu mengembalikan sintesis hormon tiroksin yang diakibatkan adanya penurunan kinerja tiroid.

Terapi hipotiroidisme dengan menggunakan ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin pada saat ini belum dilakukan penelitian. Oleh sebab itu, penelitian ini penting untuk dilakukan untuk mengetahui potensi pemberian ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin sebagai terapi hipotiroidisme berdasarkan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) dan gambaran histopatologi hypotalamus.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian adalah :

- 1.2.1 Apakah pemberian terapi ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin berpotensi meningkatkan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme?
- 1.2.2 Apakah pemberian terapi ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin berpotensi memperbaiki gambaran histopatologi hypotalamus pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme?

### 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini berdasarkan latar belakang di atas adalah:

1.3.1 Tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar digunakan sebagai hewan coba, jenis kelamin betina, berusia 8-12 minggu, berat badan 100-150 g, didapat dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) Universitas Gajahmada (UGM) Yogyakarta. Penggunaan hewan coba telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan No. 341-KEP-UB (Lampiran 1).

1.3.2 Tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan model hipotiroidisme diinjeksi tiroglobulin anjing secara *subcutan* pada daerah *cervical* dengan dosis 200 µg/ml menggunakan *Complete Freud's Adjuvant* (CFA) pada hari ke 0, dan menggunakan *Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA) pada hari ke 14 dan 28 (Zhou dan Gill, 2005).

1.3.3 Ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin dilakukan pengasinan sendiri. Terapi ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin dengan dosis 6 mg/kg BB dengan volume pemberian 0,5 ml/ekor/hari selama 7 hari untuk kelompok C, 14 hari untuk kelompok D, dan 21 hari untuk kelompok E diberikan secara peroral.

1.3.4 Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) dengan menggunakan imunohistokimia dan gambaran histopatologi hyphotalamus menggunakan pewarnaan HE.

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah :

- 1.3.1 Mengetahui potensi pemberian ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin terhadap ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme.
- 1.3.2 Mengetahui potensi pemberian ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin terhadap gambaran histopatologi hypotalamus pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukan penelitian ini adalah diharapkan dapat diketahui potensi pemberian ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin terhadap ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) dan gambaran histopatologi hypotalamus pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme. Penelitian ini juga diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin sebagai terapi alternatif pada manusia dan *pet animal* hipotiroidisme.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Hipotiroidisme Induksi Tiroglobulin Anjing

Hewan coba adalah setiap hewan yang khusus diternakan untuk digunakan pada penelitian biologis maupun biomedis yang dipilih berdasarkan syarat atau standart dasar yang dipergunakan dalam penelitian (Indon, 2013). Beberapa jenis hewan yang sering dipakai dalam penelitian yaitu kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), marmut (*Cavia parcellus*), mencit (*Mus musculus*), dan tikus (*Rattus norvegicus*).

Klasifikasi tikus putih (*Rattus norvegicus*) menurut (Myers dan Armitage, 2004) sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Galur	: <i>Wistar</i>

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah spesies hewan pengerat yang pada saat ini banyak digunakan sebagai hewan laboratorium strain tikus. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki kebutuhan asam amino essensial, sistem metabolisme, dan organ yang hampir sama dengan manusia. Morfologi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah memiliki berat badan antara 100 g hingga 300 g,

panjangnya 400 mm, rambut tubuh berwarna putih, mata berwarna merah, dan jantan lebih besar dari pada betina.

Teknik pembuatan hewan model dapat dengan beberapa cara diantaranya *spontaneous model*, *transplantation model*, dan *induced model*. Morel (2012) mengatakan bahwa hewan model AITD disebut dengan *experimental autoimmune thyroiditis* (EAT). Spontaneous model merupakan kondisi autoimmune thyroiditis yang muncul karena faktor lingkungan seperti tikus yang mengalami ion iodida berlebih dalam tubuh dan mengalami diabetes. *Transplantation* model diperoleh dengan melakukan penempelan jaringan tiroid dari donor ke hewan model. *Induced model* didapatkan dengan menginduksi *self-antigen* yang berupa tiroglobulin (TG), *thyroid peroxidase* (TPO) dan *thyroid stimulating hormone receptor* (TSHR) (Prummel, 2004).

Hewan model hipotiroidisme dibuat dengan cara menginduksi tiroglobulin (TG) anjing. Tiroglobulin merupakan glikoprotein yang menempati sebagian besar folikel koloid kelenjar tiroid (Suherman, 2007). Menurut Swain (2005) tiroglobulin (TG) merupakan sebuah glikoprotein 660 kDa yang terdiri dari dua subunit yang identik 330 kDa. Tiroglobulin (TG) disekresikan oleh sel-sel folikular tiroid ke lumen folikular dan disimpan sebagai koloid. Masing-masing molekul tiroglobulin (TG) memiliki kurang lebih 100 tirosin residu, yaitu iodinated. Iodinated merupakan pasangan residu untuk pembentukan hormon tiroid antara lain *triiodothyronine* (T3) dan *thyroxin* (T4) (Swain, 2005). Pada penelitian sebelumnya, *experimental autoimmune thyroiditis* (EAT) yang digunakan adalah hasil induksi dari tiroglobulin manusia, tiroglobulin babi (pTG), tiroglobulin

rodent, tiroglobulin tikus (mTG), tiroglobulin sapi (bTG), dan tiroglobulin kambing (cTG) (Song, 2010). Penggunaan tiroglobulin sebagai inducer dari beberapa spesies tersebut mempunyai kesamaan fisik dan struktur molekul. Oleh karena itu tidak menutup kemungkinan bahwa tiroglobulin anjing dapat menginduksi terjadinya penyakit hipotiroidisme.

## 2.2 Hipotiroidisme

Hipotiroidisme merupakan keadaan yang ditandai dengan terjadinya hipofungsi tiroid yang berjalan lambat dan diikuti oleh gejala-gejala kegagalan fungsi kelenjar tiroid. Keadaan ini terjadi akibat kadar hormon tiroid berada di bawah nilai optimal. Lebih dari 95% penderita hipotiroidisme mengalami hipotiroidisme primer yang mengacu kepada disfungsi kelenjar tiroid itu sendiri. Terjadinya terjadi hipofungsi kelenjar tiroid sejak lahir dapat menyebabkan kreatinisme (Smeltzer, 2002).

Penyebab hipotiroidisme yang paling sering ditemukan pada orang dewasa adalah *autoimun tiroiditis*, dimana sistem imun menyerang kelenjar tiroid. Pada *autoimun tiroiditis*, kelenjar tiroid hiperplasia dan hipotiroidisme terjadi beberapa bulan yang diakibatkan terjadi kerusakan pada kelenjar tiroid yang masih berfungsi. Pengobatan terhadap hipertiroidisme dengan cara pembedahan dapat menjadi penyebab terjadinya hipotiroidisme. Kekurangan iodium jangka panjang dalam makanan, menyebabkan hiperplasia kelenjar tiroid yang kurang aktif (Smeltzer, 2002).

Gejala klinis hipotiroidisme sering tidak khas, hipotiroidisme dapat ditemukan pada orang normal atau penyakit-penyakit lain, sehingga untuk penegakan diagnosis dilakukan pemeriksaan fungsi tiroid. Pemeriksaan faal tiroid yang sudah tervalidasi adalah kadar TSH dan *free* T4. Kesalahan dalam mendiagnosa hipotiroidisme dapat menyebabkan efek yang tidak diinginkan oleh terapi hormon tiroid, sementara penyakit dasar yang sebenarnya tidak terdiagnosis. Gejala hipotiroidisme pada usia dewasa adalah cepat lelah, tidak tahan dingin, berat badan naik, konstipasi, gangguan siklus haid dan kejang otot (Purnamasari 2007).

**Tabel 2.2** Gejala klinis hipotiroidisme berdasarkan sistem organ (Subekti, 2007)

Organ / Sistem Organ	Gejala Klinis
Kardiovaskuler	Bradikardia Gangguan kontraktilitas Penurunan curah jantung Kardiomegali
Respirasi	Astma Hipoventilasi Sleep apnea Efusi pleura
Gastrointestinal	Anoreksia Penurunan peristaltik usus
Ginjal	Penurunan laju filtrasi ginjal Hipoaretmia
Hematologi	Anemia
Neuromuskular	Kelemahan otot proksimal Berkurangnya refleks Gerakan otot melemah kesemutan
Endokrin	Gangguan pembentukan estrogen

### 2.3 Patomekanisme Hipotiroidisme

Patomekanisme hipotiroidisme adalah terjadinya proses kompleks yang melibatkan berbagai faktor yaitu, genetik, lingkungan, dan imunologi.

Menurunnya produksi antibodi pada sel-sel tiroid yang normal menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan kelenjar tiroid. Inflamasi awal terjadi karena adanya perubahan yang dipicu secara genetik pada tubuh yang terpapar oleh faktor lingkungan. Antigen MHC II menyajikan sel-sel dendritik dan makrofag, yang menyerang kelenjar tiroid setelah proses inflamasi awal. Beberapa dari autoantigen potensial, thyroglobulin merupakan protein utama yang diproduksi dalam jaringan tiroid, sebagai peran utama dalam patomekanisme hipotiroidisme. Tiroid peroksidase merupakan enzim yang mengkatalisis oksidasi iodium, juga berperan penting dalam patogenesis penyakit sebagai autoantigen (Akamizu, 2012). Proses autoimun menghasilkan T helper tipe 1 (Th1) respon imun mediate dan induksi apoptosis dari sel tiroid yang mengakibatkan hipotiroidisme. Kerusakan seluler terjadi karena limfosit T tersensitisasi (*sensitized T-lymphocyte*) dan/atau antibodi antitiroid berikatan dengan membran sel tiroid, mengakibatkan lisis sel dan reaksi inflamasi. Sedangkan gangguan fungsi terjadi karena interaksi antara antibodi antitiroid yang bersifat *stimulator* atau *blocking* dengan reseptor di membran sel tiroid yang bertindak sebagai autoantigen.

#### 2.4 Hipotalamus

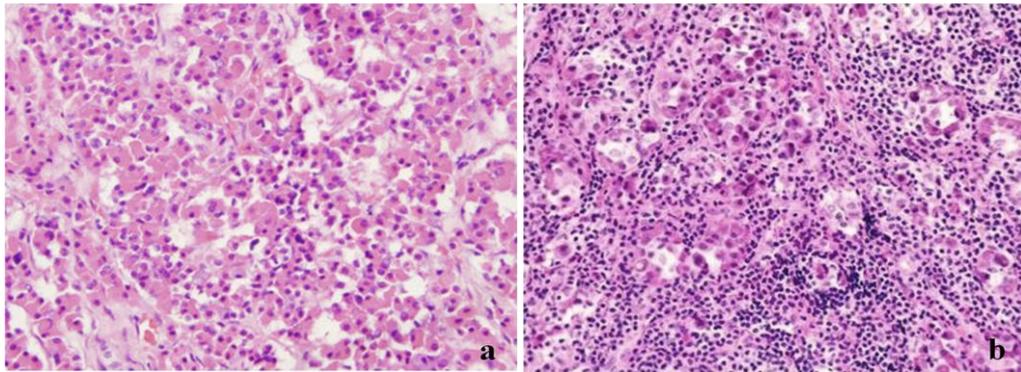
Hipotalamus adalah area kecil otak yang terletak dibagian otak depan yang disebut diensefalon. Hipotalamus adalah organ saraf dan organ endokrin. Hipotalamus berkaitan dengan mempertahankan lingkungan internal tubuh tetap stasis. Hipotalamus juga sangat penting dalam mengontrol perilaku dan memungkinkan respon yang tepat terhadap berbagai stimulus yang datang.

Hipotalamus secara terus-menerus menerima informasi dari sistem saraf pusat dan perifer mengenai suhu tubuh, nyeri, rasa nikmat, pemberian makanan, rasa lapar, massa tubuh, dan status metabolisme. Hipotalamus juga menerima *input* dari hormon lain dalam tubuh dan menerima ekstensi saraf dari area lain otak (Corwin, 2008).

Hipotalamus mengandung sejumlah nukleus neuron yang berguna untuk pengaturan sekresi hormon hipofisis (Greenstein dan Wood, 2010). Hipotalamus secara berurutan berespon terhadap semua stimulus yang datang dengan mengirim tonjolan saraf ke seluruh tubuh otak dan dengan mensintesis serta mensekresi hormonnya sendiri. Badan sel saraf di hipotalamus ventral mensintesis beberapa hormon dan mengirimnya ditonjolan akson untuk dilepaskan ke dalam darah dan disampaikan ke kelenjar hipofisis anterior. Badan sel saraf lain di hipotalamus mensintesis hormon yang dikirim ke bawah melalui tonjolan akson ke hipofisis posterior, tempat hormon tersebut disimpan sampai akhirnya dilepaskan ke dalam aliran darah. Dua rute ini ketika hipotalamus mengontrol pelepasan hormon oleh hipofisis anterior dan posterior (Corwin, 2008).

Hipotalamus melepaskan suatu hormon yang disebut *Thyrotropin Releasing Hormone* (TRH), yang mengirim sebuah signal ke pituitari untuk melepaskan *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH). Pada gilirannya, TSH mengirim sebuah signal ke tiroid untuk melepas hormon-hormon tiroid yaitu T3 dan T4. Kerusakan pada kelenjar tiroid akibat autoimmune dapat menyebabkan penurunan produksi hormon T3 dan T4. Pembentukan hormon T3 dalam plasma akan menurun, ikatan hormon T3 dengan reseptor tiroid  $\alpha 1$  akan melemah

sehingga tidak dapat terjadi *feedback negative*. Apabila pada tiroid kekurangan asupan iodium untuk pembentukan hormon tiroid maka akan terjadi penurunan T3 dan T4, stimulus oleh hipotalamus meningkat untuk menstimulasi TSH dan TRH, dapat menyebabkan hipotiroidisme.



**Gambar 2.4.** Hipotalamus normal dan hipotiroid tikus dengan pewarnaan HE perbesaran 400x

Keterangan : a). Hipotalamus normal. b). Hipotalamus pada keadaan hipotiroid, ditandai dengan adanya infiltrasi monosit dan makrofag dari proliferasi sel mikroglia. (Thorner, 2008).

Monosit adalah sel darah putih yang beredar dalam darah, masuk ke jaringan infeksi melewati membran kapiler. Fungsi monosit adalah untuk bergerak menuju sel patogen tertentu. Menempelkan untuk patogen merangsang produksi pseudopodium. Monosit dewasa berkembang menjadi makrofag. Makrofag adalah sel besar yang mampu mencerna bakteri dan sisa sel dalam jumlah yang besar. Makrofag berfungsi dalam memfagositosis sel darah merah dan sel darah putih yang lisis. Sel mikroglia merupakan sel yang berasal dari jaringan mesenkim di hipotalamus. Sel mikroglia berfungsi secara normal untuk melakukan fagositosis.

## 2.5 Tiroid Reseptor $\alpha 1$ (TR- $\alpha 1$ )

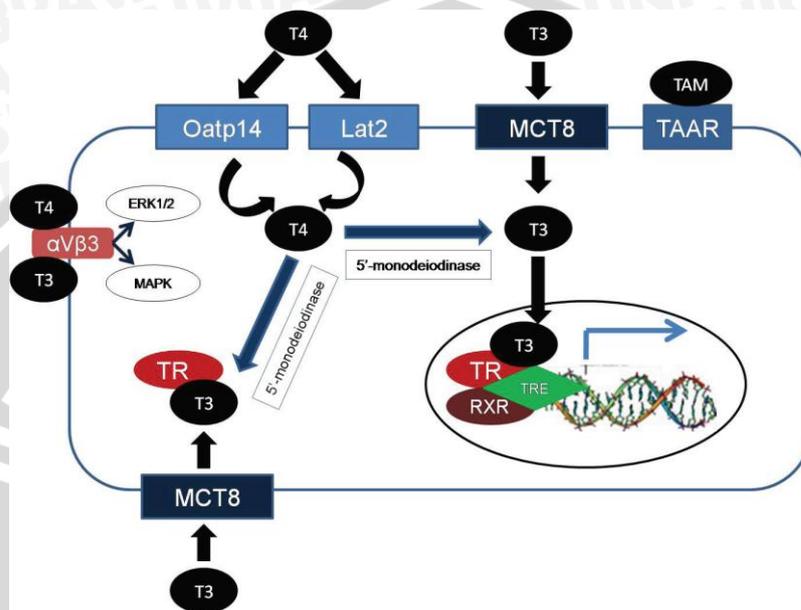
Hormon T3 dan T4 ekstraseluler masuk ke dalam sitoplasma sel target difasilitasi oleh protein transporter hormon tiroid yang ditemukan di membran plasma. Transporter T4 ada dua, yaitu Lat2 dan Oatp14, sedangkan transporter T3 adalah MCT8. Hormon T4 yang telah berikatan dengan kedua transporter mengalami deiodinasi menjadi T3 atau dekarboksilasi menjadi TAM. Dalam sitoplasma T3 yang berikatan dengan MCT8 dan T3 yang berasal dari iodinasi berikatan dengan reseptor hormon tiroid yang terdapat dalam nukleus (Hartopo, 2013). Tiroid reseptor (TR) merupakan faktor transkripsi nukleus yang mengenali sekuens DNA-spesifik promoter pada gen target T3 (Leonard, 2010).

**Tabel 2.5** Distribusi isoform tiroid reseptor (TR) pada berbagai organ tubuh dan kadar ekspresivitasnya (Leonard, 2010 dalam Hartopo, 2013).

Isoform (TR)	Organ Yang Mengekspresi	
	Kadar Tinggi	Kadar Rendah
TR $\alpha 1$	Otak	Ginjal, otot skeletal, paru, jantung, testis, hati
TR $\alpha 2$	Otak	Ginjal, otot skeletal, paru, jantung, testis, hati
TR $\beta 1$	Ginjal, hati, otak, jantung, tiroid	Otot skeletal, paru, limpa
TR $\beta 2$	Otak, retina, telinga dalam	Paru, jantung
TR $\beta 3$	Ginjal, hati, paru	Otot skeletal, limpa, otak, jantung

Terdapat dua isoform tiroid reseptor (TR), yaitu TR- $\alpha$  dan TR- $\beta$ . Ekspresi dan distribusi isoform berbeda pada organ tubuh. Tiroid reseptor  $\alpha$  (TR- $\alpha$ ) memiliki dua bentuk yaitu TR- $\alpha 1$  dan TR- $\alpha 2$ . Tiroid reseptor  $\beta$  juga terdapat 2 bentukan yaitu TR- $\beta 1$  dan TR- $\beta 2$  (Flamant, 2006). TR- $\alpha$  dan TR- $\beta$  tersebut memiliki fungsi yang berbeda yaitu pada TR- $\alpha$  akan bertanggung jawab sebagai reseptor aktif dalam proses metabolisme sel, sedangkan pada TR- $\beta$  berperan

dalam pembentukan jaringan (Murray, 2000). Menurut Weitzel dan Iwen (2011) peranan yang paling besar dalam aktivasi hormon tiroid T3 dalam sel target untuk melakukan metabolisme sel adalah tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ).



Gambar 2.5 Mekanisme aksi hormon tiroid (Hartopo, 2013)

Tiroid reseptor berikatan dengan *Thyroid Hormone Response Elements* (TRE) dalam gen target T3. *Thyroid Hormone Response Elements* (TRE) merupakan sekuens heksanukleotid yang terintegrasi dalam promotor gen target T3. Ikatan TR dengan TRE dapat berupa homodimer (TR-TRE) atau membentuk heterodimer dengan *Retinoid X Receptor* / RXR (TR-RXR-TRE). Hormon T3 dalam sitoplasma mengalami translokasi ke dalam nukleus dan berikatan dengan TR. Selain dalam nukleus, TR juga ditemukan dalam mitokondria, yang merupakan varian dari TR- $\alpha$ . Tiroid reseptor  $\alpha$  (TR- $\alpha$ ) berikatan dengan TRE dan T3 untuk memulai proses transkripsi dalam gen mitokondria (Weitzel dan Iwen, 2011). Ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) akan meningkat pada saat kondisi hipertiroidisme yang terjadi akibat adanya peningkatan pembentukan hormon di

dalam kelenjar tiroid. Peningkatan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) akan mempengaruhi metabolisme di dalam sel target dengan meningkatkan metabolisme sel (Flamant, 2006).

## 2.6 Hubungan Tiroid Reseptor $\alpha 1$ (TR- $\alpha 1$ ) Dengan Hipotiroidisme

Pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model hipotiroidisme terjadi adanya gangguan sintesis hormon tiroid yaitu T3 dan T4 yang sangat hebat. Kelenjar tiroid tidak mampu menghasilkan T3 dan T4 secara normal, terjadi penurunan pada pembentukan T3 dan T4. Pada keadaan hipotiroidisme waktu paruh T4 semakin panjang karena penurunan jumlah T4 dalam tubuh.

Hipotiroidisme dapat disebabkan karena kekurangan asupan iodium dalam tubuh untuk memproduksi hormon tiroid, karena iodium merupakan zat esensial agar tiroid dapat berfungsi dengan normal. Ketika kelenjar tiroid tidak dapat memproduksi hormon tiroid, maka akan terjadi penurunan pada pembentukan hormon tiroid. Secara normal, sebagian besar T4 diubah menjadi T3 dalam plasma, tiroid reseptor  $\alpha 1$  berikatan dengan *Tyroid Receptor Elements* (TRE) pada T3 di hipotalamus, sehingga dapat terjadi *feedback negative*. Berkurangnya T3 dalam plasma darah akan menurunkan ikatan tiroid reseptor  $\alpha 1$ , sehingga ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  pada penderita hipotiroidisme akan mengalami penurunan.

## 2.7 Ikan Teri (*Stolephorus spp*) Asin

Ikan adalah salah satu sumber protein hewani yang paling penting, sebagai sumber vitamin dan mineral serta beberapa kandungan didalamnya yang sangat

berguna untuk pertumbuhan. Ikan merupakan komoditas yang tidak tahan lama dan kualitasnya juga dapat menurun secara cepat. Menurut Musa (2010), pelestarian ikan untuk mempertahankan kualitasnya dapat dilakukan dengan cara konvensional yaitu pengasinan dan pengeringan. Produk ikan asin telah terbukti aman untuk dikonsumsi. Proses pengasinan dan pengeringan bertujuan untuk menurunkan aktivitas air dengan cara mengangkut garam ke dalam tubuh ikan yang diatur oleh berbagai faktor fisik dan kimia seperti difusi, osmosis, dan serangkaian proses kimia dan biokimia (Sinduja, 2013). Komposisi nutrisi ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin kering terdiri dari berbagai bahan antara lain protein, lemak, vitamin, kalsium, dan air (Tabel 2.7).

**Tabel 2.7** Komposisi ikan teri (*Stolephorus spp.*) per 100 g bahan (Direktorat Gizi, 1990)

Kandungan Gizi	Jenis Olahan		
	Segar	Kering Tawar	Kering Asin
Energi (Kkal)	77	331	193
Protein (g)	16	68,7	42
Lemak (g)	1	4,2	1,5
Kalsium (mg)	500	2381	2000
Fosfor (mg)	500	1500	300
Besi (mg)	1	23,4	2,5
Vitamin A (RE)	47	62	-
Vitamin B (RE)	0,05	0,1	0,01
Air (%)	80	16,7	40

Spesies umum yang banyak dijumpai pada famili Engraukididae adalah (*Stolephorus heterolobus*), (*Stolephorus devisii*), (*Stolephorus buccaneeri*), (*Stolephorus indicus*), dan (*Stolephorus commersonii*). Ikan teri (*Stolephorus spp.*) bersifat pelagis dan berada di pesisir dan estuaria, ikan teri (*Stolephorus spp.*) lebih suka hidup bergerombol. Ikan teri (*Stolephorus spp.*) memiliki

kandungan protein sebanyak 16%. Menurut Young (1962) dan De Bruin (1994) dalam Hastuti (2010), klasifikasi ikan teri adalah sebagai berikut :

Filum	: Chordata
Sub-Filum	: Vertebrae
Kelas	: Actinopterygii
Ordo	: Clupeiformess
Famili	: Engraukididae
Genus	: <i>Stolephorus</i>
Spesies	: <i>Stolephorus spp.</i>

**Tabel 2.8** Standar mutu ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin kering (SNI, 1992)

Jenis Analisa	Persyaratan Mutu
Organoleptik	
- Nilai minimum	7,0
- Kapang	Negatif
Mikrobiologi	
- Jumlah bakteri (TPC) koloni/g	$1 \times 10^5$ koloni/g
- <i>Escherichia coli</i> (APM/g)	3 g
- <i>Salmonella</i>	Negatif
- <i>Staphylococcus aureus</i>	Negatif
- <i>Vibrio cholera</i>	Negatif
Kimia	
- Air (%)	40%
- Garam (%)	15%
- Abu tak larut dalam asam (%)	0,3%

Ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin adalah ikan teri (*Stolephorus spp.*) segar yang mengalami perlakuan pencucian, penggaraman, dengan perebusan atau tanpa perebusan dan pengeringan (BSN, 1992). Ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin memiliki memiliki beberapa kelebihan dari ikan yang lain (Afrianto dan Liviawaty, 1989). Kandungan ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin antara lain

*Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA), asam amino, protein, iodium, taurine, vitamin A, vitamin D, mineral (kalsium dan selenium) serta karotenoid (Susanto, 2012). Kandungan PUFA dalam ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin berfungsi sebagai efek anti inflamasi, khususnya pada penyakit autoimun (Pigott dan Tucker, 1987; Horrocks dan Yeo, 1999; Simopoulos, 2002; Shapiro, 2003).

**Tabel 2.9.** Persentase jumlah *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) pada ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin (g/100g) (Venugopal dan Shahidi, 1996 dalam Venugopal, 2010).

≤ 0.5 %	0.6-1.0 %	≥ 1.0 %
Cod Atlantik	Makerel Atlantik	Ikan Teri
Atlantic Pollock	Channel Catfish	Herring Atlantik
Ikan Manyung	Indian Makerel	Salmon Atlantik
Haddock	Kakap Merah	Tuna Sirip Biru
Oil Sardine	SilverHake	Makerel Pasifik
Cod Pacific	Spiny Dogfish	Herring Pasifik
Halibut Pacific	Ikan Cucut Pedang	Pink Salmon
Rockfish	Torbot	Rainbow Trout
Ikan Cakalang	Tuna Trout	
Sole		
Yellow Perch		

*Polyunsaturated fatty acid* (PUFA) merupakan asam lemak tidak jenuh ganda yang mengandung dua atau lebih ikatan rangkap yang memiliki dua bentuk paling umum yaitu *eicosapentaenoic* (EPA) dan *docosaheksaenoic* (DHA). *Eicosapentaenoic* (EPA) dan *docosaheksaenoic* (DHA) dapat menghambat aktivasi faktor transkripsi yaitu *nuclear factor kappaB* (NF-κB). *Nuclear factor kappaB* (NF-κB) berfungsi untuk mengatur sintesis dari sitokin proinflamasi (Zhao *et al.*, 2004; Chapkin *et al.*, 2009). Simopoulos (2002) juga berpendapat bahwa PUFA pada ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin berfungsi menghambat fungsi dari *Antigen Presenting Cell* (APC) dan menghambat produksi sitokin

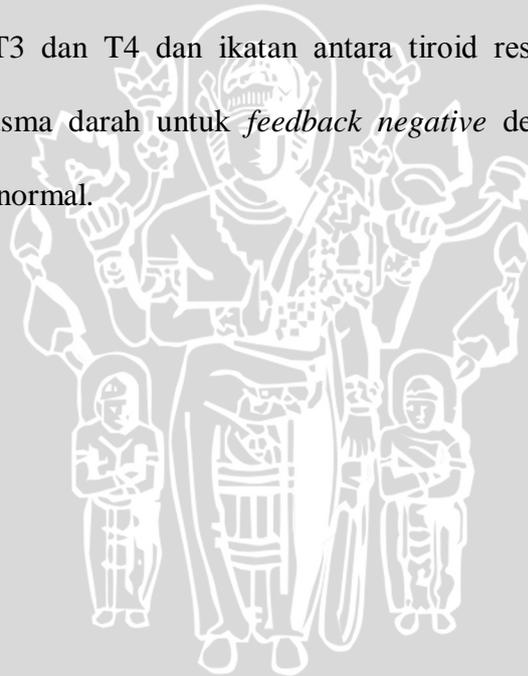
proinflamasi yang berlebihan dalam proses inflamasi. Ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin yang dikonsumsi harus layak konsumsi.

## 2.8 Potensi Ikan Teri (*Stolephorus spp.*) Sebagai Terapi Hipotiroidisme

Pada ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin, garam merupakan faktor utama dalam proses penggaraman dan pengeringan. Sebagai bahan pengawet dalam proses pengeringan, kemurnian garam sangat mempengaruhi mutu ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin yang dihasilkan (Liviawaty, 2005). Menurut Tutianvia (2006), penentuan kadar garam NaCl dapat dilakukan dengan cara Kohman, yaitu dengan prinsip mengekstraksi sampel sehingga garam NaCl dipisah dengan lemak kemudian dititrasikan.

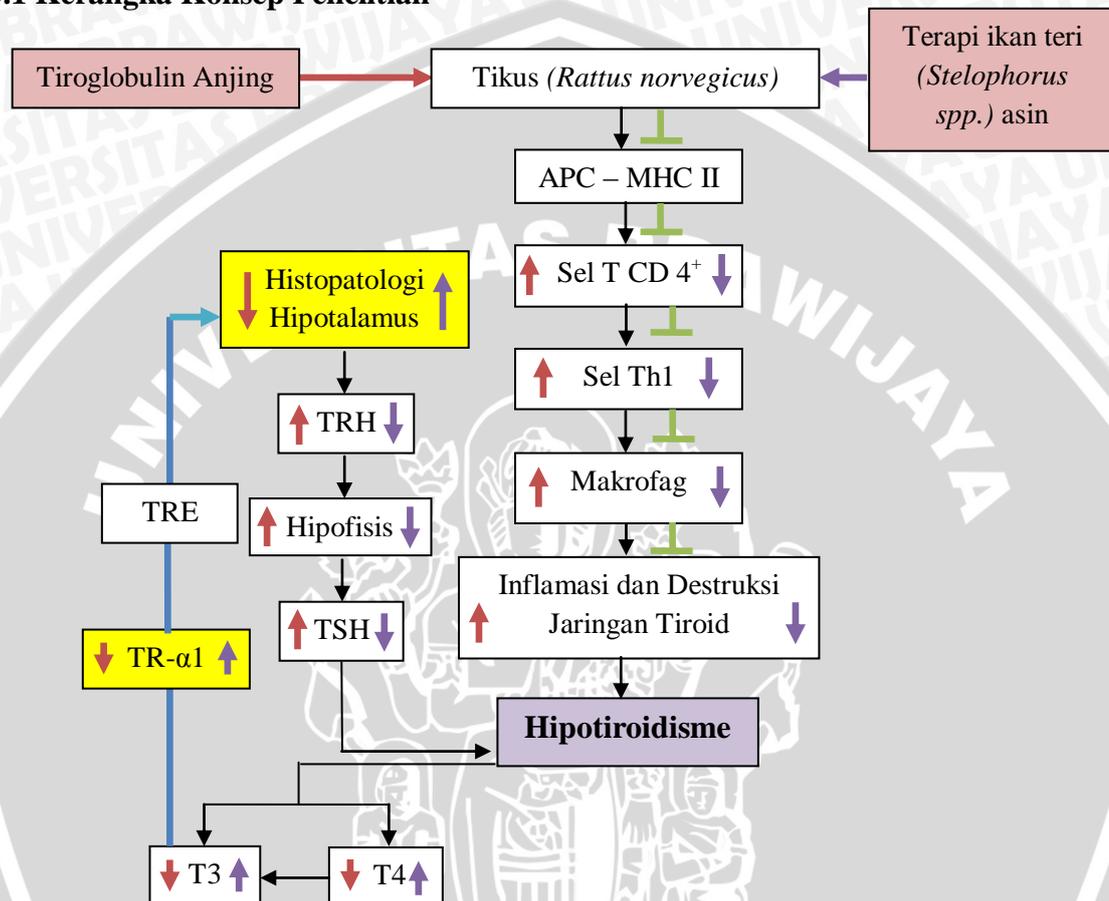
Kandungan *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang terdapat pada ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin berperan dalam menghambat fungsi dari *Antigen Presenting Cell* (APC) dan menghambat produksi sitokin proinflamasi yang berlebihan dalam proses inflamasi (Simopolus, 2002). Pada saat PUFA menghambat APC, maka makrofag akan mengalami penurunan dan jaringan kelenjar tiroid mengalami perbaikan. Penurunan respon imun pada sel tiroid akan menurunkan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada saat terjadi *feedback negative* pada hipotalamus, sehingga terjadi perbaikan pada destruksi jaringan. *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) berfungsi untuk meningkatkan fluiditas membran sel, dengan membran sel yang normal maka fungsi dari kelenjar tiroid akan berjalan normal, sehingga dapat terjadi *feedback negative* pada hipotalamus.

Kandungan iodium pada ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin dimungkinkan dapat menyuplai iodium pada penderita hipotiroidisme. Pada penderita hipotiroidisme, tiroid mengalami kekurangan asupan iodium sehingga terjadi penurunan pada proses pembentukan hormon T3 dan T4, stimulasi TRH dan TSH meningkat, ikatan antar tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR-  $\alpha 1$ ) dengan T3 dalam plasma darah untuk menghasilkan *feedback negative* pada hipotalamus dan hipofisis anterior menurun. Diharapkan terapi ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin dapat menyuplai asupan iodium di dalam tubuh sehingga kelenjar tiroid mampu membentuk hormon T3 dan T4 dan ikatan antara tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) dengan T3 dalam plasma darah untuk *feedback negative* dengan hipotalamus dapat berjalan dengan normal.



## BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan Gambar :

: Variabel bebas

: Variabel tergantung

↕ : Efek pemberian ikan teri (*Stelophorus spp.*) asin

↕ : Efek injeksi tiroglobulin anjing

→ : *Feedback negative*

⊥ : Mengalami hambatan

Tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan model hipotiroidisme diinjeksi dengan tiroglobulin anjing. Tiroglobulin anjing berperan sebagai *self*-antigen dan target antibodi anti-tiroid pada kondisi hipotiroidisme. Tiroglobulin anjing yang diinjeksikan diproses dalam *Antigen presenting Cell* (APC) menjadi peptida karena memiliki struktur kimia dan biokimia yang hampir sama, lalu diangkut melalui sistem limfatik. Antigen yang telah dikenali oleh *Antigen presenting* (APC) akan diikat dan dipresentasikan melalui MHC-II agar dikenali dan diikat oleh sel T CD4<sup>+</sup>. Sel T CD4<sup>+</sup> berdiferensiasi menjadi sel efektor Th1 dan Th2. Pada kasus hipotiroidisme sel Th1 lebih dominan. Sel Th1 mensekresikan IFN- $\gamma$  yang meningkatkan makrofag, sehingga memacu inflamasi dan kerusakan kelenjar tiroid (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Inflamasi dan kerusakan kelenjar tiroid menyebabkan terjadinya penurunan pembentukan hormon T3 dan T4, sehingga kadar hormon T3 dan T4 dalam tubuh menurun. Hormon T4 yang dikeluarkan oleh kelenjar tiroid akan mengalami deiodinasi menjadi T3 yang lebih reaktif. Hormon T3 yang berasal dari iodinasi berikatan dengan TR yang terdapat dalam nukleus. Tiroid reseptor akan berikatan dengan *Thyroid Hormone Response Element* (TRE) pada gen target T3, pada kasus ini gen target adalah hipotalamus (Hartopo, 2013). Greenspan (1999) menjelaskan bahwa tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) berfungsi untuk menangkap hormon T3. Hormon T3 yang menurun menyebabkan penurunan fungsi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ). Kadar TRH dan TSH meningkat disebabkan oleh tidak adanya *feedback negative* pada hipotalamus dan hipofisa anterior. Tiroid reseptor

$\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) yang membawa T3 tidak mampu masuk ke dalam hipotalamus karena tidak adanya *feedback negative*.

Ikan teri (*Stolephorus spp*) asin mengandung *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang berperan dalam menghambat fungsi dari *Antigen Presenting Cell* (APC), sehingga terjadi hambatan pada sel Th1 untuk mensekresikan IFN- $\gamma$ , maka makrofag mengalami penurunan dan terjadi hambatan pada aktivasi IFN- $\gamma$ . Respon imun yang menurun pada sel-sel tiroid menyebabkan perbaikan pada kerusakan kelenjar tiroid. Terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin yang mengandung iodium pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme dimungkinkan dapat mengembalikan hormon T3 dan T4 sehingga terjadi *feedback negative* antara kelenjar tiroid dan hipotalamus. Kemampuan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) untuk mengikat T3 akan meningkat, sehingga T3 dapat dibawa ke hipotalamus dan terjadi *feedback negative*. Pada hipotalamus akan terjadi perbaikan dari infiltrasi sel monosit dan makrofag dari proliferasi sel mikroglia yang disebabkan oleh menurunnya TRH dan TSH untuk mengikat hipotalamus. *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) berfungsi untuk meningkatkan fluiditas membran sel, dengan membran sel yang normal maka fungsi dari kelenjar tiroid akan berjalan normal, sehingga dapat terjadi *feedback negative* pada hipotalamus

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang ada, maka hipotesis dari penelitian yang dapat diajukan sebagai berikut :

- 3.2.1 Pemberian ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme berpotensi meningkatkan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR-  $\alpha 1$ )
- 3.2.2 Pemberian ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme berpotensi memperbaiki hipotalamus



## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2015 sampai dengan Juni 2015 di Laboratorium Fisiologi Hewan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Laboratorium Kimia FMIPA Institut Sepuluh November Surabaya, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya Malang, dan RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

### 4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bak pemeliharaan hewan coba, tempat minum hewan coba, aluminium foil, *disetting set*, *blue and yellow tips*, mikropipet, mortar, pestel, *sputit*, sentrifugator, spektrofotometer, vorteks, sonikator, *magnetic stirrer*, *microtube*, labu ukur, object glass, *cover glass*, *centrifuge tube*, *autoclave*, neraca analitik, *disposable syringe*, oven, refrigerator, mikroskop cahaya, timer, glove, isolasi, tissue, tabung, nanometer, plastik, dan inkubator.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar, tiroglobulin anjing, ikan teri (*Stolephorus spp.*), garam beriodium 80 ppm, *Phosphate Buffer Saline Tween-Phenyl Metane Sulfonyl Fluoride* (PBST-PMSF), pasir kuarsa, Tris-HCl pH 6,8, *Complete Freud's Adjuvant* (CFA), *Incomplete Freud's Adjuvant* (IFA), *Phosphate*

*Buffer Saline* (PBS), PBS Asida, NaCl fisiologis, alkohol bertingkat (70%, 80%, 90%, 100%), *parafor-maldehyde* (PFA) 10%, xylol, etanol, parafin, *peroxidase block*-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (K0679-Dako-USA), *bovine serum albumin* (BSA) 1%, anti-rat TR- $\alpha$ 1, antibodi sekunder *anti rabbit labelled biotin*, *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase* (SA-HRP), *diamino benzidine* (DAB) cromagen, *Mayer's Hematoxylin Eosin*, entellan, dan *aquadest*.

### 4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Isolasi dan perhitungan kadar tiroglobulin anjing
3. Injeksi tiroglobulin anjing pada tikus (*Rattus norvegicus*)
4. Perhitungan kadar iodium dalam ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin
5. Perhitungan dosis ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin
6. Terapi tikus (*Rattus norvegicus*) dengan ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin
7. Pengambilan organ hipotalamus
8. Pembuatan preparat histopatologi dan imunohistokimia
10. Pengamatan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha$ 1 (TR- $\alpha$ 1) dan gambaran histopatologi hipotalamus
11. Analisis Data

## 4.4 Prosedur Penelitian

### 4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Rancangan acak lengkap digunakan apabila objek yang dipergunakan dalam penelitian seragam (Kusriningrum, 2008). Hewan coba dalam penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan (Tabel 4.1)

**Tabel 4.1** Kelompok Perlakuan

Kelompok Tikus	Perlakuan
<b>A</b>	Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) kontrol negatif, yaitu tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) tanpa perlakuan
<b>B</b>	Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) kontrol positif, yaitu tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) perlakuan injeksi tiroglobulin anjing (CTg) pada hari ke-0, hari ke-14, dan hari ke-28 dengan dosis 200 µg/ml.
<b>C</b>	Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) model hipotiroidisme hasil injeksi tiroglobulin anjing (CTg) pada hari ke-0, hari ke-14, dan hari ke-28 dengan dosis 200 µg/ml dan diterapi ikan teri ( <i>Stolephorus spp.</i> ) asin dengan dosis 6 mg/kg selama 7 hari.
<b>D</b>	Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) model hipotiroidisme hasil injeksi tiroglobulin anjing (CTg) pada hari ke-0, hari ke-14, dan hari ke-28 dengan dosis 200 µg/ml dan diterapi ikan teri ( <i>Stolephorus spp.</i> ) asin dengan dosis 6 mg/kg selama 14 hari.
<b>E</b>	Tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) model hipotiroidisme hasil injeksi tiroglobulin anjing (CTg) pada hari ke-0, hari ke-14, dan hari ke-28 dengan dosis 200 µg/ml dan diterapi ikan teri ( <i>Stolephorus spp.</i> ) asin dengan dosis 6 mg/kg selama 21 hari.

Penelitian ini menggunakan hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) betina strain Wistar berumur 8-12 minggu dengan berat badan 100-150 g. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus:

$$P(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

$$n = 4$$

Keterangan:

P = banyaknya perlakuan yang dicoba

n = banyaknya ulangan yang diperlukan

Berdasarkan rumus perhitungan estimasi besar sampel di atas maka 5 kelompok perlakuan membutuhkan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali ulangan dalam setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan ulangan sebanyak 4 kali ulangan dalam setiap kelompok, sehingga jumlah tikus (*Rattus norvegicus*) yang digunakan adalah 20 ekor. Ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin diperoleh dari Sendang Biru, Malang. Variabel yang terdapat dalam penelitian ini antara lain :

- a. Variabel kontrol : jenis kelamin tikus, berat badan tikus, umur tikus, pakan, kandang, air minum
- b. Variabel bebas : pemberian tiroglobulin anjing dan dosis terapi ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin
- c. Variabel tergantung : ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ), gambaran histopatologi hypothalamus

Hewan coba dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari dengan pemberian pakan ransum basal pada semua tikus. Komposisi ansum basal disusun berdasarkan standar *Association of Analytical Communities* (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin, dan air. Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri

serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24°C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

#### 4.4.2 Isolasi dan Penentuan Kadar Tiroglobulin Anjing

Organ tiroid anjing dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali, dan ditimbang 0,5 g dipotong-potong kecil kemudian diletakkan pada mortar dingin. Ditambahkan 1 ml PBST-PMSF serta pasir kuarsa secukupnya, gerus organ dengan pestel dan diratakan. Tambahkan homogenat dengan 4 ml PBST-PMST kemudian dipindahkan ke dalam *microtube* dan direkatkan dengan isolasi. Homogenat disonifikasi selama 5 menit, disentrifus dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit. Pindahkan supernatan ke dalam tabung *microtube* baru, lalu ditambahkan etanol absolute (1:1). Dibiarkan di dalam *freezer* selama 24 jam. Setelah 24 jam supernatan disentrifus 10.000 rpm selama 15 menit. Etanol dibuang dan sisa endapan dikeringkan. Ditambahkan *buffer* Tris-HCl pH 6,8 (1:1) pada endapan protein, divortex selama 5 menit dan disimpan pada *freezer*. Pengukuran kadar tiroglobulin anjing digunakan dengan menggunakan metode uji *nano drops*. Supernatan yang telah divorteks diambil dengan menggunakan pipet mikrometer, ditempatkan pada nano drop spektrofotometer sebanyak satu tetes. Perhitungan dilakukan pada nano drop spektrofotometer, sehingga kadar tiroglobulin anjing dapat diketahui (Amin dkk., 2009).

#### 4.4.3 Perhitungan Dosis dan Metode Injeksi Tiroglobulin Anjing Pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

Pada penelitian sebelumnya telah ditentukan mengenai dosis tiroglobulin anjing yang dipergunakan untuk memberikan efek hipotiroidisme pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) yaitu 200 µg/ml. Diemulsikan dengan CFA atau IFA (1:1) (Zhou dan Gill, 2005), sehingga volume tiroglobulin anjing yang diinjeksi pada tikus (*Rattus norvegicus*) sebanyak 0,2 ml/ekor. Kelompok perlakuan B, C, D, dan E diinjeksi tiroglobulin anjing yang diemulsikan dengan CFA (1:1) dilakukan pada *subcutan* didaerah *cervical* pada hari ke-0 dan tiroglobulin anjing yang diemulsikan dengan IFA (1:1) diinjeksikan pada hari ke-14 dan 28.

#### 4.4.4. Terapi Ikan Teri (*Stolephorus spp.*) Asin Pada Hewan Model Tikus (*Rattus norvegicus*) Hipotiroidisme

Ikan teri (*Stelophorus spp.*) diperoleh dari Sendang Biru Malang, dilakukan pengasinan sendiri tanpa dilakukan penambahan pengawet makanan. Pengasinan dilakukan dengan penambahan garam beriodium 80 ppm dengan perbandingan (2:1). Dilakukan perendaman selama 24 jam dan dikeringkan selama 7 hari. Pemberian terapi dimulai pada minggu ke delapan setelah injeksi tiroglobulin anjing, melalui mulut dengan disonde. Terapi ikan teri (*Stelophorus spp.*) asin diberikan kepada tikus (*Rattus norvegicus*) model hipotiroidisme melalui sonde modifikasi langsung ke lambung dengan volume pemberian 0,5 ml/ekor/hari. Kelompok A dan B tidak dilakukan terapi ikan teri (*Stelophorus spp.*) asin, kelompok C dilakukan terapi selama 7 hari dengan dosis 6 mg/kg BB,

kelompok D dilakukan terapi selama 14 hari dengan dosis 6 mg/kg BB, dan kelompok E dilakukan terapi selama 21 hari dengan dosis 6 mg/kg BB.

#### 4.4.5. Pengambilan Organ Hipotalamus

Hipotalamus diambil dari hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme kelompok A pada minggu pertama, kelompok B pada minggu keenam, kelompok C pada minggu kedelapan, kelompok D pada minggu kesembilan, dan kelompok E pada minggu kesepuluh. Langkah-langkah dari pengambilan hipotalamus adalah dengan melakukan euthanasia pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme dengan cara dislokasi *vertebrae cervicalis*, dilanjutkan dengan melakukan pembedahan pada bagian kepala, kemudian diambil organ otaknya. Organ dibilas dengan menggunakan NaCl fisiologis dan simpan dalam larutan *paraformaldehid* (PFA) 10%.

#### 4.4.6. Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi Hipotalamus

Tahap pembuatan preparat histopatologi terdiri dari beberapa, yaitu tahap fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, *embedding*, *sectioning*, penempelan di gelas objek, dan pewarnaan hematoxilin eosin (Janquiera dan Carneiro, 2007) (Lampiran 7).

Setelah tahapan di atas selesai, dapat dilihat hasil pembuatan preparat histopatologi hipotalamus yang diamati secara visual menggunakan mikroskop *Olympus BX51* dengan perbesaran 400x, kemudian dibandingkan penghitungan per luas bidang pandang pada 5 lapang pandang. Tujuan dari pengamatan

histopatologi hipotalamus adalah untuk mengamati adanya infiltrasi sel inflamasi pada hipotalamus.

#### 4.4.7. Pembuatan dan Pengamatan Preparat Imunohistokimia

Pembuatan preparat imunohistokimia ada beberapa tahap, antara lain tahap deparafinisasi yaitu, preparat direndam dalam larutan xylol (2 kali), etanol absolut (2 kali), alkohol 70%, alkohol 30% dan aquades steril masing-masing selama 2 menit. Preparat kemudian disimpan selama 24 jam pada suhu 4°C. Pencucian preparat dilakukan setelah disimpan dengan menggunakan PBS pH 7,4 (3x5 menit) lalu direndam dalam 3% Hidrogen Peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) selama 10 menit dan dicuci kembali dalam PBS pH 7,4 (3x5 menit), lalu direndam dalam 2% BSA selama 1 jam pada suhu ruang. Preparat ditetesi dengan antibodi primer, *anti-rat TR-α1* (dalam BSA 1% dalam PBS) 1:100 dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam.

Preparat dikeluarkan dari refrigerator dan dibiarkan selama 30 menit dalam suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Proses selanjutnya adalah penambahan antibodi sekunder, *anti rabbit labelled biotin* dalam PBS (1:200) selama 1 jam pada suhu ruang, dan dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Ditambahkan *Strep Avidin Horse Radish Peroxidase (SA-HRP)* dalam PBS (1:500) selama 40 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit). Penambahan kromogen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) selama 20 menit pada suhu ruang lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 (3x5 menit) dilakukan setelah dilakukan penambahan SA-HRP. Dilakukan *counterstaining* dengan pewarna Meyer Hematoxylin secukupnya hingga warna

biru terlihat lalu dibilas dengan air (2x5 menit) dan aquades steril 1x5 menit lalu dibiarkan semalam dalam suhu ruang. Hari berikutnya dilakukan *mounting* dengan *entellan* (Ramos,2005) (Lampiran 6). Hasil akhir diamati dibawah mikroskop cahaya *Olympus BX51* dengan perbesaran 400x dan didokumentasikan.

#### 4.5 Analisa Data

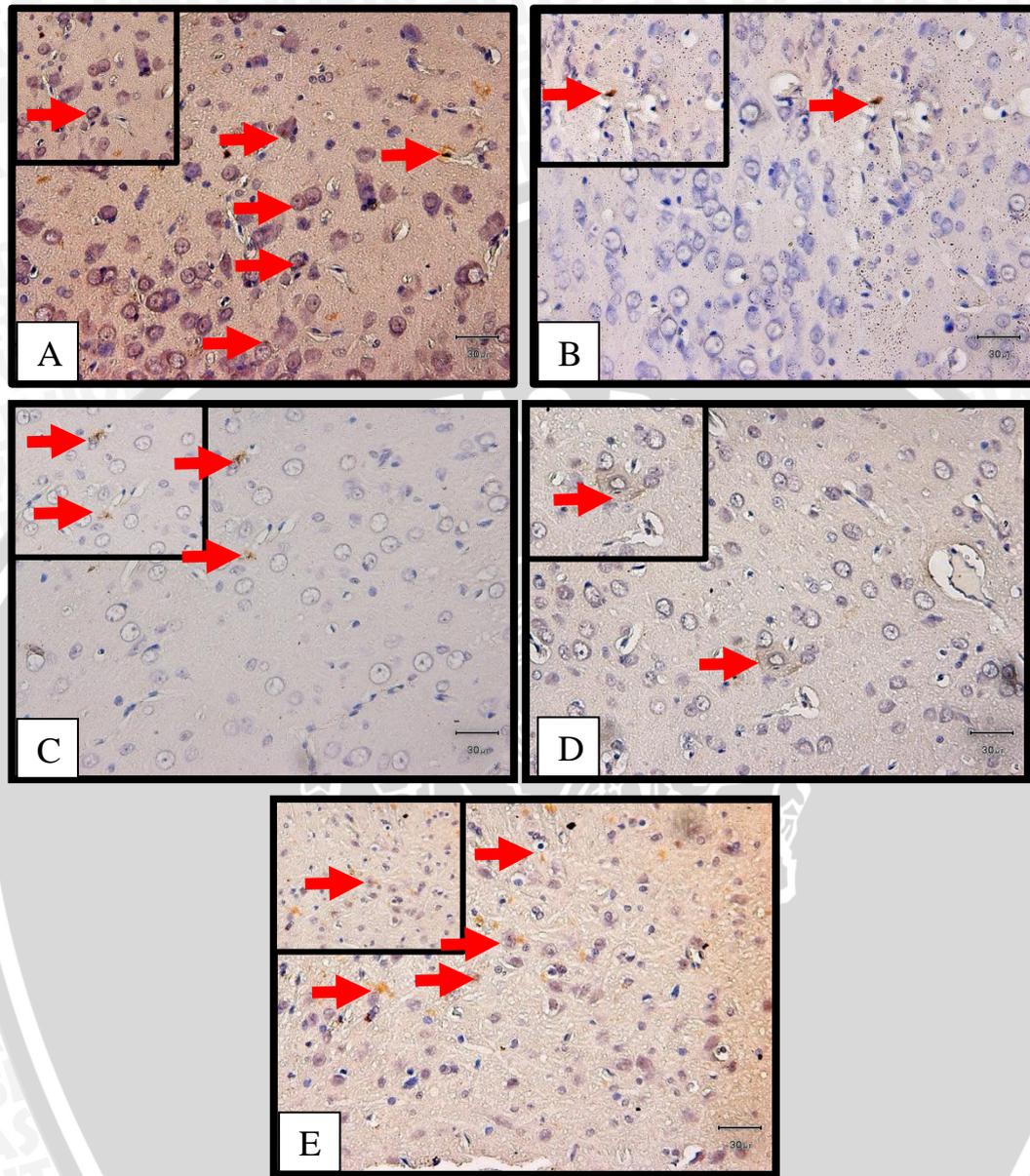
Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif ditujukan untuk gambaran histopatologi hipotalamus yang akan dianalisis serta disajikan secara deskriptif. Data kuantitatif untuk mengetahui ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) yang diolah dengan *immunoratio* kemudian akan disajikan dan dianalisis dengan SPSS 16.0 *Edition for windows* yang akan di analisis dengan ragam ANOVA. Uji Tukey ( $\alpha=0,05$ ) sebagai uji lanjutan apabila terdapat perbedaan nyata dalam penelitian tersebut.

## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Ekspresi Tiroid Reseptor $\alpha 1$ (TR- $\alpha 1$ ) Pada Hewan Model Tikus (*Rattus norvegicus*) Hipotiroidisme Yang Diterapi Ikan Teri (*Stolephorus spp*) Asin

Ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada hipotalamus diamati dengan metode imunohistokimia. Hasil yang diekspresikan adalah spesifik berwarna coklat, karena adanya ikatan antigen TR-  $\alpha 1$  dengan antibodi primer (anti-*goat* TR- $\alpha 1$ ) dilabel menggunakan antibodi sekunder. Warna coklat yang dihasilkan karena adanya penguraian substrat kromagen *Diaminobenzidinedan* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ramos, 2005). Penguraian substrat tersebut terjadi karena adanya penambahan enzim peroksidase dalam *Strep-Avidin Horse Radis Peroxidase* (SA-HRP).

Ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) dengan pewarnaan imunohistokimia menghasilkan endapan berwarna coklat (Ramos, 2005) yang dapat dilihat pada nukleus sel mikroglia. Hartopo (2013) menyatakan bahwa hormon T3 akan berikatan dengan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) di nukleus. Tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) merupakan reseptor aktif yang bertanggung jawab dalam proses metabolisme sel (Murray, 2000). Pada kondisi normal tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) berekspresi untuk melakukan metabolisme sel dan melakukan *feedback negative* antara hipotalamus – hipofisa – tiroid (Weitzel dan Iwen, 2011). Pada saat terjadi kerusakan jaringan tiroid maka hormon T3 yang dibentuk akan menurun dan ikatan antara T3 dan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) juga menurun, sehingga menyebabkan tidak terjadinya *feedback negative* dan proses metabolisme sel menurun.



**Gambar 5.1** Ekspresi Tiroid Reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada Hipotalamus Tikus Model Hipotiroidisme Yang Diterapi Ikan Teri (*Stolephorus spp*) Asin (400x)

Keterangan : (A) Hipotalamus hewan model kontrol negatif, (B) Hipotalamus hewan model hipotiroidisme, (C) Hipotalamus hewan model hipotiroidisme dengan terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 7 hari, (D) Hipotalamus hewan model hipotiroidisme dengan terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 14 hari, dan (E) Hipotalamus hewan model hipotiroidisme dengan terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 21 hari. ➡ ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ).

Ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada kelompok kontrol negatif muncul dalam jumlah yang banyak (Gambar 5.1). Pada kondisi normal hipotalamus terdapat sel mikroglia berasal dari jaringan mesenkim yang berfungsi sebagai fagositosis. Ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada kelompok kontrol positif hipotiroidisme mengalami penurunan dan merupakan jumlah yang paling sedikit. Hal ini disebabkan karena adanya penurunan ikatan T3 dan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) yang disebabkan oleh kerusakan kelenjar tiroid. Ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) meningkat secara bertahap pada kelompok yang diterapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin sesuai dengan waktu pemberian 7 hari, 14 hari, dan 21 hari dengan dosis 6mg/kg BB (Gambar 5.1). Hal ini disebabkan karena terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin yang mengandung Omega-3 PUFA dan kandungan iodium. Omega-3 *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) dalam ikan teri (*Stolephorus spp*) asin berfungsi untuk meningkatkan fluiditas membran sel (Simopolus 2002), dan kandungan iodium dalam ikan teri (*Stolephorus spp*) asin berfungsi untuk sintesis hormon tiroid (T3 dan T4) (Akamizu, 2012). Sehingga, fungsi kelenjar tiroid akan berjalan dengan normal dan terjadi *feedback negative* antara hipotalamus – hipofisa – kelenjar tiroid (Corwin, 2009).

Ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) ditandai dengan warna coklat diukur melalui presentase area menggunakan *software immunoratio*. Presentase area ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) tersebut terbentuk akibat adanya ikatan antigen dan antibodi. Pemberian terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme dapat meningkatkan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada hipotalamus (Tabel 5.1)

**Tabel 5.1** Ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) hipotalamus pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme yang diterapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Ekspresi Tiroid Reseptor $\alpha 1$ (%)	Peningkatan Terhadap B (%)	Penurunan Terhadap A (%)
(A) Kontrol negatif	54,98 $\pm$ 0,78 <sup>d</sup>	-	-
(B) Kontrol positif hipotiroidisme	21,11 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	-	160
(C) Tikus hipotiroidisme, terapi ikan teri ( <i>Stolephorus spp</i> ) asin selama 7 hari	28,40 $\pm$ 0,87 <sup>b</sup>	34	-
(D) Tikus hipotiroidisme, terapi ikan teri ( <i>Stolephorus spp</i> ) asin selama 14 hari	35,07 $\pm$ 1,34 <sup>c</sup>	66	-
(E) Tikus hipotiroidisme, terapi ikan teri ( <i>Stolephorus spp</i> ) asin selama 21 hari	52,87 $\pm$ 0,91 <sup>d</sup>	150	-

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ( $p < 0,05$ )

Rata-rata nilai ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) antara kelompok kontrol negatif (A) dengan kelompok hipotiroidisme yang diinduksi tiroglobulin anjing (B) tidak sama dan menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ( $p < 0,05$ ). Rata-rata ekspresi tiroid reseptor (TR- $\alpha 1$ ) pada kelompok hipotiroidisme yang diinduksi tiroglobulin anjing (B) paling rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya dan mengalami penurunan 160% terhadap kelompok kontrol negatif (A). Hal ini menunjukkan bahwa induksi tiroglobulin anjing yang diberikan pada hari ke 0, 14, dan 21 dapat menyebabkan terjadinya hipotiroidisme (Zhou dan Gill, 2005).

Terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 7 hari (C), 14 hari (D), dan 21 hari (E) pada tikus hipotiroidisme yang diinduksi tiroglobulin anjing memiliki

rata-rata ekspresi tiroid reseptor yang tidak sama antar perlakuan dan menunjukkan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) antar kelompok perlakuan. Terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin dosis 6mg/kg BB yang diberikan selama 21 hari (E) memiliki rata-rata yang tidak sama antar kelompok perlakuan, menunjukkan tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok kontrol negatif (A) dan mengalami peningkatan paling tinggi terhadap kelompok hipotiroidisme (B) sebesar 150% dibandingkan kelompok terapi lainnya, dan merupakan terapi yang efektif untuk hipotiroidisme.

Kelompok kontrol negatif (A) memiliki nilai rata-rata ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR-  $\alpha 1$ )  $54,98 \pm 0,78$ . Nilai tersebut menunjukkan bahwa ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) dalam keadaan normal. Pada kondisi normal, kelenjar tiroid memproduksi hormon T3 dan T4, dimana hormon T4 mengalami deiodinasi menjadi T3 yang aktif. Hormon T3 dalam sitoplasma translokasi ke dalam nukleus dan berikatan dengan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada sel target T3 (Hartopo, 2013). Tiroid reseptor berfungsi sebagai reseptor aktif dalam metabolisme sel (Murray, 2000).

Rata-rata ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada kelompok hipotiroidisme yang diinduksi tiroglobulin anjing (B)  $21,11 \pm 0,96$  dan menunjukkan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol negatif (A). Induksi tiroglobulin anjing dengan dosis 200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  mengakibatkan terjadinya penurunan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) sebesar 160% terhadap kelompok kontrol negatif (A) dan merupakan nilai ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) paling rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Rata-rata ekspresi tioid

resptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) yang rendah mengindikasikan adanya aktivasi sel-sel imun akibat induksi tiroglobulin anjing 200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , sehingga terjadi destruksi dan inflamasi pada kelenjar tiroid (Flamant, 2006). Sel-sel imun yang teraktivasi akan diekspresikan oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) melalui MHC II. *Antigen Presenting Cell* (APC) yang aktif akan menginisiasi makrofag untuk mensekresi sitokin yang merangsang inflamasi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010). Inflamasi kelenjar tiroid menyebabkan kelenjar tiroid tidak dapat mengikat iodium sehingga terjadi penurunan produksi hormon T3 dan T4. Menurunnya hormon T3 dan T4 mengakibatkan ikatan antara T3 dengan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) juga menurun (Flamant, 2006).

Kelompok tikus hipotiroidisme yang diterapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 7 hari (C) memiliki rata-rata ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) yang masih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol negatif (A) dan kelompok hipotiroidisme (B) (Tabel 5.1). Tikus hipotiroidisme yang diterapi ikan teri asin (*Stolephorus spp*) selama 7 hari (C) mengalami peningkatan sebesar 34% terhadap kelompok hipotiroidisme (B). Hal ini sebanding dengan lama waktu pemberian ikan teri (*Stolephorus spp*) asin yang sangat tergantung pada kandungan iodium sebagai bahan baku kelenjar tiroid dalam memproduksi hormon T3 dan T4 (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010), serta kandungan Omega-3 PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) dalam menghambat fungsi APC (*Antigen Precenting Cell*) dan meningkatkan fluiditas membran (Simopolus, 2002).

Rata-rata ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada kelompok tikus hipotiroidisme yang diterapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 14 hari (D)  $35,07 \pm 1,34$  dan berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dibandingkan kelompok kontrol positif (A), kelompok hipotiroidisme (B), dan kelompok terapi 7 hari (C). Ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) tikus hipotiroidisme yang diterapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 14 hari (D) mengalami peningkatan terhadap kelompok hipotiroidisme (B) sebesar 66% (Tabel 5.1).

Kelompok hipotiroidisme yang diterapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 21 hari (D) memiliki rata-rata ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) yang tinggi dibandingkan dengan kelompok terapi yang lain dan menunjukkan tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok kontrol negatif (A) namun berbeda nyata dengan ( $p < 0,05$ ) kelompok hipotiroidisme (B), kelompok terapi 7 hari (C), dan 14 hari (D). Ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada tikus hipotiroidisme yang diterapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 21 hari mengalami peningkatan sebesar 150% terhadap kelompok hipotiroidisme. Perbedaan lama pemberian terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin berpengaruh terhadap ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ). Semakin lama ikan teri (*Stolephorus spp*) asin diberikan, maka semakin tinggi kandungan iodium dan Omega-3 PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*). Ikan teri (*Stolephorus spp*) asin yang diberikan dalam jangka waktu yang lama akan memasok kandungan iodium dalam kelenjar tiroid sehingga kelenjar tiroid dapat berfungsi dengan normal dalam memproduksi hormon T3 dan T4. Hormon T3 akan berikatan dengan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) di nukleus sel target secara normal (Murray, 2003). Oleh karena itu semakin lama

waktu terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin, semakin tinggi ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ). Kandungan omega-3 PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) memiliki kemampuan untuk menghambat (*Antigen Presenting Cell*) APC dan meningkatkan fluiditas membran sel (Simopolus, 2002).

Sehingga dapat disimpulkan bahwa terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 21 hari dengan dosis 6 mg/kg BB merupakan waktu terbaik dalam meningkatkan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada tikus hipotiroidisme yang diinduksi tiroglobulin anjing dengan dosis 200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pemberian ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 21 hari telah memenuhi asupan kebutuhan iodium untuk memproduksi hormon T3 dan T4. Hormon T4 akan mengalami deidnansi menjadi T3, hormon T3 akan berikatan kembali dengan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) di nukleus sel target (Leonard, 2010). Tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) adalah reseptor aktif dalam proses metabolisme, sehingga *Feedback negative* dapat berjalan dengan normal (Corwin, 2009). Selain itu, suplay kandungan Omega-3 PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang diperlukan untuk menghambat *Antigen Presenting Cell* (APC) dan meningkatkan fluiditas membran telah tercapai, sehingga kelenjar tiroid dapat berfungsi dengan normal.

Pewarnaan imunohistokimia yang ditunjang dengan data analisa statistika menunjukkan bahwa terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin berpotensi dalam meningkatkan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada tikus hipotiroidisme. Hasil pewarnaan imunohistokimia menunjukkan adanya bentukan warna coklat pada nukleus hipotalamus yang tinggi dan tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ) pada kelompok kontrol negatif (A) dengan tikus hipotiroidisme diterapi ikan teri (*Stolephorus*

*spp*) asin selama 21 hari dengan dosis 6 mg/kg BB. Hal tersebut dikarenakan kandungan iodium yang berfungsi sebagai bahan baku dalam memproduksi hormon T3 dan T4 (Simopolus, 2002). Hormon T3 yang dihasilkan akan berikatan dengan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada nukleus sel target dan akan menyebabkan terjadinya metabolisme sel yaitu *feedback negatif* antara hipotalamus – hipofisa – tiroid berjalan dengan normal (Corwin, 2009), serta pengaruh terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin yang mengandung Omega-3 PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang berperan menghambat *Antigen Presenting Cell* (APC), sebagai antiinflamasi, meregulasi sitokin serta protein proinflamasi. Waktu pemberian terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin yang paling efektif untuk meningkatkan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) adalah 21 hari, dengan dosis 6 mg/kg BB.

### **5.2 Gambaran Histopatologi Hipotalamus Pada Hewan Model Tikus (*Rattus norvegicus*) Hipotiroidisme Yang Diterapi Ikan Teri (*Stolephorus spp*) Asin**

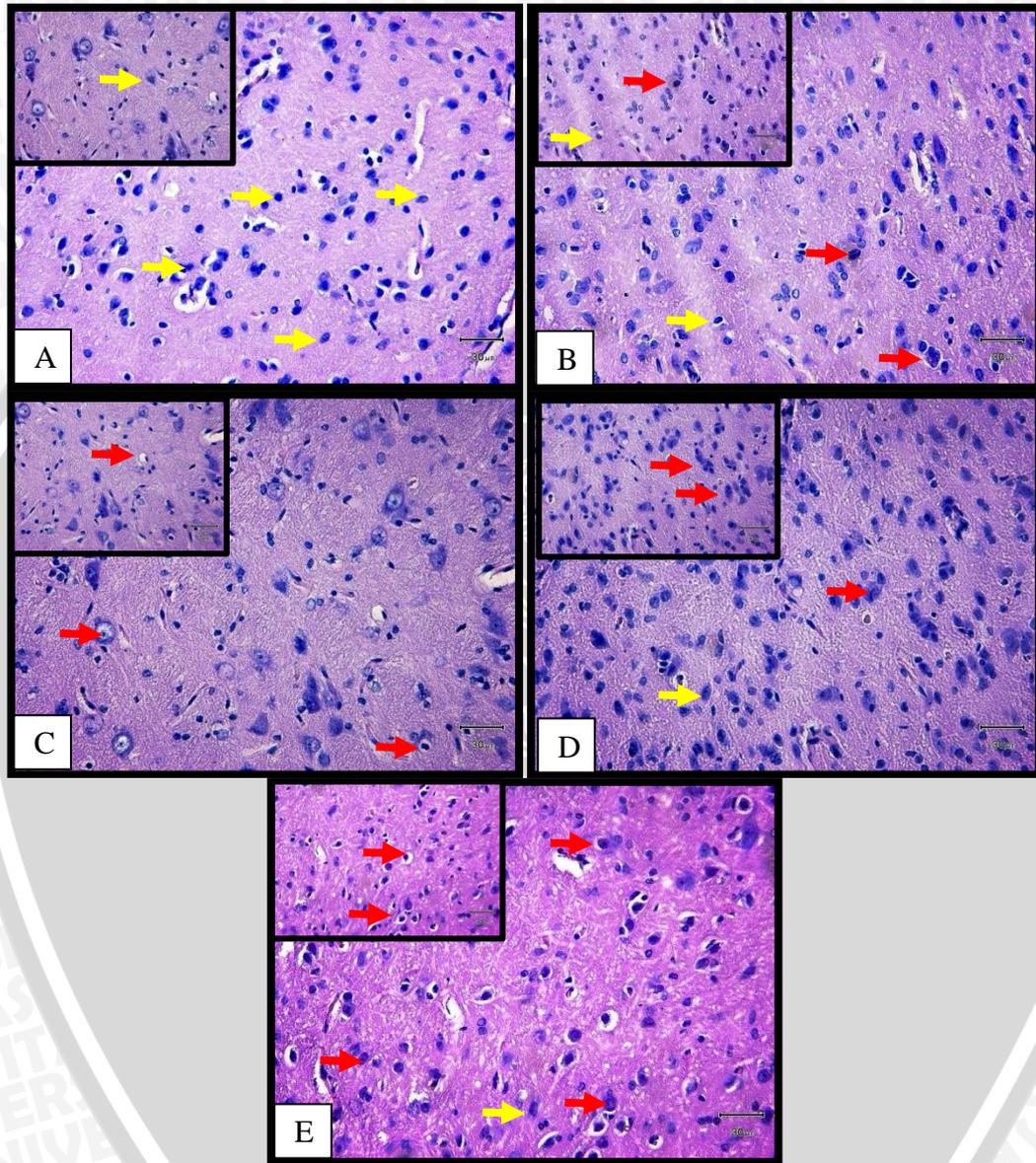
Gambaran histopatologi hipotalamus pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme yang diterapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin dapat diketahui dengan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE). Pengamatan dilakukan dengan perbesaran 400x. Gambaran histologi hipotalamus terdiri dari sel mikroglia. Sel mikroglia adalah sel kecil yang berbentuk memanjang dan memiliki bentuk inti yang panjang dan memadat. Sel mikroglia berfungsi untuk surveilans kekebalan dalam hipotalamus dan fagositosis mononuklear (Djuwita dan Riyacumala, 2012).

Pada kondisi hipotiroidisme gambaran histopatologi hipotalamus terjadi infiltrasi sel monosit dan makrofag dari proliferasi sel mikroglia dari jaringan mesenkim hipotalamus (Thorner, 2008). Monosit adalah sel darah putih yang beredar dalam darah, masuk ke jaringan infeksi melewati membran kapiler. Fungsi monosit adalah untuk bergerak menuju sel patogen tertentu. Menempelkan untuk patogen merangsang produksi pseudopodium. Monosit dewasa berkembang menjadi makrofag. Makrofag adalah sel besar yang mampu mencerna bakteri dan sisa sel dalam jumlah yang besar. Makrofag berfungsi dalam memfagositosis sel darah merah dan sel darah putih yang lisis (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Pengamatan pada preparat hipotalamus hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme yang diterapi dengan ikan teri (*Stolephorus spp.*) asin adalah adanya infiltrasi sel monosit dan makrofag dari proliferasi sel mikroglia. Gambaran histopatologi hipotalamus mengalami penurunan infiltrasi sel monosit dan makrofag dari proliferasi sel mikroglia setelah dilakukan terapi dengan menggunakan ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 7 hari, 14 hari, dan 21 hari (Gambar 5.2).

Tikus yang diinduksi tiroglobulin anjing (CTg) dosis 200  $\mu$ l/ml akan diproses dalam *Antigen Presenting Cell* (APC) menjadi peptida dan diangkut melalui sistem limfatik. Hal tersebut diakibatkan antigen tiroglobulin anjing memiliki kesamaan dengan tiroglobulin tikus dan menyebabkan antibodi tiroglobulin anjing mengenali tiroglobulin tikus sebagai antigen. Setelah adanya pengenalan antara antibodi dengan antigen maka akan terjadi reaksi autoimun dan selanjutnya antibodi (Ab-tiroglobulin anjing) akan mengikat tiroglobulin tikus dan

akan dikenali sebagai antigen oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) (Zhou dan Gill, 2005).



**Gambar 5.2** Gambaran Histopatologi Hipotalamus Tikus Hipotiroidisme Yang Diterapi Ikan Teri (*Stolephorus spp*) Asin (Pewarnaan *Hematoxilin-Eosin*) (400x).

Keterangan : (A) Hipotalamus tikus kontrol negatif, (B) Hipotalamus tikus hipotiroidisme, (C) Hipotalamus tikus terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 7 hari, (D) Hipotalamus tikus terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 14 hari, (E) Hipotalamus tikus terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 21 hari. → infiltrasi sel monosit dan makrofag dari proliferasi sel mikroglia. → Sel mikroglia

Antigen tiroglobulin anjing yang telah dikenali oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) akan diikat dan dipresentasikan melalui MHC-II agar dikenali dan diikat oleh sel T CD4+. Sel T CD4+ berdiferensiasi menjadi sel efektor Th1 dan Th2. Pada kondisi ini sel Th1 lebih dominan, akan mensekresikan IFN- $\gamma$  yang merupakan sitokin proinflamatori untuk meningkatkan sekresi makrofag dalam jaringan. Tingginya makrofag dalam jaringan dapat memacu terjadinya destruksi dan inflamasi kelenjar tiroid (Baratawidjaja dan Regganis, 2010). Kelenjar tiroid yang mengalami destruksi dan inflamasi menyebabkan menurunnya sekresi hormon T3 dan T4 yang diperlukan dalam *feedback negative* dalam proses metabolisme sel. Hormon T4 dalam sitoplasma akan mengalami translokasi dan deiodinasi menjadi T3. Setelah itu hormon T3 akan berikatan dengan tiroid reseptor pada nukleus hipotalamus. Menurunnya produksi hormon T3 akan menyebabkan menurunnya ikatan dengan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada hipotalamus yang berfungsi dalam proses metabolisme sel, sehingga metabolisme sel dalam hipotalamus terganggu dan menyebabkan terjadinya proliferasi sel mikroglia yang berfungsi sebagai fagositosis menjadi sel monosit dan makrofag, sehingga terjadi kerusakan pada hipotalamus.

Pada kondisi hipotiroidisme, sel mikroglia pada hipotalamus berproliferasi menjadi makrofag dan sel monosit (Thorner, 2008). Sel mikroglia berbentuk memanjang dan memiliki inti yang panjang dan memadat dan berfungsi sebagai fagositosis mononuklear dan surveilans kekebalan dalam hipotalamus (Djuwita dan Riyacumala, 2010). Pada kondisi hipotiroidisme sel yang berbentuk memanjang dan berinti padat keberadaannya sangat sedikit, hal tersebut

menunjukkan adanya infiltrasi makrofag dan sel monosit. Menurut Baratawidjaja dan Rengganis (2010) monosit adalah sel darah putih yang beredar dalam darah, masuk ke jaringan infeksi melewati membran kapiler, sedangkan makrofag adalah sel besar yang mampu mencerna bakteri dan sisa sel dalam jumlah yang besar atau yang biasa disebut sebagai monosit dewasa. Fungsi monosit adalah untuk bergerak menuju sel patogen tertentu dan fungsi makrofag adalah dalam memfagositosis sel darah merah dan sel darah putih yang lisis (Baratawidjaja dan Rengganis, 2010).

Pada hipotalamus tikus hipotiroidisme yang diterapi dengan ikan teri (*Stolephorus spp*) asin dosis 6 mg/kg BB selama 7 hari, 14 hari, dan 21 hari terlihat adanya penurunan infiltrasi sel monosit dan makrofag dari proliferasi pada setiap kelompok terapi. Gambaran histopatologi hipotalamus yang mendekati kelompok kontrol negatif adalah pada pemberian terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 21 hari, dimana infiltrasi monosit dan makrofag dari proliferasi sel mikroglia mengalami penurunan. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa tingkat terapi menunjukkan adanya perbaikan sel inflamasi yang menjadi berkurang yang ditandai dengan adanya sel yang berbentuk panjang dan berinti padat, serta berkurangnya sel yang berbentuk bulat.

Kandungan iodium dan omega-3 PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) pada ikan teri (*Stolephorus spp*) asin mampu menunjukkan perbaikan dan menurunkan monosit dan makrofag dari proliferasi sel mikroglia pada hipotalamus. Hal ini disebabkan karena kandungan iodium pada ikan teri (*Stolephorus spp*) asin telah mencukupi untuk memproduksi hormon T3 dan T4 sehingga dapat terjadi

*feedback negative* dan memperbaiki jaringan hipotalamus, sedangkan omega-3 PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) mampu menghambat fungsi dari *Antigen Presenting Cell* (APC) sehingga produksi dari sel-sel imun yang berlebih dapat diminimalisir (Simopoulus, 2002).

Hal ini sesuai dengan peningkatan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada kelompok hipotiroidisme yang diterapi dengan ikan teri (*Stolephorus spp*) asin, dimana hasil perhitungan statistika menunjukkan tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) pada kelompok kontrol negatif (A) dan kelompok yang diterapi dengan ikan teri (*Stolephorus spp*) asin selama 21 hari (E). Infiltrasi monosit dan makrofag dari proliferasi sel mikroglia disebabkan karena tidak terjadinya *feedback negative* pada hipotalamus – hipofisa – kelenjar tiroid, sehingga hipotalamus bekerja ekstra untuk menghasilkan *Thyroid Receptor Hormone* (TRH) (Corwin, 2009). Ketika terjadi *feedback negative* maka akan terjadi penurunan infiltrasi monosit dan makrofag dari proliferasi sel mikroglia di hipotalamus dan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) akan terjadi peningkatan ekspresi karena kelenjar tiroid telah memiliki asupan iodium dari ikan teri (*Stolephorus spp*) asin sehingga mampu memproduksi hormon T3 dan T4, serta hormon T3 mampu berikatan dengan tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) (Greenstein, 2010).

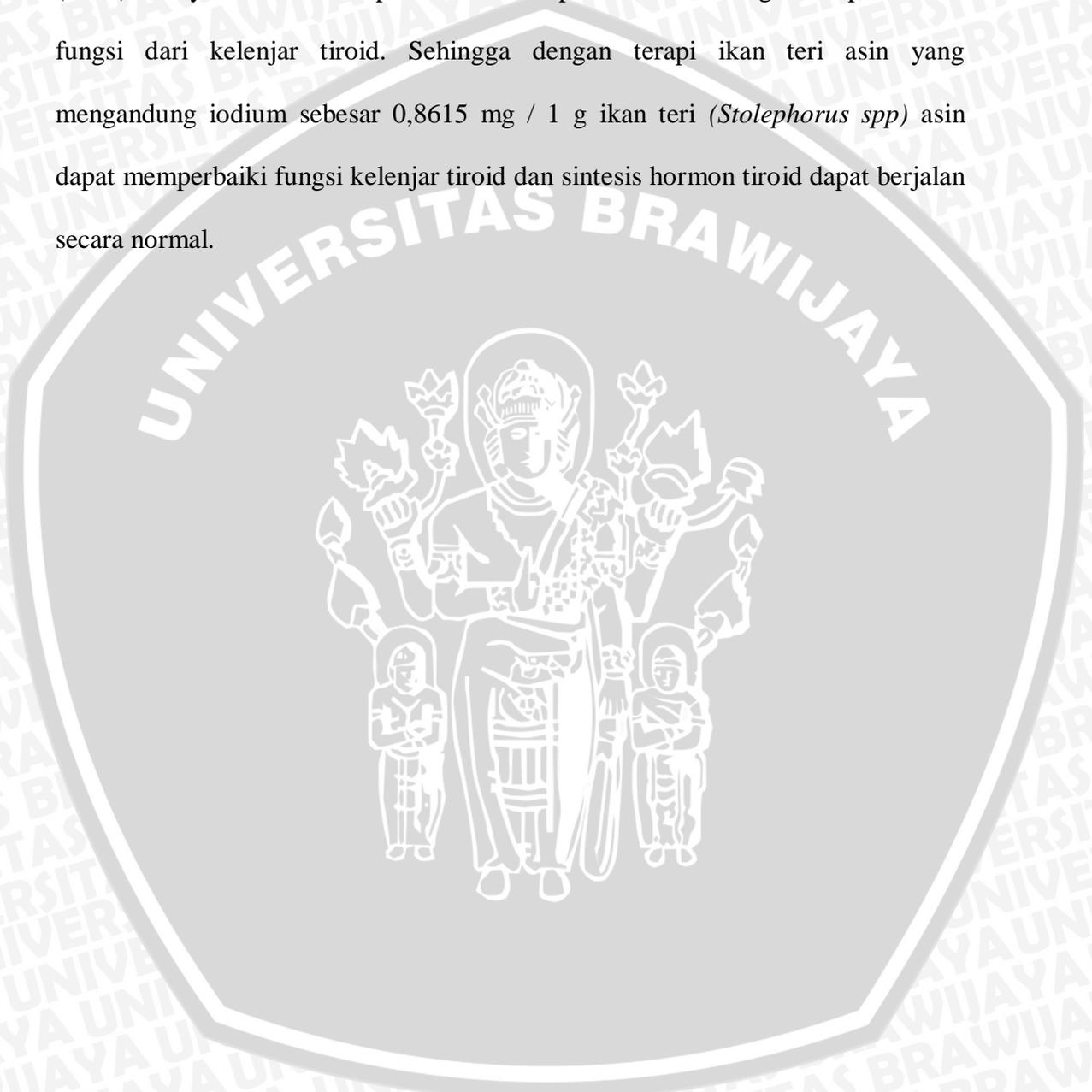
TSH merupakan pengatu utama dalam proses metabolisme kelenjar tiroid ke dalam peredaran darah. TSH akan mengaktifkan adenylate cyclase akan meningkatkan sintesis cAMP. TSH dalam rangsangannya akan meningkatkan *colloid droplets*. Apabila TSH bekerja dalam waktu yang tidak lama, maka TSH akan menurunkan kemampuan kelenjar tiroid untuk mengumpulkan iodium. Dosis

iodida yang tinggi akan menghambat transpor iodida dan menurunkan proses terjadinya organifikasi dan menurunkan respon cAMP terhadap rangsangan TSH. Konversi iodida menjadi iodium adalah tahap yang sangat diperlukan agar dapat terjadi proses iodinasi terhadap asam amino tirosine dengan bantuan enzim peroksidase. Iodium merupakan unsur penting hormon tiroid, menyusun 65% dari berat T4 dan 58% dari berat T3. Iodium yang berasal dari makanan akan diserab oleh usus dalam bentuk iodida dan dibawa oleh peredaran darah menuju kelenjar tiroid. Folikel di dalam kelenjar tiroid menyerap iodida kemudian dikonsentrasikan di dalam kelenjar tiroid. Konsentrasi iodida di dalam plasma sangat rendah, maka akan mengurangi terjadinya sintesis T3 maupun T4.

Enzim yang bertanggung jawab sebagai katalisator dalam proses deiodinasi adalah enzim deiodinase. Dengan proses monodeiodinasi maka T4 dirubah menjadi T3 atau rT3. Sebagian dair T4 akan mengalami deaminasi dan dekarboksilasi membentuk asam tetratiroasetat. Asam ini akan mengalami konjugasi dengan sulfat dan glukoronida dalam hati dan diekskresikan dalam empedu. Konversi T4 menjadi dilakukan di dalam hati dan ginjal. Konversi T4 menjadi T3 dirangsang oleh katalisator enzim T4 5' deiodinase yang dihasilkan oleh mikrosom.

Ikan teri (*Stolephorus spp*) asin dosis 6 mg/kg BB mengandung iodium sebesar 0,8615 mg / 1 g ikan teri (*Stolephorus spp*) asin. Terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin yang berpotensi adalah selama 21 hari dapat dilihat rata-rata ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) yang tinggi dan menunjukkan tidak berbeda nyata ( $p > 0,05$ ) dengan kelompok kontrol negatif, serta mengalami

peningkatan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) sebesar 150% dan adanya perbaikan gambaran histopatologi hipotalamus. Arvin dkk. (2012) dan Diana (2009) menyatakan bahwa pada kondisi hipotiroidisme mengalami penurunan fungsi dari kelenjar tiroid. Sehingga dengan terapi ikan teri asin yang mengandung iodium sebesar 0,8615 mg / 1 g ikan teri (*Stolephorus spp*) asin dapat memperbaiki fungsi kelenjar tiroid dan sintesis hormon tiroid dapat berjalan secara normal.



## BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

6.1.1. Pemberian terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme berpotensi untuk meningkatkan ekspresi tiroid reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) pada hipotalamus dengan dosis 6 mg/kg BB, waktu pemberian yang efektif adalah selama 21 hari.

6.1.2 Pemberian terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin pada hewan model tikus (*Rattus norvegicus*) hipotiroidisme berpotensi memperbaiki gambaran histopatologi hipotalamus dengan menurunnya sel inflamasi dengan dosis 6 mg/kg BB, waktu pemberian yang efektif adalah selama 21 hari.

### 6.2 Saran

6.2.1 Perlu dilakukan pengujian kandungan Omega-3 *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) pada ikan teri (*Stolephorus spp*) asin untuk mengetahui secara pasti kandungan Omega-3 *Polyunsaturated Fatty Acid* (PUFA) pada ikan teri (*Stolephorus spp*) asin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E dan E. Liviawati. 1989. *Pengawetan dan Pengolahan Ikan*. Kanisius. Yogyakarta.
- Akamizu, Takashi. 2012. *Hashimoto's Thyroiditis*. Medical University Wakayama. Japan.
- Amin, M.H.F, A.P.W. Marhendra dan Aulanni'am. 2009. *Pengaruh Paparan Lipopolisakarida pada Rongga Mulut dan Assisted Drainage Therapy (Adt) terhadap kadar S-Ige dan Profil Radikal Bebas Pada Tikus Asma*. Paper Presentasi pada Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki, Malang, 24 – 25 Juli.
- Baratawidjaja, K, G. dan Rengganis, I. 2010. *Imunologi Dasar*. Edisi ke-8. FKUI. Jakarta. 112 - 113, 306 - 307, 351 - 353.
- Brundicardi, J. H, D.K. Andersen, T.R. Billiar, D.L. Dunn, J.G. Hunter, J.B. Matthews. 2010. *Throid, Parathyroid, and Adrenal Chapter 38*. Schawartz Principles of Surgery 9<sup>th</sup> Ed. The McGraw Hills Companies. USA.
- Chistiakov, Dimitry A. 2005. *Immunogenetics Of Hashimoto's Thyroiditis*. Journal Of Autoimmune Disease. Leuven. [ 9 Maret 2015].
- Corwin, Elizabeth J. 2009. *Handbook Of Pathophysiology*. Jakarta. EGC.
- Dayan, C.M and G.H. Daniels. 2006. *Chronic Autoimmune Thyroiditis*. Massachusetts Medical Society. Medical Progress, 335(2): 99 – 107.
- De Bruin, G. H. P., B. C. Russel, dan A. Bogusch. 1994. *The Marine Fishery Resources of Sri Lanka*. Rome : ISBN 92-5-103293 : 400.
- Devdhar, M, Y.H. Ousman, and K.D.Burman. 2007. *Hypothyroidism*. Washington Endocrine. 36 : 595 – 615.
- Direktorat Bina Gizi Masyarakat dan Pusat Penelitian dan Pengembangan Gizi. 1990. *Komposisi Zat Gizi Pangan Indonesia*. Departemen Kesehatan. Jakarta.
- Dodds, W. J. 2001. *Vaccination Protocols For Dogs Predisposed to Vaccine Reactions*. J. Americ. Anim. Hosp. Assoc. 37(3): 211 – 214.
- Elaine, Lust. 2005. *Thyroid Disease in Canine and Felines*. [http://legacy.uspharmacist.com/index.asp?show=article&page=8\\_1498.htm](http://legacy.uspharmacist.com/index.asp?show=article&page=8_1498.htm) [28 Desember 2014]
- Flamant. 2006. *Dengue Virus Tipe 1 Nonstructural Glycoprotein NSI Is Secreted From Mammalian Cell as a Soluble Hexamer In a Glycosylation-Dependent Fashion*. Virology. 73(7) : 6104-6110.
- Ganong, William F. 2008. *Review Of Medical Physiology*. Jakarta : EGC.
- Garry, D. 2013. *Penyakit Tiroid Pada Kehamilan*. 40(7) : 500 – 503.

- Greenstein Ben, Wood Diana. 2010. *At a Galnce Sistem Endokrin*. Jakarta : Erlangga. (2) : 80-81.
- Gunawan, Sulistia Gan. 2012. *Farmakologi Dan Terapi*. Jakarta : UI Press.
- Hartopo, Anggoro Budi. 2013. *Hormon Tiroid Dan Efeknya Pada Jantung*. Yogyakarta. CDK-208: 40(9).
- Hastuti, S. 2010. *Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Formaldehide Pada Ikan Asin di Madura*. Agointek. 4(2) : 132-137.
- Holmes, H. Nancy. 2010. *Handbook Of Diagnostic test*. Jakarta : EGC.
- Horrocks L. A. dan Yeo Y. K. 1999. *Health Benefits of Docosahexaenoic Acid (ADH) Pharmacological Research*. 40 : 211-225.
- Kusriningrum, R. S. 2010. *Perancangan Percobaan : Untuk Penelitian Bidang Biologi, Pertanian, Peternakan, Perikanan, Kedokteran, Kedokteran Hewan dan Farmasi*. Cetakan pertama. Airlangga University Press. Surabaya.
- Leonard, Cheng S.Y. 2010. *Molecular Aspects of Thyroid Hormon Actions*. Rev. Endocrine. 31:139-70
- Liviawaty. 2005. *Pakan Ikan*. Yogyakarta : Kanisius. 37-141.
- Marjudo, A dan R.A. Rahman. 2014. *Usaha Perikanan Ikan Teri (Stolephorus spp) Dengan Alat Tangkap Bagan Tancap Di Desa Bukit Aru Indah Kecamatan Sebatik Timur Kabupaten Nunukan Provinsi Kalimantan Utara*. Jurnal Ilmiah AgrIBA No2 Edisi September 197 – 205. ISSN : 2303 - 1158.
- Murray, R. K., D.K. Granner, P.A. Mayes and V.W Rodwell. 2000. *Biokimia Harper*. Jakarta : EGC. (25).
- Musa, L. Muklis dan A. Rauf. 2010. *Dasar Ilmu Tanah*. Medan : FP USU
- Myers, P and D. Armitage. 2004. *Rattus novergicus, Animal Diversity*. [Http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus\\_novergicus](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_novergicus). [8 Maret 2015].
- Nugrahani, Gardinia. 2014. *Pengaruh Substansi Ikan Teri (Stelophorus spp.) Terhadap Kandungan Protein, Kalsium, Dan Organoleptik Omelet*. Semarang : Universitas Diponegoro.
- Peterson, M.E. 2013. *Diagnostic Testing For Feline Thyroid Disease : Hypotiroidism*. Compendium : Continuing Education For Veterinarians. 1 – 6.
- Pigott, G. M. Dan B. W. Tucker. 1987. *Seafood : Effects of Technology on Nutrition*. New York : Marcel Dekker Inc.
- Prummel, MF., T. Strieder, dan W.M Wiersinga. 2004. *The Environment and Autoimmune Thyroid Disease*. Eur J Endocrinology. 150 : 605-618

- Purnamasari D, Subekti I dalam Mansjoer A, Sudoyo AW, Rinaldi I, dkk. 2007. *Penyakit Tiroid*. FKUI : Jakarta.181-188
- Ramos, J. A., Vara. 2005. *Technical Aspects of Immunohistochemistry*. Vet Patho. 142:405-426.
- Ridwan, E. 2013. *Etika Pemanfaatan Hewan Peercobaan dalam Penelitian Kesehatan. Artikel Pengembangan Pendidikan Keprofesional Berkelanjutan (P2KB)*. Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta.
- Resmiati, Teti. 2003. *Pengasinan Ikan Teri (Stolephorus spp.) Dan Kelayakan Usahanya Di Desa Karanghantu Serang*. Universitas Padjajaran : Semarang.
- Schott, Matthias, Wernes A. Scerbaum. 2006. *Autoimmune Thyroid Disease*. Review Artikel 103 (45) [11 Maret 2015].
- Shahidi, F. 2009. *Nutraceutical and Functional Foods*. Trends in Food Science and Technology. 20 : 376-387.
- Shanks, Niall. 2009. *Phylosophy, Ethics, And Humanities in Medicine*. Wichita State University. USA.
- Shiel, Robert, dkk. 2007. *Tertiary Hypothyroidism in a Dog*. Irish Veterinary Journal. 60 (2).
- Simon, Tapin. 2010. *Canine Hypothyroidism : Making a Definitive Diagnosis*. Veterinary Ireland Journal. 4 (9) : 483-486
- Simopolus, A.P. 2002. *Omegga-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Disease*. The American Journal Of Clinical Nutrition, 21 : 495-505
- Sinduja, Immaculate. 2013. *Quality And Shelf Life Status Of Salted And Sun Dried Fishes Of Tuticorin Fishing Villages In Different Seasons*. International Food Research Journal 20(4): 1855-1859 [5 Maret 2015].
- Smeltzer, Suzanne C. 2002. *Buku Ajar Keperawatan Medikal Bedah*. Jakarta. Buku Kedokteran EGC.
- Song, HX, R.Z. Zan, C, H. Yu dan Wang. 2010. *Effect of Modified Haizao Yuhu Decoction in Experimental Autoimmune Thyroiditis Rats*. Journal of Ethnopharmacology. 135 (2), 321-324
- Suherman S. K. 2007. *Insulin dan Antidiabetik Oral*. Jakarta : Balai Penerbit FKUI. 485-489.
- Susanto, E., A.S Fahmi. 2012. *Senyawa Fungsional Dari Ikan Aplikasinya Dalam Pangan*. Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan. 1(4).
- Swain, Manorama. 2005. *Autoimmune Thyroid Disorders An-Update*. Indian Journal Of Clinical Biochemistry 20 (1) : 9-17.

- Thorner MO, Vance ML, Laws ER Jr, dkk. 2008. *The Anterior Pituitary*. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia, Pa: WB Saunders. 249-340
- Venugopal, N. V. S., S. R. Bonthula, dan G. Veeribabu. 2012. *Spectrophotometric Determination of Organophosphate Insecticide (Chlorpyrifos) Based on Diazotiation With Anthranilic Acid*. *The Malaysian Journal Of Analytical Sciences* 16(2) : 180-186.
- Wetzel JM, Iwen KA. (2011). *Coordination of Mitochondrial Biogenesis by Thyroid Hormone*. *Mol Cell Endocrine*. 342:1-7
- Wood, Marry W. 2007. *Selecting Appropriate Animal Models And Strains : Making The Best Use Of Research, Information, And Outreach*. University Of California : USA.
- Young, Hugh D. 1962. *Statistical Treatment of Experimental Data*. New York : McGraw-Hill Book Company.
- Zhou, J.S dan Gill, H.S. 2005. *Immunostimulatory Probiotic Lactobacillus rhamnosus HN001 and Bifidobacterium lactis HN019 Do Not Induce Pathological Inflammation in Mouse Model of Experimental Autoimmune Thyroiditis*. *Interna J.Food Microbial* 103 (1) : 97 – 104.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

# Lampiran



Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARENCE"**

No:341-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : EKSPRESI INDUCIBLE NITRIC OXID SYNTHASE ( INOS) AN GAMBARAN HISTOPATOLOGI TIROID TIKUS ( *Rattus norvegicus* ) MODEL HIPOTIROIDISME YANG DITERPI DENGAN IKAN TERI ASIN ( STOLEPHORUSSPP).

PENELITI : EVA ROSALINA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UBIVERSITAS BRAWIJAYA

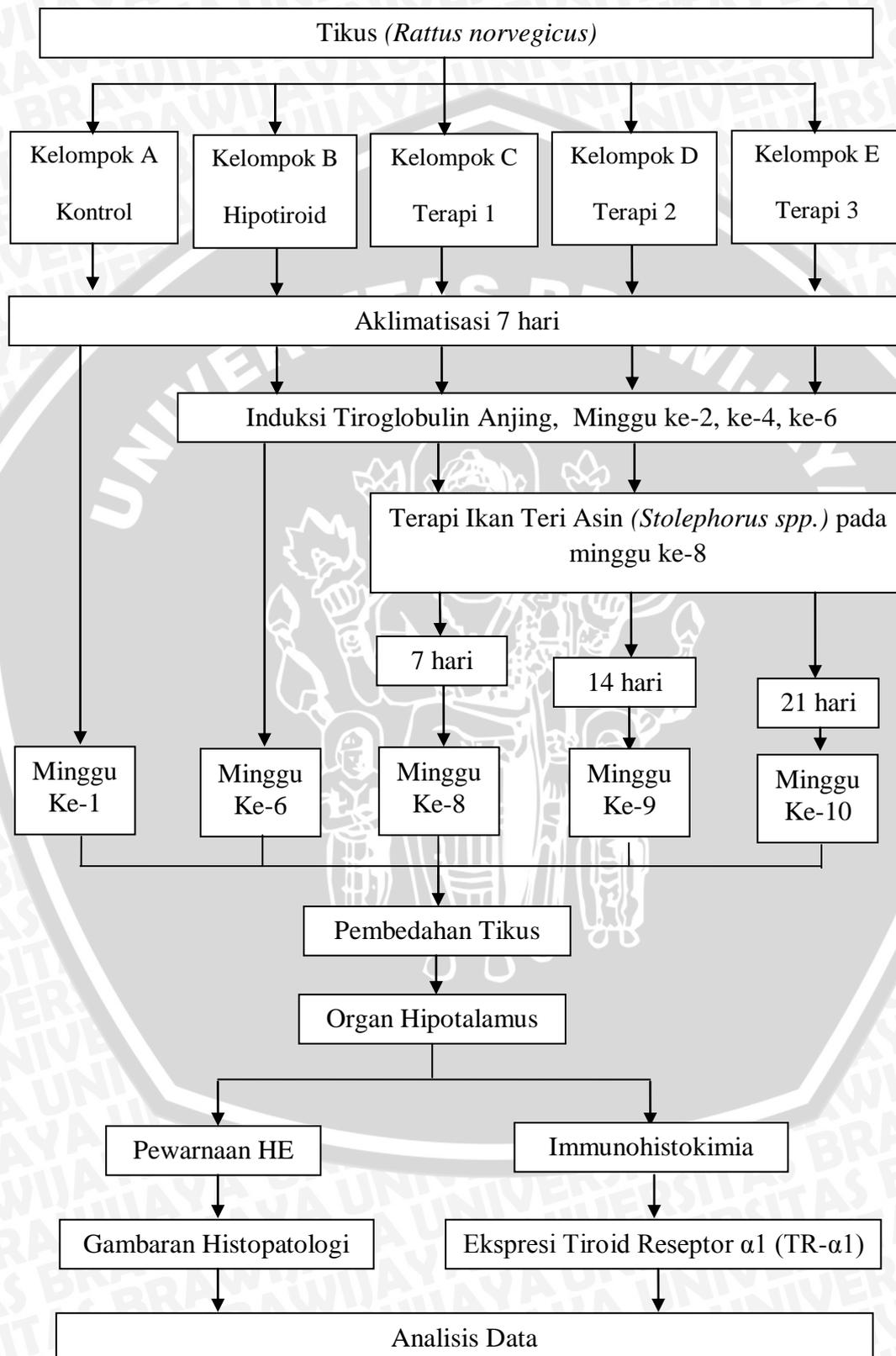
DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 29 April 2015  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



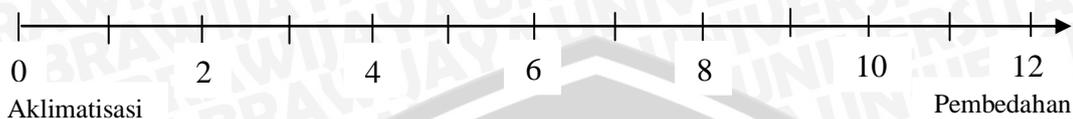
Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.  
NIP. 19600903 198802 2 001



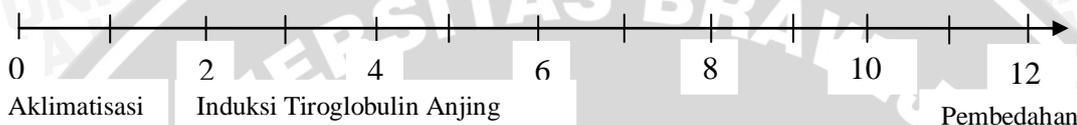
**Lampiran 2.** Kerangka Operasional Penelitian

**Lampiran 3. Skema Jadwal Perlakuan**

**Kelompok Kontrol Negatif**



**Kelompok Hipotiroid**



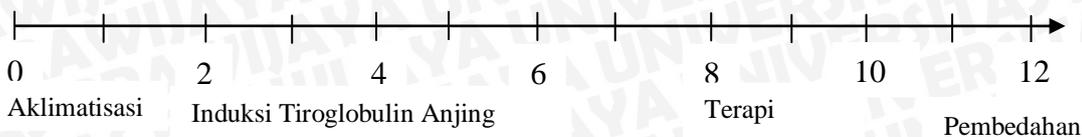
**Kelompok Hipotiroid + Terapi 7 hari**



**Kelompok Hipotiroid + Terapi 14 hari**



**Kelompok Hipotiroid + Terapi 21 hari**



Keterangan :

1. Kelompok A, B, C, D, dan E dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari, yaitu minggu 0-1
2. Kelompok A tanpa diinjeksi tiroglobulin anjing dan tanpa pemberian terapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin, dilakukan pembedahan pada minggu ke-12.
3. Kelompok B, C, D, dan E diinjeksi tiroglobulin anjing dengan dosis  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$  pada minggu ke-2, ke-4, dan ke-6.
4. Kelompok B tidak diberi terapi, dilakukan pembedahan pada minggu ke-12
5. Kelompok C diterapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin dengan dosis  $6\text{ mg/kg}$  selama 7 hari, yaitu minggu 8-9, dan dilakukan pembedahan pada minggu ke-12.
6. Kelompok D diterapi dengan ikan teri (*Stolephorus spp*) asin dengan dosis  $6\text{ mg/kg}$  selama 14 hari, yaitu minggu 8-10, dan dilakukan pembedahan pada minggu ke-12.
7. Kelompok E diterapi ikan teri (*Stolephorus spp*) asin dengan dosis  $6\text{ mg/kg}$  selama 21 hari, yaitu minggu 8-11, dan dilakukan pembedahan pada minggu ke-12.

**Lampiran 4.** Laporan Hasil Analisis Iodium pada Ikan Teri (*Stolephorus spp*)Asin



**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN**  
**INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**JURUSAN KIMIA**  
 Kampus ITS Sukolilo, Surabaya 60111  
 Telp. 031-594 3353 Fax. 031-592 8314 e-mail: kimia@its.ac.id

---

Kepada Yth :  
 EVA ROALINA  
 Program Kedokteran Hewan Unibraw Malang  
 MT. Haryono Gg 17 Malang

<b>LAPORAN ANALISIS</b> Subyek : Ikan Teri Asin	No	: 075/IT2.1.1.4/PM.05.02/2015
	Tanggal	: 23 Januari 2015
	Metode	: --
	Diteliti Oleh	: Fataty K

Tanggal diterima sampel : 20 Januari 2015

No	Parameter Uji	Hasil Analisa	Metode
1	Bilangan Iodium	86,15	Titrimetri - cara Hanus

Catatan :

1. Hasil analisis ini mengacu pada sampel yang diterima laboratorium Kimia ITS dan tidak dapat digunakan sebagai alat bukti hukum
2. Pengambilan sampel tidak dilakukan oleh Laboratorium Kimia ITS



Hormat Kami,  
Hamzah Fansuri, Ph.D.  
 Ketua

**Lampiran 5.** Penentuan Dosis

Konsumsi I<sub>2</sub> pada manusia = 500 µg

Konversi dari manusia ke tikus (*Rattus norvegicus*) 200 g = 0,018

Jadi, konsumsi I<sub>2</sub> untuk tikus (*Rattus norvegicus*) 200 g = 500 µg x 0,018  
= 9 µg

Untuk per 1kg I<sub>2</sub> =  $\frac{1000 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 9 \text{ µg}$   
= 45µg / kg BB

Sehingga, konsumsi I<sub>2</sub> pada tikus (*Rattus norvegicus*) 200 g setelah konversi adalah 45µg / kg BB

Kandungan I<sub>2</sub> dalam ikan teri (*Stolephorus sp.*) asin adalah 80 mg / 100 g ikan teri (*Stolephorus sp.*) asin

Perhitungan dosis terapi

$$\frac{\text{Jumlah konsumsi I}_2 \text{ tikus}}{\text{Dosis terapi}} = \frac{\text{Jumlah I}_2 \text{ pada ikan teri (Stolephorus sp.) asin}}{\text{Berat ikan teri (Stolephorus sp.) asin}}$$

$$\frac{45 \text{ µg / kg BB}}{\text{Dosis terapi}} = \frac{80 \text{ mg}}{100 \text{ g}}$$

$$\frac{0,045 \text{ mg / kg BB}}{\text{Dosis terapi}} = \frac{80 \text{ mg}}{100000 \text{ mg}}$$

$$\text{Dosis terapi} = \frac{0,045 \text{ mg / kg BB} \times 100.000 \text{ mg}}{80 \text{ mg}}$$

$$= 5,6 \text{ mg/kg BB}$$

$$= 6 \text{ mg/kg BB}$$

Sehingga dosis terapi pemberian ikan teri (*Stolephorus sp.*) untuk tikus putih (*Rattus norvegicus*) 200 g adalah 6 mg/kg BB

\* Kelompok C

Dosis Terapi = 6 mg/kg, pemberian selama tujuh hari.

Berat kering tepung ikan teri asin = Dosis x Berat Badan x Jumlah Tikus

$$= 6 \text{ mg/kg} \times 200 \text{ g} \times 4$$

$$= \frac{6 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 200 \text{ g} \times 4$$

$$= 4,8 \text{ mg}$$

Dosis terapi = 4,8 mg untuk 4 ekor tikus, sedangkan dosis terapi untuk 1 ekor tikus adalah 1,2 mg

Volume pemberian = 0,5 ml

Perhitungan

$$= \frac{4,8 \text{ mg}}{2 \text{ ml}}$$

$$= \frac{1,2 \text{ mg}}{0,5 \text{ ml}}$$

\* Kelompok D

Dosis Terapi = 6 mg/kg, pemberian selama 14 hari.

Berat kering tepung ikan teri asin = Dosis x Berat Badan x Jumlah Tikus

$$= 6 \text{ mg/kg} \times 200 \text{ g} \times 4$$

$$= \frac{6 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 200 \text{ g} \times 4$$

$$= 4,8 \text{ mg}$$

Dosis terapi = 4,8 mg untuk 4 ekor tikus, sedangkan  
dosis terapi untuk 1 ekor tikus adalah 1,2  
mg

Volume pemberian = 0.5 ml

Perhitungan =  $\frac{4,8 \text{ mg}}{2 \text{ ml}}$

=  $\frac{1,2 \text{ mg}}{0,5 \text{ ml}}$

\* Kelompok E

Dosis Terapi = 6 mg/kg, pemberian selama 21 hari.

Berat kering tepung ikan teri asin = Dosis x Berat Badan x Jumlah Tikus

= 6 mg/kg x 200 r x 4

=  $\frac{6 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 200 \text{ r} \times 4$

= 4,8 mg

Dosis terapi = 4,8 mg untuk 4 ekor tikus, sedangkan

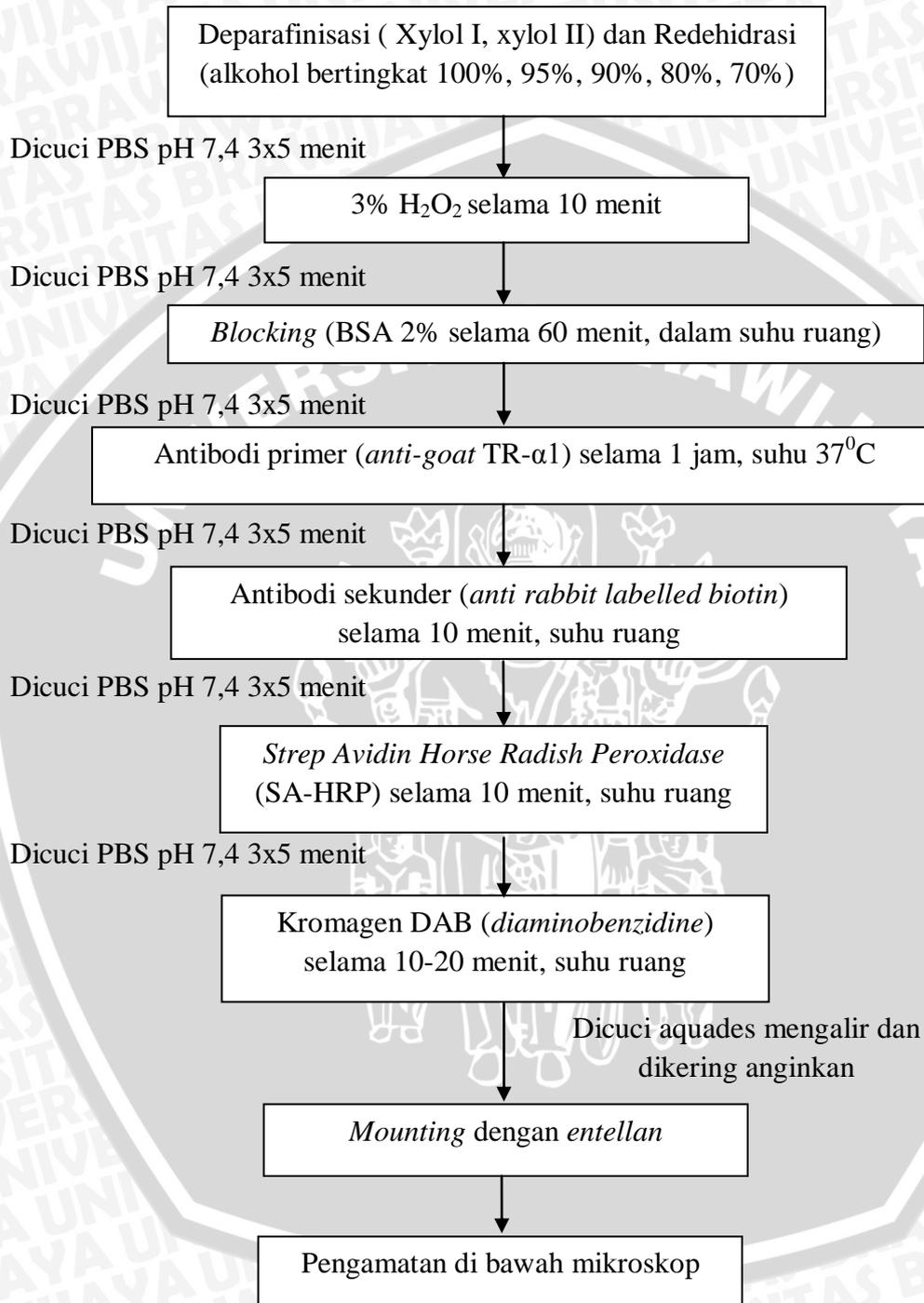
dosis terapi untuk 1 ekor tikus adalah 1,2

mg

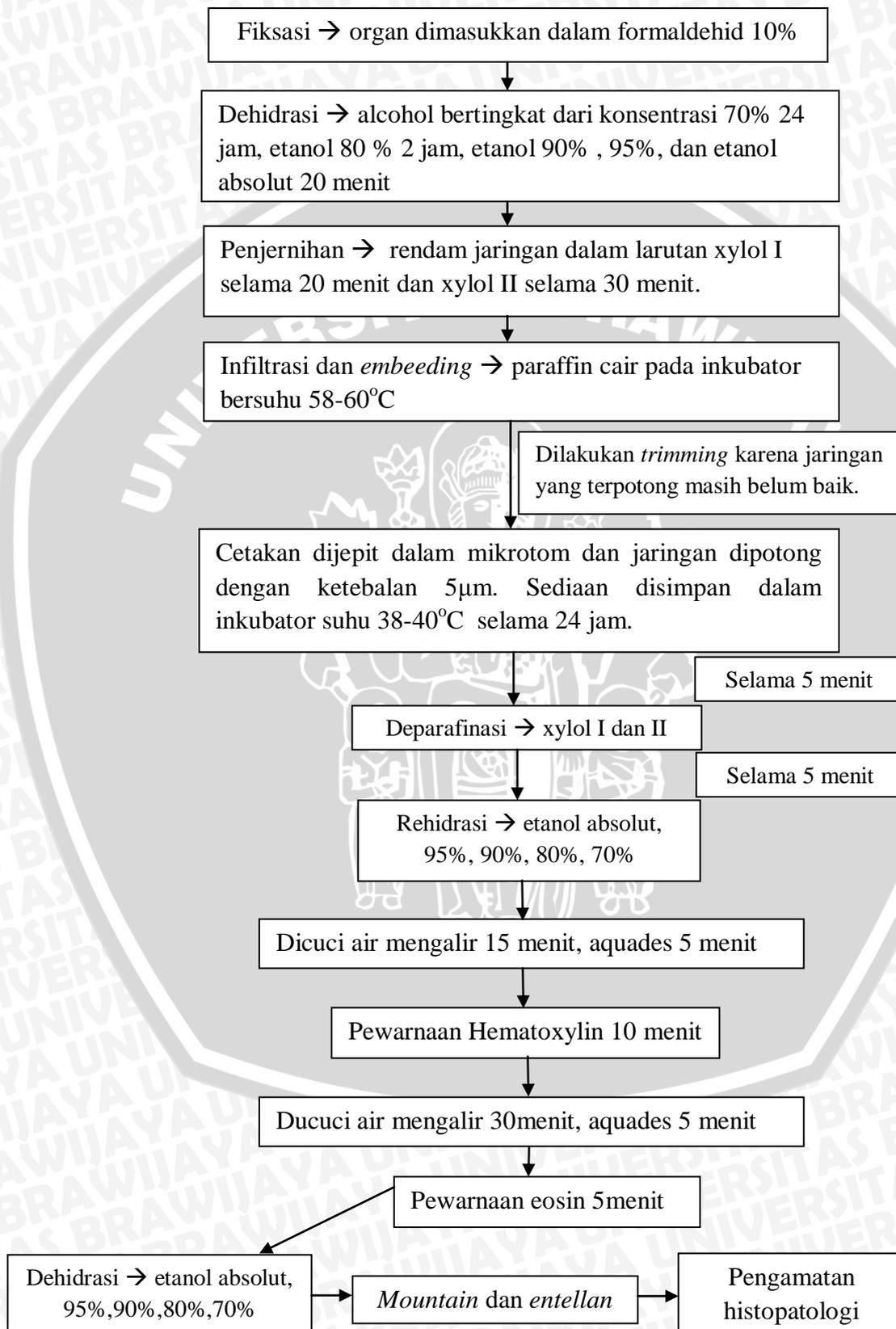
Volume pemberian = 0,5 ml

Perhitungan =  $\frac{4,8 \text{ mg}}{2 \text{ ml}}$

=  $\frac{1,2 \text{ mg}}{0,5 \text{ ml}}$

**Lampiran 6.** Metode Imunohistokimia (Ramos, 2005)

**Lampiran 7.** Metode pembuatan preparat HE (Junquiera dan Carneiro, 2007)



**Lampiran 8.** Pembuatan PFA 10%

- Pembuatan NaCl 250ml dari 0,9% = 2,25g

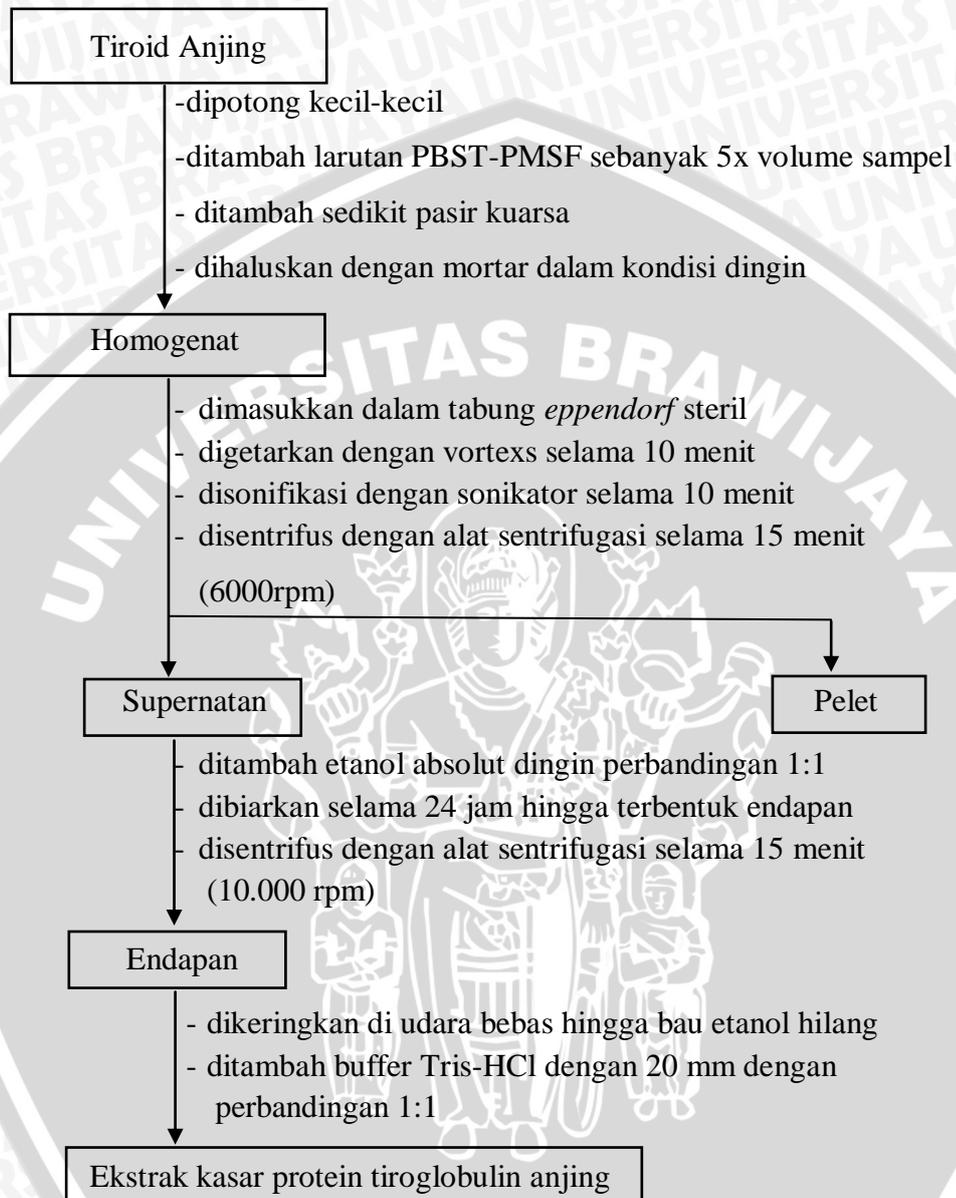
$$\frac{0,9 \times 250}{100} \rightarrow \frac{225}{100} = 2,25 \text{g} + \text{aquades } 250 \text{ml}$$

- Sehingga didapatkan NaCl 250ml

$$\begin{aligned} - m_1 \times V_1 &= m_2 \times V_2 \\ 40\% \times V_1 &= 10\% \times 250 \text{ml} \\ V_1 &= \frac{2500}{40} \\ &= 62,5 \text{ ml (formalin) + NaCl fisiologis } 187,5 \text{ml} \end{aligned}$$

- Sehingga total PFA 250ml



**Lampiran 9.** Isolasi Protein Tiroglobulin Anjing

**Lampiran 10. Data Hasil Statistika**

## 1. One Sample Kolmogrov

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Perlakuan	TRalpha
N		20	20
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	3.00	38.7895
	Std. Deviation	1.451	1.381075
Most Extreme Differences	Absolute	.155	.237
	Positive	.155	.145
	Negative	-.155	-.237
Kolmogorov-Smirnov Z		.692	1.062
Asymp. Sig. (2-tailed)		.725	.209

Jika nilai signifikansi  $> 0,05$  maka data dikatakan normal. Nilai signifikansi dari data diatas adalah sebesar  $0,725 > 0,05 = \text{Normal}$ .

**Descriptives**

TRalpha

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
1	4	54.9850	.78356	.39178	53.7382	56.2318	54.23	55.87
2	4	21.1175	.96241	.48120	19.5861	22.6489	19.93	22.13
3	4	28.4000	.87350	.43675	27.0101	29.7899	27.82	29.69
4	4	36.0750	1.34220	.67110	33.9393	38.2107	34.51	37.68
5	4	52.8700	1.04310	.52155	51.2102	54.5298	51.73	54.13
Total	20	38.6895	13.70370	3.06424	32.2760	45.1030	19.93	55.87

## 2. Test of Homogeneity of Variances

**Test of Homogeneity of Variances**

TRalpha

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.416	4	15	.795

Jika nilai signifikansi lebih dari 0,05 maka data dikatakan homogen. Nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 yaitu 0,784 maka varian sampel homogen.

### 3. Hasil Uji ANOVA

ANOVA					
TRalpha	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3552.458	4	888.115	855.147	.000
Within Groups	15.578	15	1.039		
Total	3568.036	19			

Jika nilai signifikansi dibawah 0,05 maka terdapat perbedaan antar perlakuan. Nilai signifikansi dibawah 0,05 yaitu 0,000 maka ada perbedaan antar perlakuan.

### 4. Post Hoc Test

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable:TRalpha

	(I)	(J)	Mean		Sig.	95% Confidence Interval	
			Difference (I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1	2	33.86750*	.72061	.000	31.6423	36.0927
		3	26.58500*	.72061	.000	24.3598	28.8102
		4	18.91000*	.72061	.000	16.6848	21.1352
		5	2.11500	.72061	.066	-.1102	4.3402
	2	1	-33.86750*	.72061	.000	-36.0927	-31.6423
		3	-7.28250*	.72061	.000	-9.5077	-5.0573
		4	-14.95750*	.72061	.000	-17.1827	-12.7323
		5	-31.75250*	.72061	.000	-33.9777	-29.5273
	3	1	-26.58500*	.72061	.000	-28.8102	-24.3598
		2	7.28250*	.72061	.000	5.0573	9.5077
		4	-7.67500*	.72061	.000	-9.9002	-5.4498

	5	-24.47000*	.72061	.000	-26.6952	-22.2448
4	1	-18.91000*	.72061	.000	-21.1352	-16.6848
	2	14.95750*	.72061	.000	12.7323	17.1827
	3	7.67500*	.72061	.000	5.4498	9.9002
5	5	-16.79500*	.72061	.000	-19.0202	-14.5698
	1	-2.11500	.72061	.066	-4.3402	.1102
	2	31.75250*	.72061	.000	29.5273	33.9777
	3	24.47000*	.72061	.000	22.2448	26.6952
	4	16.79500*	.72061	.000	14.5698	19.0202

Rata-rata tikus kontrol negatif (A) berbeda nyata dengan rata-rata tikus hipotiroidisme (B) dan tidak berbeda nyata dengan kelompok terapi. Tabel di atas memperlihatkan bahwa kelompok yang menunjukkan adanya perbedaan secara nyata menunjukkan rata-rata ekspresi Tiroid Reseptor  $\alpha 1$  (TR- $\alpha 1$ ) (ditandai dengan tanda bintang “\*”).

#### 5. Homogenous Subset

TRalpha						
Subset for alpha = 0.05						
	Perlakuan	N	1	2	3	4
Tukey	2	4	21.1175			
HSD <sup>a</sup>	3	4	28.4000			
	4	4	36.0750			
	5	4	52.8700			
	1	4	54.9850			
	Sig.		1.000	1.000	1.000	.735

Pada tabel Homogeneous subset menunjukkan bahwa subset 1 beranggotakan kelompok B, subset 2 beranggotakan kelompok C, subset 3 beranggotakan kelompok D dan subset 4 beranggotakan kelompok E dan A. Hal ini menunjukkan bahwa antara perlakuan A, dan E tidak berbeda nyata, sedangkan perlakuan A dan E berbeda nyata dengan perlakuan B, C dan D.

### Lampiran 11. Rumus Peningkatan Dan Penurunan

#### 1. Peningkatan dan penurunan ekspresi TR- $\alpha 1$

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Ekspresi Tiroid Reseptor $\alpha 1$ (%) (Mean $\pm$ SD)	Peningkatan (%)	Penurunan (%)
(A) Kontrol negatif	54,98 $\pm$ 0,78 <sup>d</sup>	-	-
(B) Kontrol positif hipotiroidisme	21,11 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	-	160
(C) Tikus hipotiroidisme, terapi ikan teri ( <i>Stolephorus spp</i> ) asin selama 7 hari	28,40 $\pm$ 0,87 <sup>b</sup>	34	-
(D) Tikus hipotiroidisme, terapi ikan teri ( <i>Stolephorus spp</i> ) asin selama 14 hari	35,07 $\pm$ 1,34 <sup>c</sup>	66	-
(E) Tikus hipotiroidisme, terapi ikan teri ( <i>Stolephorus spp</i> ) asin selama 21 hari	52,87 $\pm$ 0,91 <sup>d</sup>	150	-

a. Presentase penurunan (%) =  $\frac{\text{Rataan kontrol (-)} - \text{Rataan kontrol (+)}}{\text{Rataan kontrol (-)}} \times 100\%$

$$= \frac{54,98 - 21,11}{21,11} \times 100\%$$

$$= 160\%$$

b. Presentase peningkatan (%) =  $\frac{\text{Rataan perlakuan} - \text{Rataan kontrol (+)}}{\text{Rataan kontrol (+)}} \times 100\%$

1. Peningkatan pada terapi 7 hari =  $\frac{28,40 - 21,11}{21,11} \times 100\% = 34\%$

2. Peningkatan pada terapi 14 hari =  $\frac{35,07 - 21,11}{21,11} \times 100\% = 66\%$

3. Peningkatan pada terapi 21 hari =  $\frac{52,87 - 21,11}{21,11} \times 100\% = 150\%$

