

BLACK MILK (BLACK SOY MILK) FOR IMPROVEMENT OF SPATIAL MEMORY ON CONGENITAL HYPOTHYROIDISM RATS

BLACK MILK (SUSU KEDELAI HITAM) UNTUK PENINGKATAN MEMORI SPASIAL TIKUS HIPOTIROID KONGENITAL

Fahmi Nugraha¹, Hendrian Ade Hardianto¹, Afif Ariyanwar¹, Hanggoro Kharisma Agung¹, Agung Huda Bayu¹ dan Zulkhah Noor²

Mahasiswa Fakultas Kedokteran UMY¹

Bagian Fisiologi Fakultas kedokteran UMY²

ABSTRACT

Congenital Hypothyroidism (CH) causes intellectual disability and brain development disorder in newborns. This happens because the fetus is experiencing a deficiency of the hormone during pregnancy. Congenital hypothyroidism therapy with levo-thyroxine can not be given the fullest and comprehensive to address the incidence of congenital hypothyroidism. So, it is proposed that black soybeans contain anthocyanins and isoflavones as an antioxidant that can stimulate brain development and memory. The purpose of this study was to determine the effect of the black soy milk administration toward spatial memory on rats with congenital hypothyroidism.

This research method is pure experimental conducted by post test controlled group design toward the testing mice. This research was conducted at the Laboratory of Physiology of the Faculty of Medicine, University of Muhammadiyah Yogyakarta. Subjects consisted of 28 rats were divided into 4 groups consisting of a normal group, normal given the black soybean milk, hypothyroidism, and hypothyroidism were given black soy milk. Congenital hypothyroidism is made by providing propylthiouracil (PTU) dose of 0.025% to the pregnant mother from day 15 to postnatal day 21. Black soy milk made with a dose of 4.5 grams of black soybean / 200 gram rat / day. Spatial memory was measured using the Morris Water Maze. Statistical analysis using the Anova and Kruskal-Wallis test.

The shortest time of the probe test found in group of hypothyroid rat with average 17.37 ± 6.09 and the longest found in group of hypothyroid rat fed black soy milk that is 32.63 ± 3.90 ($p < 0.05$). The group of normal rat with an average of 31.61 ± 8.91 and the group of normal rat fed black soy milk with an average of 30.66 ± 8.97 indicate a longert average time than hypothyroid rats group ($p < 0, 05$). The average time of hypothyroid rat group fed black soy milk was able to match the normal group and the group of normal rat fed black soy milk ($p > 0.05$).

Key words: congenital hypothyroidism, black soy milk, spatial memory.

ABSTRAK

Hipotiroid kongenital (HK) menjadi penyebab disabilitas intelektual dan gangguan dalam perkembangan otak pada bayi baru lahir. Hal ini dapat terjadi karena janin kekurangan hormon tiroid pada masa kehamilan. Terapi hipotiroid kongenital dengan levo-tiroksin tidak dapat diberikan secara maksimal dan menyeluruh untuk menangani kejadian hipotiroid kongenital. Untuk itu, diusulkan kedelai hitam yang mengandung antosianin dan isoflavan sebagai antioksidan yang dapat menstimulasi perkembangan otak dan memori. Tujuan dari penelitian ini ialah untuk mengetahui pengaruh pemberian susu kedelai hitam terhadap memori spasial pada tikus hipotiroid kongenital.

Metode penelitian ini adalah eksperimental murni yang dilakukan dengan rancangan *post test controlled group design* terhadap hewan uji. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi FKIK UMY. Subjek penelitian terdiri dari 28 ekor tikus yang dibagi dalam 4 kelompok yang terdiri dari kelompok normal, normal diberi susu kedelai hitam, hipotiroid, dan hipotiroid diberi susu kedelai hitam. Hipotiroid kongenital dibuat dengan cara memberikan propiltiourasil (PTU) dosis 0,025% kepada induk bunting mulai hari 15 hingga postnatal hari ke 21. Pemberian susu kedelai hitam dengan dosis 4,5 gram kedelai hitam/200 gram tikus/hari. Memori spasial diukur menggunakan *Morris Water Maze*. Analisis statistik menggunakan uji *Annova* dan *Kruskal-Wallis*.

Rerata waktu pada tes probe paling kecil ditemukan pada kelompok tikus hipotiroid yaitu $17,37 \pm 6,09$ dan paling besar pada tikus hipotiroid diberi susu kedelai hitam yaitu $32,63 \pm 3,90$ ($p < 0,05$). Kelompok tikus normal dengan rerata $31,61 \pm 8,91$ dan kelompok tikus normal diberi susu kedelai hitam dengan rerata $30,66 \pm 8,97$ menunjukkan rerata waktu yang lebih besar dibandingkan kelompok tikus hipotiroid ($p < 0,05$). Rerata waktu kelompok tikus hipotiroid diberi susu kedelai mampu menyamai kelompok normal dan kelompok tikus normal diberi susu kedelai hitam ($p > 0,05$).

Kata kunci: hipotiroid kongenital, susu kedelai hitam, memori spasial.

PENDAHULUAN

Hipotiroid kongenital (HK) menjadi penyebab disabilitas intelektual pada bayi baru lahir. Hal ini dapat terjadi karena janin kekurangan hormon tiroid pada masa kehamilan. Hormon tiroid berfungsi untuk mengatur metabolisme sel, kerja jantung, perkembangan

neurologis, serta pertumbuhan otak.

Hipotiroid kongenital juga menyebabkan retardasi mental dan gangguan perkembangan otak yang akan berdampak pada kualitas sumber daya manusia¹.

Angka prevalensi kejadian hipotiroid kongenital sangat bervariasi pada berbagai negara di dunia. Prevalensi

HK pada orang Jepang adalah 1:7.600, sedangkan pada populasi kulit hitam sangat jarang. Berdasarkan jenis kelamin, angka kejadian HK dua kali lebih tinggi pada anak perempuan dibandingkan dengan anak laki-laki. Di negara-negara Asia, angka kejadian di Singapura 1:3000-3500, Malaysia 1:3026, Filipina 1:3460, HongKong 1:2404. Angka kejadian lebih rendah di Korea 1:4300 dan Vietnam 1:5502. Proyek pendahuluan di India menunjukkan kejadian yang lebih tinggi di India, 1:1700 dan di Bangladesh 1:2000 Berdasarkan data yang dikumpulkan oleh Unit Koordinasi Kerja Endokrinologi Anak Kemenkes RI, sejak tahun 2000-2013 di Indonesia terdapat kasus positif gangguan tiroid pada bayi baru lahir sebanyak 1:2.736. Rasio ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan rasio global yaitu 1:3000 kelahiran².

Saat ini terapi hipotiroid kongenital dengan levo-tiroksin tidak dapat diberikan secara maksimal dan menyeluruh untuk menangani kejadian

hipotiroid kongenital. Hal ini menyebabkan angka kejadian hipotiroid kongenital masih tinggi di Indonesia³. Diperlukan terapi pengganti yang lebih mudah diperoleh dan bisa diberikan secara optimal agar meminimalisir terjadinya gangguan perkembangan otak pada hipotiroid kongenital. Untuk itu, diusulkan antosianin dan isoflavon sebagai antioksidan yang dapat menstimulasi perkembangan otak dan memori.

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 dipasaran. Berdasarkan latar belakang di atas perlu dilakukan penelitian manfaat kedelai hitam terhadap tikus hipotiroid

kongenital yang mengalami kemunduran fungsi memori.

BAHAN DAN CARA

Desain penelitian ini adalah eksperimental murni yang dilakukan dengan rancangan *post test controlled group design* terhadap hewan uji. 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.

Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Spargue Dawley yang telah ditentukan kriteria inklusinya yaitu anak tikus dengan induk yang diinduksi PTU konsentrasi 0,025% dalam air minum mulai dari hari kebuntingan ke 15 hingga laktasi hari ke 21. Tikus dipelihara dengan pemberian makanan pokok berupa pelet AD2 dan minumam 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. Memori spasial tikus diukur dengan menggunakan metode *Morris Water Maze*.

Subyek dalam penelitian ini berjumlah 28 ekor tikus yang terbagi dalam 4 kelompok, yaitu: kelompok normal, normal diberi susu kedelai hitam, hipotiroid, hipotiroid diberi susu kedelai hitam.

Sebagai variabel bebas adalah susu kedelai hitam, sedangkan variabel terikat adalah memori spasial pada tikus dan variabel terkontrol pada penelitian ini adalah kondisi pakan dan kandang sama pada tiap kelompok.

Pelaksanaan penelitian diawali dengan pengadaan tikus. Tikus dikelompokkan menjadi 4 kelompok dengan masing-masing 7 ekor tiap kelompok. Kemudian tikus diadaptasikan selama 6 hari. Tikus dikawinkan dengan pejantan. Setelah itu, tikus putih diinduksi

PTU 0,025 % mulai kehamilan hari ke 15 hingga laktasi hari ke 21.

Pemberian susu kedelai hitam dilakukan setelah tikus disapih dari hari ke 22 sampai hari ke 60 usia tikus dengan dosis 4,5 gram kedelai hitam/200 gram tikus/hari.

Moris Water Maze dilakukan dalam dua tahap yakni pengukuran waktu latensi dan tes probe. 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.

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 dikeringkan⁴.

Data yang telah terkumpul akan dilakukan uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50 sampel. 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 PENELITIAN

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 prenstase 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 ($p > 0,05$).

Tabel Rerata waktu tes probe

No.	Kelompok Tikus	n	Waktu Tes Probe \pm SD (detik)	Persentase
1	Tikus Normal	7	$31,61 \pm 8,91^a$	35,12 %
2	Tikus Normal Diberi Susu Kedelai Hitam	7	$30,66 \pm 8,97^a$	34,07 %
3	Tikus Hipotiroid	7	$17,37 \pm 6,09^b$	19,3 %
4	Tikus Hipotiroid Diberi Susu Kedelai Hitam	7	$32,63 \pm 3,90^a$	36,26 %
<i>Significancy Annova</i>			$p = 0,002$	

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

Rerata waktu tes probe 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 susu kedelai hitam dengan rerata waktu $30,66 \pm 8,97$ detik ($p > 0,05$). Kelompok tikus normal

dan tikus normal susu kedelai hitam tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

PEMBAHASAN

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.

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 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 signifikan⁵.

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.

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 ($p < 0,05$).

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 memori⁶.

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 kognitif⁷.

Selain antosianin, kedelai hitam juga memiliki kandungan lain yang juga menjadi nutrisi bagi otak, yakni isoflavon sebagai fitoestrogen.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa Pemberian susu kedelai hitam dapat memperbaiki dan meningkatkan memori spasial pada tikus hipotiroid kongenital.

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 secara fisiologis lebih lanjut terhadap manusia agar manfaatnya bisa dirasakan langsung pada penderita hipotiroid kongenital.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada DIKTI yang telah membiayai penelitian ini sehingga kami dapat menyelesaikannya dan membuat artikel ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Batubara, J.R.L. *et al.* Gangguan Kelenjar Tiroid. Dalam: Buku Ajar Endokrinologi Anak Edisi 1. Jakarta: Badan Penerbit IDAI, 2010. hal.205-212.
2. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.78. (2014). Skrining Hipotiroid Kongenital. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI.
3. Sunartini. (2005). Neonatal Screening for Congenital Hypothyroidism: Prevention of Mental Retardation in Children. Proceedings of the 17th Asean Conference on Mental Retardation. Yogyakarta.
4. 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.
5. Shinomiya K., Tokunaga S., Shigemoto Y. and 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.
 6. 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.
 7. Hermanto T.J. (2004). Smart Babies Through Prenatal University. Mission Impossible? *Majalah Obstetri dan Ginekologi Indonesia*, 28(1). p. 14.