

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian berupa eksperimental murni yang dilakukan dengan rancangan *post test and controlled group design* terhadap hewan uji. *Post test* ini dilakukan untuk menganalisis perubahan ataupun perbedaan memori spasial anak tikus hipotiroid kongenital.

#### B. Populasi dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Spargue Dawley jantan dan betina, yaitu :

1. Anak-anak tikus dengan induk yang diinduksi *Propiltiourasil* (PTU) mulai dari hari kebuntingan ke 15 hingga laktasi hari ke 21.
2. Jumlah sampel penelitian ini ditentukan menurut rumus Federer (1963) untuk uji eksperimental, yaitu:

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

(t) = kelompok perlakuan, dan (n) = jumlah sampel perkelompok perlakuan.

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

$$(4 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$3 (n - 1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Hasil perhitungan di atas, dibutuhkan jumlah sampel minimal sebanyak 6 ekor tikus untuk tiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 28 ekor tikus putih *Sprague Dawley* yang terbagi dalam 4 kelompok (masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus), yaitu :

- a. Kelompok 1, yaitu anak-anak tikus yang lahir normal (tanpa pemberian perlakuan hipotiroid dan susu kedelai hitam).
- b. Kelompok 2, yaitu anak-anak tikus lahir normal yang diberi susu kedelai hitam.
- c. Kelompok 3, yaitu anak-anak tikus hipotiroid kongenital (tanpa pemberian susu kedelai).
- d. Kelompok 4, yaitu anak-anak tikus hipotiroid kongenital yang diberi susu kedelai hitam.

### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (UMY) pada rentang waktu Maret 2016 sampai dengan November 2016.

### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas: susu kedelai hitam.
2. Variabel terikat: kemampuan belajar dan memori spasial pada tikus yang diukur dengan *Morris Water Maze*.
3. Variabel terkontrol: kondisi pakan dan kandang sama pada tiap kelompok.

## E. Definisi Operasional

### 1. Tikus Hipotiroid Kongenital diinduksi PTU

Tikus hipotiroid kongenital diinduksi PTU adalah anak tikus yang lahir dari induk hipotiroid diinduksi PTU dengan dosis 0,025% mulai dari hari kehamilan ke 15 sampai laktasi hari ke 21. Kemudian tikus di sapih pada usia 3 minggu.

### 2. Susu kedelai hitam adalah kedelai hitam dosis 4,5 gram kedelai hitam/200

gram tikus/hari yang diolah atau disajikan dalam bentuk minuman. Pemberian susu kedelai hitam dilakukan setelah tikus disapih dari hari ke 22 sampai hari ke 60 usia tikus.

### 3. Memori spasial adalah memori yang berkaitan dengan kemampuan

mengingat ruang, bentuk dan memperkirakan ukuran maupun jarak serta untuk mengetahui arah (Kusrohmainah, 2012). Memori spasial diukur dengan *Morris Water Maze Test*. Test ini merupakan model eksperimen yang digunakan dalam pengujian kemampuan kognitif dan memori pada hewan uji (Septiana, 2014). Tes *Moris Water Maze* dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama adalah pengukuran waktu latensi, yaitu waktu yang dibutuhkan tikus untuk mencapai *platform*. Tahap yang kedua adalah pengukuran waktu retensi, yaitu waktu yang dibutuhkan tikus untuk berada pada kuadran target (Yunanto, 2014).

## F. Instrumen Penelitian

1. Bahan : Propiltiourasil (PTU), aquades, kedelai hitam, tikus *Sprague Dawley*.
2. Alat : *Moris water maze*, timbangan digital, stop watch, meteran.

## G. Prosedur penelitian

1. Penentuan hari pertama kebuntingan tikus

Tikus betina sebanyak 4 ekor dicampurkan dengan 1 tikus pejantan dalam kandang yang sama pada malam hari. Pagi harinya tikus betina dibawa ke lab untuk diperiksa kebuntingannya dengan cara *vaginal swab*. Hasil *swab* dilihat dengan mikroskop dan jika ditemukan sel sperma tikus berarti tikus sudah kopulasi dan hari itu dicatat sebagai hari pertama kebuntingan tikus. Tikus betina yang bunting dipisahkan dan diletakkan pada kandang khusus.

2. Induksi Hipotiroid

Dosis PTU yang diberikan pada tikus sebanyak 0,025% dibuat dengan cara melarutkan 25 mg PTU ke dalam 100 ml air. Kemudian ditambahkan gula rendah kalori agar tidak terasa pahit. Larutan PTU ini diletakkan pada botol minuman tikus. Dosis dan cara pemberian PTU ini terbukti mampu membuat tikus menjadi hipotiroid kongenital.

3. Dosis dan pembuatan susu kedelai hitam

Dosis yang dipakai dalam penelitian ini yakni 25 gram kacang kedelai hitam per hari. Dosis ini mengacu pada konsumsi harian yang

harus dicukupi yang dianjurkan oleh FDA agar kebutuhan tubuh akan protein dan isoflavon tercukupi (Saidu, 2005).

Dosis kacang kedelai hitam yang digunakan pada manusia yakni sebesar 25 gram per hari maka dosis untuk penggunaan terhadap tikus harus dikonversi dari dosis tersebut. Faktor konversi dari manusia ke tikus adalah 0,018 dan faktor farmakokinetika adalah 10 (Williams, 1979).

Perhitungan dosisnya adalah  $0,018 \times 10 \times 25 \text{ gram} = 4,5 \text{ gram}$  kedelai hitam/200 gram tikus/hari. Dosis untuk 50 gram anak tikus adalah : 1,125 gram kacang kedelai/50 gram tikus/hari. Volume pemberian susu kedelai untuk setiap tikus adalah 3 ml.

Pembuatan susu kacang kedelai dalam penelitian ini memakai metode Jumadi (2009) yaitu:

- a. Pertama, kacang kedelai dibersihkan dari segala kotoran, kemudian dicuci.
- b. Kacang kedelai yang telah dibersihkan dan dicuci kemudian direbus selama  $\pm 15$  menit, lalu direndam dalam air bersih selama 8 jam dengan perbandingan air : kedelai adalah 3 : 1 ml.
- c. Proses berikutnya adalah kacang kedelai dihancurkan dengan penggiling / *blender*. Sebelum proses ini dimulai, kacang kedelai yang sudah dimasukkan ke dalam *blender* ditambahkan air sejumlah dua kalinya, kemudian campuran tersebut digiling hingga halus.
- d. Produk yang didapat kemudian disaring sehingga diperoleh larutan susu kacang kedelai. Perlu merebus susu tersebut sekali lagi agar susu benar-benar bersih dari bakteri.

Susu kedelai yang sudah jadi dimasukkan dalam tempat minum tikus agar tikus bisa meminum langsung dan diberikan setiap sore hari.

#### 4. Teknik *Morris Water Maze*

*Morris Water Maze* dilakukan dalam dua tahap yakni pengukuran waktu latensi dan waktu retensi. Pengukuran waktu latensi dilakukan di sebuah wadah besar dengan sebuah *platform* di salah satu dari keempat kuadrannya. Tikus berenang dari sisi kuadran yang lain selama 90 detik dalam sekali berenang. Setelah tikus berhasil mencapai *platform* maka tikus diberi waktu istirahat selama 30 detik. Waktu yang dibutuhkan tikus mencapai *platform* dicatat. Apabila tikus melewati waktu 90 detik dan belum mencapai *platform* maka tikus dianggap gagal dan waktu latensinya dicatat 90 detik. Setelah itu tikus diangkat dan dikembalikan ke kandangnya untuk dikeringkan.

Semakin besar waktu yang didapat maka semakin lama waktu yang dibutuhkan tikus untuk mencapai *platform*. Hal ini menunjukkan bahwa tikus masih kesulitan dalam menemukan target yang dituju. Sebaliknya, semakin kecil waktu yang didapat maka semakin cepat waktu yang dibutuhkan tikus untuk mencapai *platform*. Hal ini menunjukkan bahwa tikus lebih cepat dalam menemukan target yang dituju.

Tahap yang kedua yaitu pengukuran waktu retensi dengan tes probe. Tes probe dilakukan dengan mengambil *platform* pada kuadran kolam. Tikus berenang dari sisi kuadran yang lain selama 90 detik dalam sekali berenang. Waktu dicatat selama tikus berada di kuadran target

(kuadran tempat asal *platform* diletakkan sebelumnya). Setelah itu tikus diangkat dan dikembalikan ke kandangnya untuk dikeringkan (Alvin & Terry, 2009).

Semakin besar waktu yang didapat maka semakin lama waktu tikus untuk berada dalam kuadran target. Sebaliknya, semakin kecil waktu yang didapat maka semakin kecil waktu tikus untuk berada dalam kuadran target (Yunanto, 2014).

#### **H. Alur Jalannya Penelitian**

1. Pengadaan induk tikus dengan umur 4-5 bulan, sehat, siap kawin dan siap bunting.
2. Induk tikus yang kemudian diadaptasikan selama 6 hari.
3. Tikus dikawinkan dengan pejantan.
4. Tikus putih diinduksi PTU 0,025 % mulai kehamilan hari ke 15 hingga laktasi hari ke 21
5. Anak-anak tikus yang telah lahir tetap menyusu induk hingga umur 21 hari kemudian disapih.
6. Pemberian susu kedelai hitam mulai usia 22 hari sampai 60 hari (akhir penelitian).
7. Latihan dan pengukuran waktu latensi selama 7 hari berturut-turut dilakukan sejak hari ke 53 sampai hari ke 59 usia tikus.
8. Pengukuran memori spasial dengan tes probe pada hari ke 60 usia tikus.

## I. Analisis Data

Uji statistik berupa tes normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50 sampel, didapatkan sebagian data berdistribusi normal dan sebagian lagi tidak berdistribusi normal. Distribusi data yang normal dianalisis statistik menggunakan uji *One Way Anova* dan distribusi data yang tidak normal menggunakan *Kruskal-Wallis Test*. Kemudian dilakukan *Mann Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan nilai antar kelompok. Hasil disajikan dalam bentuk nilai rata-rata dan standar deviasi. Analisis perbedaan hasil pada tiap kelompok, dinyatakan dengan tingkat signifikansi ( $p$ ) < 0,05. Analisis ini untuk membuktikan bahwa susu kedelai hitam berkhasiat memperbaiki memori spasial pada tikus hipotiroid kongenital.

## J. Etika Penelitian

Karya Tulis Ilmiah ini telah mendapatkan persetujuan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian FKIK UMY tentang penggunaan hewan uji sebagai subyek penelitian, dengan nomor : 190/EP-FKIK-UMY/VI/2016.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan tikus putih *Sprague Dawley* yang belum pernah mendapat perlakuan, usia 4-5 bulan, sehat, siap kawin dan bunting. Tikus dipelihara dengan pemberian makanan berupa pelet AD2 dan minuman dengan air. Pencahayaan diberikan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Temperatur tempat pemeliharaan tikus dibiarkan alami sesuai suhu ruangan. Tikus akan dieksklusi jika mengalami sakit selama penelitian.

Tikus betina dikawinkan dengan pejantan dan dicatat hari kebuntingannya. Induk tikus yang bunting dibagi menjadi 4 kelompok. 2 kelompok tikus diinduksi hipotiroid dengan diberi *prophylthiourasil* (PTU) dan 2 kelompok normal atau tanpa induksi hipotiroid. Pemberian PTU dilakukan sejak hari ke 15 kebuntingan hingga hari ke 21 laktasi sejumlah 0,025 %. Pemberian PTU ini dilakukan dengan cara dicampurkan ke dalam air minum tikus.

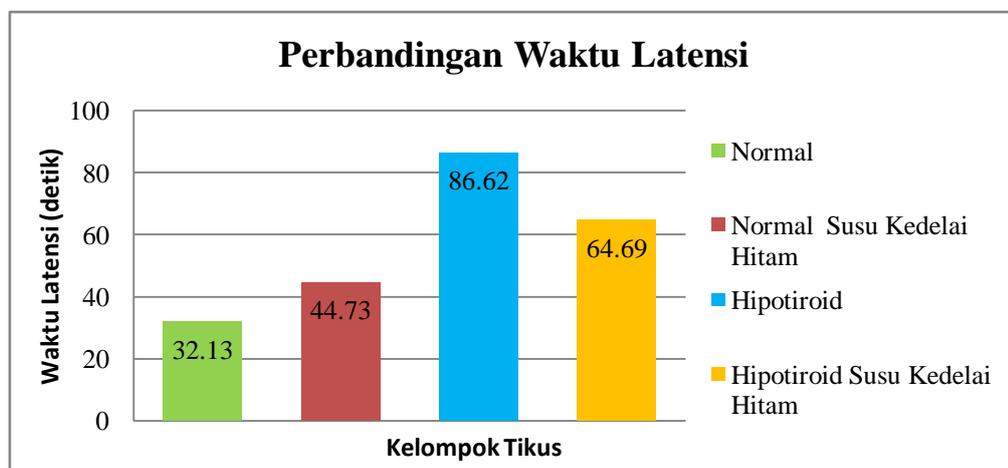
Penelitian ini menggunakan 28 ekor anak tikus dari induk yang telah diberi perlakuan sesuai kelompok. Terdapat perbedaan waktu dan iklim saat kelahiran anak-anak tikus. 28 ekor anak tikus ini terbagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok tikus normal, kelompok tikus normal diberi susu kedelai hitam, kelompok tikus hipotiroid, dan kelompok tikus hipotiroid diberi susu kedelai hitam. Memori spasial tikus diukur dengan menggunakan metode

*Morris Water Maze*. Rata-rata waktu yang dicapai tikus pada *Morris Water Maze* dapat dilihat pada tabel 1 dan 2

Tabel 4. 1. Rerata Waktu Latensi Pembelajaran

No.	Kelompok Tikus	n	Waktu Latensi $\pm$ SD (detik)
1	Tikus Normal	7	32,13 $\pm$ 7,96 <sup>a</sup>
2	Tikus Normal Diberi Susu Kedelai Hitam	7	44,73 $\pm$ 25,80 <sup>ac</sup>
3	Tikus Hipotiroid	7	86,62 $\pm$ 8,17 <sup>b</sup>
4	Tikus Hipotiroid Diberi Susu Kedelai Hitam	7	64,69 $\pm$ 23,89 <sup>c</sup>
<i>Significancy Kruskal-Wallis</i>			<i>p = 0,001</i>

Keterangan: Pangkat huruf yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ( $p \leq 0,05$ ).



Gambar 4. Histogram Perbandingan Waktu Latensi Pembelajaran.

Rerata waktu latensi tikus dapat menemukan *platform* paling kecil ditemukan pada kelompok tikus normal dan paling besar pada tikus hipotiroid ( $p < 0,05$ ). Kelompok tikus hipotiroid diberi susu kedelai hitam dan kelompok normal diberi susu kedelai hitam memperoleh rerata waktu latensi yang lebih

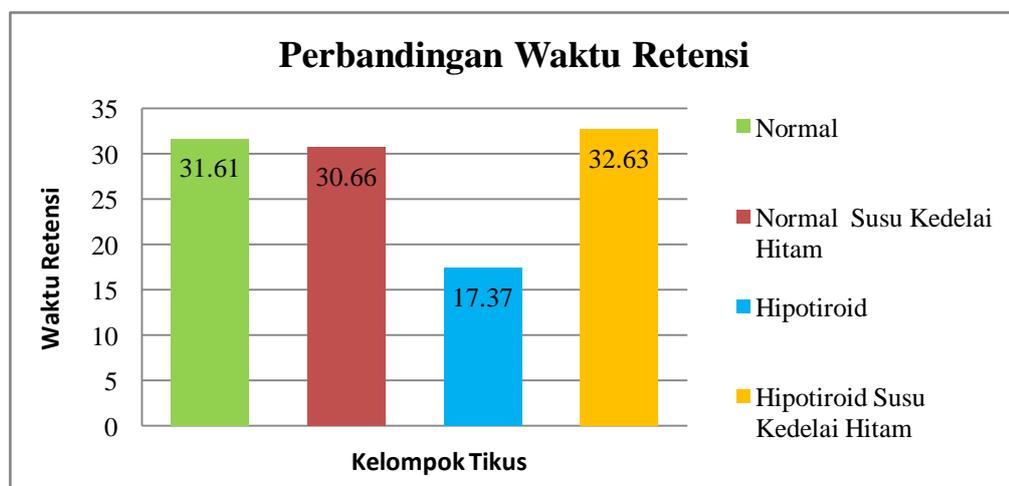
kecil sehingga membutuhkan waktu yang lebih singkat untuk menemukan *platform* dibandingkan kelompok tikus hipotiroid ( $p < 0,05$ ). Rerata waktu latensi kelompok tikus hipotiroid yang diberi susu kedelai hitam menunjukkan bahwa tikus telah dapat menemukan *platform* kurang dari 90 detik, sedangkan kelompok hipotiroid masih mengalami kesulitan dalam menemukan *platform*.

Tabel 4. 2. Rerata Waktu Retensi Memori

No.	Kelompok Tikus	n	Waktu Retensi $\pm$ SD (detik)	Persentase
1	Tikus Normal	7	31,61 $\pm$ 8,91 <sup>a</sup>	35,12 %
2	Tikus Normal Diberi Susu Kedelai Hitam	7	30,66 $\pm$ 8,97 <sup>a</sup>	34,07 %
3	Tikus Hipotiroid	7	17,37 $\pm$ 6,09 <sup>b</sup>	19,3 %
4	Tikus Hipotiroid Diberi Susu Kedelai Hitam	7	32,63 $\pm$ 3,90 <sup>a</sup>	36,26 %

*Significancy Annova*  $p = 0,002$

Keterangan: Pangkat huruf yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ( $p \leq 0,05$ ).



Gambar 5. Histogram Perbandingan Waktu Retensi Memori

Rerata waktu tikus dapat bertahan di dalam kuadran *platform* paling kecil ditemukan pada kelompok tikus hipotiroid dan paling besar pada tikus hipotiroid diberi susu kedelai hitam ( $p < 0,05$ ). Kelompok tikus normal dan kelompok tikus normal diberi susu kedelai hitam memiliki rerata waktu dan prentase lebih besar sehingga berada di kuadran *platform* lebih lama dari kelompok tikus hipotiroid ( $p < 0,05$ ). Rerata waktu kelompok tikus hipotiroid yang diberi susu kedelai mampu menyamai kelompok normal dan kelompok tikus normal susu kedelai hitam ( $p > 0,05$ ). Kelompok tikus normal susu kedelai hitam tidak mengalami peningkatan waktu yang signifikan jika dibandingkan dengan tikus normal ( $p > 0,05$ ).

## **B. Pembahasan**

Waktu latensi menunjukkan waktu yang diperoleh tikus selama pembelajaran. Diperoleh rerata waktu latensi paling besar pada kelompok tikus hipotiroid dengan rata-rata  $86,62 \pm 8,17$  detik. Waktu paling kecil ditemukan pada kelompok tikus normal dengan rerata  $32,63 \pm 3,90$  detik ( $p < 0,05$ ). Rerata waktu kelompok tikus normal diberi susu kedelai hitam  $44,73 \pm 25,80$  detik. Rerata waktu ini lebih baik dari kelompok tikus hipotiroid diberi susu kedelai dengan rerata waktu  $64,69 \pm 23,89$  detik.

Rerata waktu retensi paling kecil ditemukan pada kelompok dengan perlakuan hipotiroid dengan rata-rata  $17,37 \pm 6,09$  detik. Rerata waktu paling besar ditemukan pada kelompok hipotiroid dengan pemberian susu kedelai hitam dengan rata-rata  $32,63 \pm 3,90$  detik ( $p < 0,05$ ). Kelompok tikus hipotiroid susu kedelai hitam ini telah mampu menyamai rerata waktu kelompok tikus

normal yang memiliki rerata waktu  $31,61 \pm 8,91$  detik dan kelompok tikus normal yang diberi susu kedelai hitam dengan rerata waktu  $30,66 \pm 8,97$  detik ( $p > 0,05$ ). Rerata waktu retensi pada kelompok tikus normal dan tikus normal diberi susu kedelai hitam tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian susu kedelai hitam dapat meningkatkan memori spasial pada tikus hipotiroid kongenital. Hal ini dapat dikaji dari hasil penelitian dan dikaitkan dengan beberapa penelitian sebelumnya.

Kelompok tikus normal tidak mendapat perlakuan hipotiroid sehingga tidak terdapat gangguan pada hipokampusnya. Pertumbuhan dan perkembangan otaknya juga normal sehingga memori dan daya ingat tikus ini dalam keadaan baik. Kelompok ini mendapatkan nutrisi dari makanan dan minuman yang cukup sehingga nutrisinya terpenuhi selama masa kehamilan sampai waktu pengujian memori spasial.

Nutrisi secara jelas berperan langsung dalam neurobiologi sistem saraf pusat termasuk area hipokampus yang terlibat dalam proses pembelajaran dan memori yaitu pada konstruksi peta spasial kognitif terhadap lingkungan sekitar (memori spasial). Peta ini mampu membuat hewan mengidentifikasi perbedaan tempat dan situasi. Jika terjadi gangguan pada area hipokampus yang diakibatkan kekurangan nutrisi, maka dapat berdampak pada memori spasial. Penelitian lain menunjukkan bahwa malnutrisi pada awal kehidupan

menyebabkan penurunan progenitor neural hipokampus dan juga defisit terhadap pengenalan obyek saat dewasa (Yunanto, 2014).

Tikus normal yang saat latihan terbiasa dan ingat dengan pijakan di *platform* akan mencari *platform* yang telah diambil sebelum tes dilakukan. Tikus normal berenang di dalam dan di sekitar kuadran target untuk menemukan *platform*. Rerata waktu yang dibutuhkan tikus normal di dalam kuadran target lebih lama yaitu  $31,61 \pm 8,91$  detik jika dibandingkan dengan waktu yang dibutuhkan tikus hipotiroid dengan rata-rata  $17,37 \pm 6,09$  detik. Rerata waktu ini menunjukkan memori spasial tikus normal lebih baik dari tikus hipotiroid.

Tikus normal yang diberi susu kedelai hitam memiliki rerata waktu yang tidak signifikan jika dibandingkan dengan kelompok normal. Penelitian yang dilakukan oleh Rendeiro *et al.* (2013) menunjukkan bahwa antosianin murni dengan kadar  $179,0 \mu\text{g}$  dan flavonol  $59,3 \mu\text{g}$  yang diekstrak dari *blueberry* diberikan pada tikus normal selama 6 minggu terbukti signifikan meningkatkan memori spasial. Penelitian yang dilakukan Shinomiya *et al.* (2005) menunjukkan bahwa pemberian 5 % ekstrak kulit biji kedelai hitam dari makanan bisa meningkatkan memori tikus secara signifikan pada pada hari ke 30. Tapi setelah hari ke 35 pemberian, perbandingan memori pada kelompok kontrol dan kelompok yang diberi ekstrak kedelai hitam menjadi tidak signifikan lagi. Hal ini menunjukkan bahwa pada rentan waktu tertentu kedua kelompok tikus telah belajar untuk mengingat target yang dituju

sehingga perbandingan memori tikus kelompok normal dan kelompok normal diberi ekstrak kedelai hitam menjadi tidak signifikan.

Tikus normal yang diberi susu kedelai hitam ini memiliki perbedaan rerata waktu yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok hipotiroid. Nutrisi yang optimal serta pemberian susu kedelai hitam akan memberikan dampak baik pada pertumbuhan dan perkembangan otak sehingga memori spasial pada tikus normal yang diberi susu kedelai hitam ini lebih tinggi.

Tikus hipotiroid tanpa pemberian susu kedelai memiliki rerata waktu tes memori spasial paling kecil dibanding kelompok lain. Penurunan memori pada tikus disebabkan karena pemberian PTU pada masa gestasi hingga laktasi sehingga tikus menjadi hipotiroid kongenital. Penelitian yang dilakukan kepada hewan uji tikus menunjukkan bahwa pemberian *Propylthiouracil* (PTU) menyebabkan tikus menjadi hipotiroid. PTU menghambat organifikasi iodium sehingga mencegah sintesis hormon tiroid. Obat PTU ini juga menghambat penggabungan iodotirosin dan menghambat deiodinasi T4 dan T3 di perifer. Hal ini sesuai dengan penelitian Hapon *et al.* (2003) menyatakan bahwa intervensi PTU 0,1 g/L selama satu bulan dapat menjadikan tikus sudah hipotiroid (Sukandar, 2014). Penelitian Hardianto (2015) membuktikan pemberian PTU dosis 0,025 % dari hari ke 15 kebuntingan sampai hari ke 21 kelahiran tikus bisa membuat anak-anak tikus menjadi hipotiroid kongenital. Penelitian ini anak-anak tikus usia 3 minggu diukur kadar ft4 serumnya dan didapatkan hasil rerata  $0,08 \pm 0,16$  ng/dl.

Pengujian dengan *Morris Water Maze* menunjukkan bahwa tikus kelompok hipotiroid ini masih kesulitan dalam menemukan *platform*. Tikus berenang mengelilingi kolam dan sering menjauh dari kuadran target. Saat pengukuran waktu latensi, kelompok tikus hipotiroid ini menunjukkan waktu yang lebih lama dalam menemukan *platform* dibandingkan dengan kelompok tikus normal yang menandakan telah terjadi penurunan memori. Setelah diukur lagi dengan probe tes hasilnya tetap terjadi penurunan memori. Waktu yang dibutuhkan tikus hipotiroid di dalam kuadran target lebih kecil dibanding waktu yang didapat dari kelompok lain ( $p < 0,05$ ).

Hormon tiroid sangat penting peranannya pada bayi dan anak yang sedang tumbuh. Apabila hipotiroidisme pada janin atau bayi baru lahir tidak diobati, dapat menyebabkan kelainan intelektual dan atau fungsi neurologik yang menetap, ini menunjukkan betapa pentingnya peran hormon tiroid dalam kehidupan pada perkembangan otak (Brown, 2007).

Tikus hipotiroid yang diberi susu kedelai hitam mengalami perbaikan memori spasial karena pemberian susu kedelai hitam yang mengandung nutrisi untuk meningkatkan kemampuan memori otak, mencegah penyakit neurologis, serta memperbaiki defisit memori (Jeong *et al.*, 2014). Saat pengukuran waktu latensi, kelompok tikus hipotiroid yang diberi susu kedelai hitam memiliki rerata waktu yang lebih besar dibanding kelompok tikus normal ( $p > 0,05$ ). Tapi setelah dilakukan tes probe didapatkan peningkatan memori spasial sehingga rerata waktu tikus hipotiroid diberi yang susu kedelai dapat menyamai waktu tikus normal ( $p > 0,05$ ).

Kedelai hitam meningkatkan memori spasial melalui jalur *Brain-Derived Neurotropic Factor* (BDNF). BDNF adalah suatu neurotropin yang berperan dalam perkembangan sinap, plastisitas sinap, menginduksi neurogenesis dan fungsi kognitif (Hermanto, 2004). BDNF mempunyai peranan meregulasi *cell survival* dan kematian sel yang terprogram (apoptosis) pada masa perkembangan otak. BDNF berperan pada fungsi fisiologis sistem saraf pusat, perkembangan maturasi korteks dan plastisitas sinaps. Flavonoid dan metabolitnya termasuk antosianin dan isoflavon yang terdapat dalam kedelai hitam dapat melewati sawar darah otak dan bisa menunjukkan aksi neurofarmakologikal di tingkat molekuler, yang mempengaruhi jalur sinyal, ekspresi gen dan fungsi protein. Antosianin murni yang diekstrak dari *blueberry* terbukti signifikan meningkatkan ekspresi mRNA BDNF pada hipokampus (Rendeiro *et al.*, 2013). Anak yang mendapatkan asupan nutrisi yang cukup membuat pertumbuhan dan perkembangan otaknya menjadi baik. Kelompok tikus yang dibuat hipotiroid kongenital dan mengalami kegagalan dalam pertumbuhan dan perkembangan otaknya, menunjukkan peningkatan memori spasial setelah diberikan susu kedelai hitam.

Selain antosianin, kedelai hitam juga memiliki kandungan lain yang juga menjadi nutrisi bagi otak, yakni isoflavon sebagai fitoestrogen. Isoflavon menunjukkan efek estrogenesitas, dapat berikatan dengan reseptor estrogen dan menginduksi produk spesifik dari gen yang merespon estrogen. Estrogen dapat memunculkan beberapa efek pada saraf otak. Estrogen memfasilitasi pembentukan aksonal, perbaikan neuronal, dan induksi neurogenesis dan

mungkin juga mengurangi *Reactive Oxygen Species* (ROS) terkait kerusakan neuronal dan melindungi asam nukleat neuronal terhadap konsekuensi merugikan dari stres oksidatif (Dong *et al.*, 2013). Penurunan produksi hormon estrogen dalam tubuh dapat mengakibatkan penurunan kadar neurotransmitter yang berperan dalam fungsi ingatan yaitu asetilkolin, glutamat, *neurotrophic*, dan endorfin yang berada di otak (Proverawati 2010).

Kedelai hitam tergolong bahan pangan yang bersifat fungsional dan memiliki nilai gizi yang tinggi. Kandungan antosianin dan isoflavon yang tinggi dalam kedelai hitam membuatnya menjadi makanan yang sangat esensial bagi fungsi otak. Ketersediaan kedelai hitam cukup melimpah dan harganya relatif murah dan mudah didapat di pasaran.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian susu kedelai hitam dapat memperbaiki dan meningkatkan memori spasial pada tikus hipotiroid kongenital.
2. Pemberian susu kedelai hitam tidak meningkatkan memori spasial pada tikus normal karena tikus normal yang tidak diberi susu kedelai hitam juga telah belajar untuk mengingat target yang dituju.

#### B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang manfaat susu kedelai hitam untuk memperbaiki struktur otak pada tikus hipotiroid kongenital dengan cara pembuatan dan pengamatan preparat histologi otak.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh susu kedelai hitam terhadap kadar molekul BDNF di otak.
3. Perlu dilakukan penelitian fisiologis lebih lanjut terhadap manusia agar manfaatnya bisa dirasakan langsung pada penderita hipotiroid kongenital.
4. Perlu perawatan yang lebih intensif terutama untuk kelompok tikus hipotiroid agar tidak banyak yang mati pada saat berjalannya penelitian.
5. Penelitian selanjutnya disarankan menggunakan alat perekam dengan *video tracking system* saat pengujian *Moris Water Maze*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Almeida, A., Buitrago, J.M.G., Bolanos, J.P., Medina, J.M. (1996). Fuel Utilization by Early Newborn Brain Is Preserved under Congenital Hypothyroidism in the Rat. *Pediatric Research*. 40: 410–414
- Alvin, V. & Terry, Jr. (2009). Spatial navigation (*Water Maze*) tasks. In : Buccafusco, JJ (Ed.) : *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.
- Astadi, I.R., M. Astuti, U. Santoso and Nugraheni P.S. (2009). In Vitro Antioxidant Activity of Anthocyanins of Black Soybean Seed Coat In Human Low Density Lipoprotein (LDL). *Food Chem.*, 122 : 659 - 663
- Atkinson, R., & Shiffrin, R. M. (1968). Human Memory: A proposed System and Its Control Process. Dalam K.W, Spence dan J. T., *The psychology of learning and motivation: Vol 2* (hal 89-195). New York: Academic Press
- Batubara, J.R.L., Trijaja B., Pulungan A. B. (2010). Gangguan Kelenjar Tiroid. Dalam: Buku Ajar Endokrinologi Anak Edisi 1. Jakarta: Badan Penerbit IDAI. hal.205-212.
- Brown, R. S. and Huang S. (2007). The Thyroid and Its Disorders. In: Brook CGD, Clayton PE, Brown RS, eds. *Brooks Clinical Pediatric Endocrinology*. 5 ed. Massachusetts, Oxford, Victoria: Blackwell Pub : 218 - 53.
- Budyono S. (2011). *Anatomi Tubuh Manusia*. Bekasi: Laskar Aksara. h 20-3
- Cain, D.P. (1998). Testing The NMDA, Long Term Potentiation and Cholinergic Hypothesis of Spatial Memory. *Neuroscience Biobehaviour Rev*, 22 : 181-93
- Cevallos. (2007). Stoichiometric and Kinetic Studies of Phenolic Antioxidants From Andean Purple Corn and Red-Fleshed Sweet Potato. *Journal of Agric. Food Chem*, 51(11): 3313–19.
- Chien H.L., Huang H.Y., and Chou C.C. (2006). Transformation of Isoflavonephytoestrogens During The Fermentation of Soymilk with Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Food Microbiol*. 23 : 772-8.
- Dallas J.S., Foley T.P. (2007). *Pediatric Endocrinology*. 5th edition. Volume 2. Edited by Lifshitz F. USA : Informa Healthcare. p. 415-37
- Damanhuri. (2005). Pewarisan Antosianin dan Tanggap Klon Tanaman Ubijalar (*Ipomea Batatas (L.) Lamb*) terhadap Lingkungan Tumbuh. (Disertasi) Program Studi Ilmu Pertanian Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. 106 h.
- Dixon, R.A. and D. Ferreira. (2002). *Genistein*. *Phytochem.*, 60: 205 – 211.
- Dong Y., Wang Y., Liu Y., Yang N., Zuo P. (2013). Phytoestrogen  $\alpha$ -zearalanol Ameliorates Memory Impairment and Neuronal DNA Oxidation in Ovariectomized Mice. *Clinics*.68(9):1255-1262.

- Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Heo S, and McLaren M. (2010). Brain-Derived Neurotrophic Factor is Associated with Age-Related Decline in Hippocampal Volume. *J. Neurosci*, 30:5368–75.
- Fadil, R. (2005). Hipotiroid Kongenital. *Dalam: Simposium peran endokrinologi anak dalam proses tumbuh kembang anak*. Padang: Bagian IKA FK Unand bekerjasama dengan UKK. *Endokrinologi Anak IDAI*. h. 8-17.
- Federer, W. Y. (1963). *Experimental Design, Theory and Application*. New York: Mac. Millan. hal. 544
- Gillberg, C. (1995). *Clinical Child Neuropsychiatry*. Cambriage University Press
- Girling J. (2008). Thyroid Disease in Pregnancy. *Royal College of Obstetrician and Gynecologist*. 10:237-243
- Gomez P. F. (2008). The influences of diet and exercise on mental health through hormesis. *Ageing Res Rev*, 7. p. 49-62
- Guyton, AC. & Hall, JE. (2007). *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 9. Jakarta: EGC
- Hardianto, H. A. (2015). *Uji Potensi Ikan Kembung (Rastrelliger Sp) Terhadap Kadar Ft4 Serum Pada Tikus Putih Hipotiroid Kongenital*. Karya Tulis Ilmiah strata satu, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Yogyakarta.
- Hermanto T.J. (2004). Smart Babies Through Prenatal University. Mission Impossible? *Majalah Obstetri dan Ginekologi Indonesia*, 28(1). p. 14
- Jeong J.H., Jo Y.N., Kim H.J., Jin D.E., Kim D.O., Heo H.J. (2014). Black Soybean Extract Protects Against TMT-Induced Cognitive Defects in Mice. *Journal of Medicinal Food*. 17(1): 83–91
- Jumadi. (2009) Pengkajian Teknologi Pengolahan Susu Kedelai (Vol.14 No.1). *Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian*, 34 – 36.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. (2012). *Pedoman Skrining Hipotiroid Kongenital*. Jakarta
- Kumorowulan S, Supadmi S. (2010). Kretin Endemik dan Kretin Sporadik (Hipotiroid Kongenital). *MGMI*, 1(3): 78-119.
- LaFranchi S. (2000). Disorders of the Thyroid Gland. Dalam: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. *Nelson textbook of pediatrics*. Edisi ke-16. Philadelphia:WB Saunders Co;1696-1705.
- Nurrahman, M., Astuti, Suparmo dan Soesatyo M.H.N.E. (2012). Pertumbuhan Jamur, Sifat Organoleptik dan Aktivitas Antioksidan Tempe Kedelai Hitam yang Diproduksi dengan Berbagai Jenis Inokulum. *J. Agritech*, 32(1):60 – 65.
- Oki, T. (2008). Involvement of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds in Radical Scavenging Activity of Purple-Fleshed Sweet Potato Cultivars. *Journal of Food Science*. 67 (5): 1752–56
- O’Keefe, J. (1976). *Place Unit in the Hippocampus of the Freely Moving Rat*. *Exp. Neurol*. 51:78-109
- Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.78. (2014). *Skrining Hipotiroid Kongenital*. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI.

- Pallav, S. A. (2011). Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age? A review. *Biomedicine International*, 2, 81-89.
- Passer, M.W., & Smith, R.E. (2007). *Psychology : The Science of Mind and Behavior* (3<sup>rd</sup> ed.). New York: McGraw-Hill
- Pauwels E.K., Smit J.W., Slats A., Bourguignon M., Overbeek F. (2000). Health effects of therapeutic use of <sup>131</sup>I in hyperthyroidism. *QJ Nucl Med.*, 44(4):333-9
- Proverawati, A. (2010). *Menopause dan Syndrome Premenopause*. Yogyakarta: Nuha Medika.
- Puspitasari V.D. (2015). *Efek Aktifitas Jalan Cepat dan Terapi Tiroksin Terhadap Memori Spasial Tikus Hipotiroid Kongenital pada Masa Pertumbuhan*. Karya Tulis Ilmiah strata satu, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Yogyakarta.
- Rathus, S.A. (2005). *Psychology: Concept and Connections* (9<sup>th</sup> ed.). Canada: Thompson Learning.
- Rendeiro, C. Vauzour D., Rattray M., Te'guo P. W., Me'rillon J. M., Butler L. T., Williams C. M., Spencer J. P. E. (2013). Dietary Levels of Pure Flavonoids Improve Spatial Memory Performance and Increase Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Plos one*. 5, 1-8.
- Robertson K.M., O'Donnell L., Simpson E.R., Jones M.E.E. (2002). *The Phenotype of Aromatase Knockout Mouse Reveals Dietary Phytoestrogens impact Significantly on Testis Fuction*. *Endocrinology*
- Saidu, J.P. (2005). *Development, Evaluation, and Characterization of Protein-Isoflavone Enriched Soymilk*. Dissertation. The Departement of Food Science Lousiana State University
- Septiana, S.I. (2014). *Pengaruh Pemberian Ikan Teri (Engraulis Encrasicolus) terhadap Memori Spasial Tikus Sprague Dawley Usia Satu Bulan*. Karya Tulis Ilmiah strata satu, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Sherwood, L. (2010). *Human physiology: The Central Nervous System*. 7th ed. Philadelphia: Brooks, 157-65
- Shinomiya K., Tokunaga S., Shigemoto Y., Kamei C. (2005). Effect Of Seed Coat Extract From Black Soybeans On Radial Maze Performance In Rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 32: 757-760
- Sukandar, P. B, Susbiantonny A., Supadmi S. (2014). Pengaruh Iodium dan Selenium terhadap Jumlah Sel Spermatogonium dan Struktur Histologis Tubulus Seminiferus Testis Tikus Wistar Hipotiroid. *MGMI*. 6(1): 1-10
- Sunartini. (2005). Neonatal Screening for Congenital Hypothyroidism: Prevention of Mental Retardation in Children. Proceedings of the 17th Asean Conference on Mental Retardation. Yogyakarta.
- Tsourounis C. (2004). Clinical Effects of Fitoestrogens. *Clinical Obstetrick and Genycology* 44(4):836-42

- Vorhees, C. V. and William, M. T. (2006). Morris Water Maze: Procedures for Assessing Spatial and Related Forms of Learning and Memory. *Nat Protoc. Cincinnati*.
- Wardani, A.K., Wardani I.R. (2014). Eksplorasi Potensi Kedelai Hitam untuk Produksi Minuman Fungsional sebagai Upaya Meningkatkan Kesehatan Masyarakat. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2 (4), 58-67
- Williams, R. (1979). Species variations in drug biotransformation. In: B. La Du, H. Mandel & E. Way. *Fundamental of drug metabolism and drug disposition*. New York: The Williams and Wilkins Company., 187 – 203.
- Wirawan, A. (2013). Tumbuh Kembang Anak Hipotiroid Kongenital yang Diterapi Dini dengan Levotiroksin dan Dosis Awal Tinggi. *Sari Pediatri*, Vol. 15, No. 2. Bali.
- Xu, B.J. and S.K.S. Chang. (2007). A Comparative Study on Phenolic Profiles and Antioxidant of Legums as Affected by Extraction Solvents. *J. Food Sci.*, 72(2):159-166.
- Yunanto, A., Sunyoto, D.W., Syahadatina, M., Oktaviyanti, I.K., (2014). *Pengenmbangan Potensi Ikan Selung (Rasbora spp.) Sebagai Sumber Nutrisi Yang Meningkatkan Memori Spasial Dan Ekspresi Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) Otak*. Karya Tulis Ilmiah , Universitas Lambang Mangkurat, Banjarmasin.
- Yoon, T., Okada, J., Jung, M.W., *et al.* (2008). Prefrontal Cortex and Hippocampus Subserve Different Components of Working Memory In Rats. *Learn. Mem.* 15: 97-105.
- Zhao, J.H., S.J. Sun, H. Horiguchi, Y. Arao, N. Kanamori, A. Kikuchi, E. Oguma and F. Kayama. (2005). A Soy Diet Accelerates Renal Damage in Autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Int. Immunopharmacol.*, 5: 1601-1610.

## LAMPIRAN

### Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Waktu Normal	.175	7	.200*	.957	7	.788
Normal Diberi Susu Kedelai Hitam	.230	7	.200*	.857	7	.142
Hipotiroid	.432	7	.000	.501	7	.000
Hipotiroid Diberi Susu Kedelai Hitam	.330	7	.020	.770	7	.021

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

### Test of Homogeneity of Variance

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Waktu Based on Mean	14.836	3	24	.000
Based on Median	3.073	3	24	.047
Based on Median and with adjusted df	3.073	3	12.622	.067
Based on trimmed mean	13.976	3	24	.000

## Kruskal-Wallis Test

**Ranks**

	Kelompok	N	Mean Rank
Waktu	Normal	7	7.29
	Normal Diberi Susu	7	10.14
	Kedelai Hitam	7	24.29
	Hipotiroid	7	16.29
	Hipotiroid Diberi Susu	7	16.29
	Kedelai Hitam	7	16.29
	Total	28	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	Waktu
Chi-Square	17.681
df	3
Asymp. Sig.	.001

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Kelompok

## Mann-Whitney Test

Ranks

Kelompok		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Waktu	Normal	7	6.71	47.00
	Normal Diberi Susu Kedelai Hitam	7	8.29	58.00
	Total	14		

Test Statistics<sup>b</sup>

	Waktu
Mann-Whitney U	19.000
Wilcoxon W	47.000
Z	-.703
Asymp. Sig. (2-tailed)	.482
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.535 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

**Ranks**

Kelompok		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Waktu	Normal	7	4.00	28.00
	Hipotiroid	7	11.00	77.00
Total		14		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Waktu
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.202
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

**Ranks**

Kelompok		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Waktu	Normal	7	4.57	32.00
	Hipotiroid Diberi Susu Kedelai Hitam	7	10.43	73.00
	Total	14		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Waktu
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	32.000
Z	-2.619
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.007 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

**Ranks**

Kelompok		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Waktu	Normal Diberi Susu	7	4.14	29.00
	Kedelai Hitam			
	Hipotiroid	7	10.86	76.00
	Total	14		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Waktu
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	29.000
Z	-3.071
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

**Ranks**

Kelompok		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Waktu	Normal Diberi Susu Kedelai Hitam	7	5.71	40.00
	Hipotiroid Diberi Susu Kedelai Hitam	7	9.29	65.00
	Total	14		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Waktu
Mann-Whitney U	12.000
Wilcoxon W	40.000
Z	-1.597
Asymp. Sig. (2-tailed)	.110
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.128 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

**Ranks**

Kelompok		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Waktu	Hipotiroid	7	10.43	73.00
	Hipotiroid Diberi Susu Kedelai Hitam	7	4.57	32.00
	Total	14		

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Waktu
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	32.000
Z	-2.679
Asymp. Sig. (2-tailed)	.007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.007 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

### Tests of Normality

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Waktu	Normal	.261	7	.163	.874	7	.200
	Normal Diberi Susu Kedelai Hitam	.291	7	.074	.899	7	.326
	Hipotiroid	.234	7	.200*	.935	7	.595
	Hipotiroid Diberi Susu Kedelai Hitam	.186	7	.200*	.961	7	.827

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

### Test of Homogeneity of Variances

Waktu

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.637	3	24	.207

### ANOVA

Waktu	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1081.857	3	360.619	6.788	.002
Within Groups	1275.015	24	53.126		
Total	2356.872	27			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Waktu

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Normal	Normal Diberi Susu Kedelai Hitam	.95143	3.89599	.995	-9.7961	11.6989
	Hipotiroid	14.24286*	3.89599	.006	3.4953	24.9904
	Hipotiroid Diberi Susu Kedelai Hitam	-1.01714	3.89599	.994	-11.7647	9.7304
Normal Diberi Susu Kedelai Hitam	Normal	-.95143	3.89599	.995	-11.6989	9.7961
	Hipotiroid	13.29143*	3.89599	.011	2.5439	24.0389
	Hipotiroid Diberi Susu Kedelai Hitam	-1.96857	3.89599	.957	-12.7161	8.7789
Hipotiroid	Normal	-14.24286*	3.89599	.006	-24.9904	-3.4953
	Normal Diberi Susu Kedelai Hitam	-13.29143*	3.89599	.011	-24.0389	-2.5439
	Hipotiroid Diberi Susu Kedelai Hitam	-15.26000*	3.89599	.003	-26.0075	-4.5125

Hipotiroid Diberi Susu	Normal	1.01714	3.89599	.994	-9.7304	11.7647
Kedelai Hitam	Normal Diberi Susu Kedelai	1.96857	3.89599	.957	-8.7789	12.7161
	Hitam					
	Hipotiroid	15.26000*	3.89599	.003	4.5125	26.0075

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.