

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan studi eksperimental menggunakan *post test only control group design*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan embrio zebrafish dari zebrafish dewasa yang dipelihara di dalam akuarium. Jumlah sampel kelompok kontrol dan perlakuan masing-masing adalah 30 embrio (Aurora, 2012; Abdelkader *et al.*, 2012; Seok *et al.*, 2008). Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan yaitu dosis genistein dan pemberian penghambat reseptor estrogen.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang diamati adalah tingkat kematian (laju mortalitas), laju penetasan dan defek morfologi yang terjadi pada sistem skeletal, *neural tube*, dan jantung.

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah umur zebrafish yang digunakan dan temperatur air di akuarium zebrafish.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Faal, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juni sampai Juli 2013.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan

- Zebrafish dewasa (*Danio rerio*)
- Medium embrio yang terdiri dari 0,004% CaCl_2 , 0,163% MgSO_4 , 0,1% NaCl , dan 0,003% KCl dalam aqua destilata
- Genistein (Sigma-Aldrich G6649-5MG) dilarutkan dalam dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Antiestrogen, ICI 182,780 yang dilarutkan dalam dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Tetramin Mini Granules

4.5.2 Alat

- Tangki akuarium dengan kapasitas 60L
- Piring kultur 6 sumur
- Mikroskop binokular (Leica)
- Cawan petri
- Mikropipet
- *Blue tip* dan *yellow tip*
- Kamera
- Slide object
- Pipet plastik
- Keranjang berjala
- Gelas ukur
- Kertas asturo berwarna hitam
- Gelas ukur 100 mL
- Gelas ukur 10 mL
- Gelas beker 500 mL
- Corong
- Mikrometer
- Falcon

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Pemeliharaan Ikan

Pemeliharaan zebrafish dewasa dilakukan dalam tangki berisi 60 L air. Suhu air dijaga pada suhu 25-30°C. Pengaturan cahaya dengan periode terang selama 14 jam dimulai dari pukul 08.00 dan 10 jam periode gelap. Pemberian makanan dengan Tetramin (TetraJapan Inc.) dua sampai tiga kali setiap hari (Kishida *et al.*, 1999).

4.6.2 Pengambilan Telur

Pengambilan telur dilakukan dengan meletakkan keranjang berjala pada tangki zebrafish dewasa setelah pemberian makan terakhir dan diambil 15-25 menit setelah periode terang dimulai, karena pada saat tersebut terjadi fertilisasi. Telur yang diperoleh dicuci dengan air untuk membersihkannya dari debris (Aurora, 2012).

4.6.3 Kultur Embrio

Telur yang telah dibersihkan diletakkan dalam cawan petri lalu diamati secara langsung untuk menentukan apakah telur tersebut terfertilisasi atau tidak. Telur yang terfertilisasi pada bagian dalam cangkang terdapat bulatan yang berwarna lebih keruh dari tepinya. Pengamatan dilakukan tidak lebih dari 2 jam. Embrio diletakkan pada piring kultur 6 sumur (30 embrio dalam 8 mL embrio medium setiap sumur) dan diinkubasi di ruangan pada suhu ruang sekitar $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Medium embrio diganti satu kali setiap hari sesuai paparan yang diberikan. Embrio dirawat sampai usia 72 jam setelah fertilisasi (Kishida *et al.*, 1999).

4.6.4 Pemaparan

4.6.4.1 Pemaparan Genistein

Pemaparan dilakukan 2 jam setelah fertilisasi. Genistein dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 20 mM kemudian didilusi dalam medium embrio sampai mencapai konsentrasi 5 μM , dan 10 μM . Pada kelompok kontrol, medium embrio mengandung 0,05% DMSO yang merupakan pelarut genistein dengan konsentrasi terbesar (Aurora, 2012).

4.6.4.2 Pemaparan Genistein dan ICI 182,780

Pemaparan dilakukan 2 jam setelah fertilisasi. ICI dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 20 mM kemudian kemudian didilusi dalam medium embrio sampai mencapai konsentrasi 10 μM . Setelah itu, ICI dimasukkan dalam medium embrio yang telah mengandung genistein dengan konsentrasi 5 μM , dan 10 μM . Pada kelompok ICI, medium embrio mengandung 0,05% DMSO dan ICI yang telah dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 20mM (Wyllie and Chen, 2007).

4.6.5 Penghitungan Laju Mortalitas

Laju mortalitas merupakan perbandingan dari embrio maupun larva yang mati dengan jumlah total embrio di setiap sumur. Pengamatan dilakukan per 24, 48, dan 72 jam setelah fertilisasi.

4.6.6 Penghitungan Laju Penetasan

Laju penetasan merupakan perbandingan dari larva yang telah menetas dengan embrio yang masih hidup di setiap sumur. Pengamatan dilakukan per 24, 48, dan 72 jam setelah fertilisasi.

4.6.7 Pengamatan Defek Morfologi

Defek morfologi adalah kelainan bentuk embrio dibandingkan dengan embrio pada kelompok kontrol pada waktu pengamatan yang sama. Defek diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x pada 72 jam setelah fertilisasi. Defek diketahui dengan membandingkan embrio yang mendapat paparan genistein ditambah ICI dengan embrio dari kelompok kontrol dan yang hanya dipapar genistein pada umur yang sama. Defek yang diamati antara lain defek pada sistem skeletal berupa tubuh yang lebih pendek, pada sistem jantung berupa edema perikardial, dan defek pada *neural tube* dimana apabila terjadi defek tampak sebagai ekor yang melengkung (*kifosis/ curly tail*) (Kim *et al.*, 2009; Bakkiyanathan *et al.*, 2010).

Pengamatan berupa panjang tubuh dan ekor yang melengkung hanya dilakukan pada larva yang telah menetas secara spontan sedangkan pengamatan mengenai ukuran perikardium dilakukan pada larva yang telah menetas maupun embrio yang masih berbentuk telur. Pengamatan untuk ekor yang melengkung dilakukan pada seluruh embrio di masing-masing kelompok yang masih hidup pada 72 jam setelah fertilisasi sedangkan pengamatan untuk panjang tubuh dan ukuran perikardium dilakukan pada 10 sampel hidup yang diambil dari masing-masing kelompok. Jumlah ini didapat dari penghitungan rumus sebagai berikut (Supranto, 2000):

$(t-1)(n-1) \geq 15$, dengan t = banyaknya kelompok perlakuan,

n = jumlah sampel tiap perlakuan

karena di dalam penelitian ini diketahui jumlah perlakuan (t) = 6, maka didapat nilai n sebagai berikut:

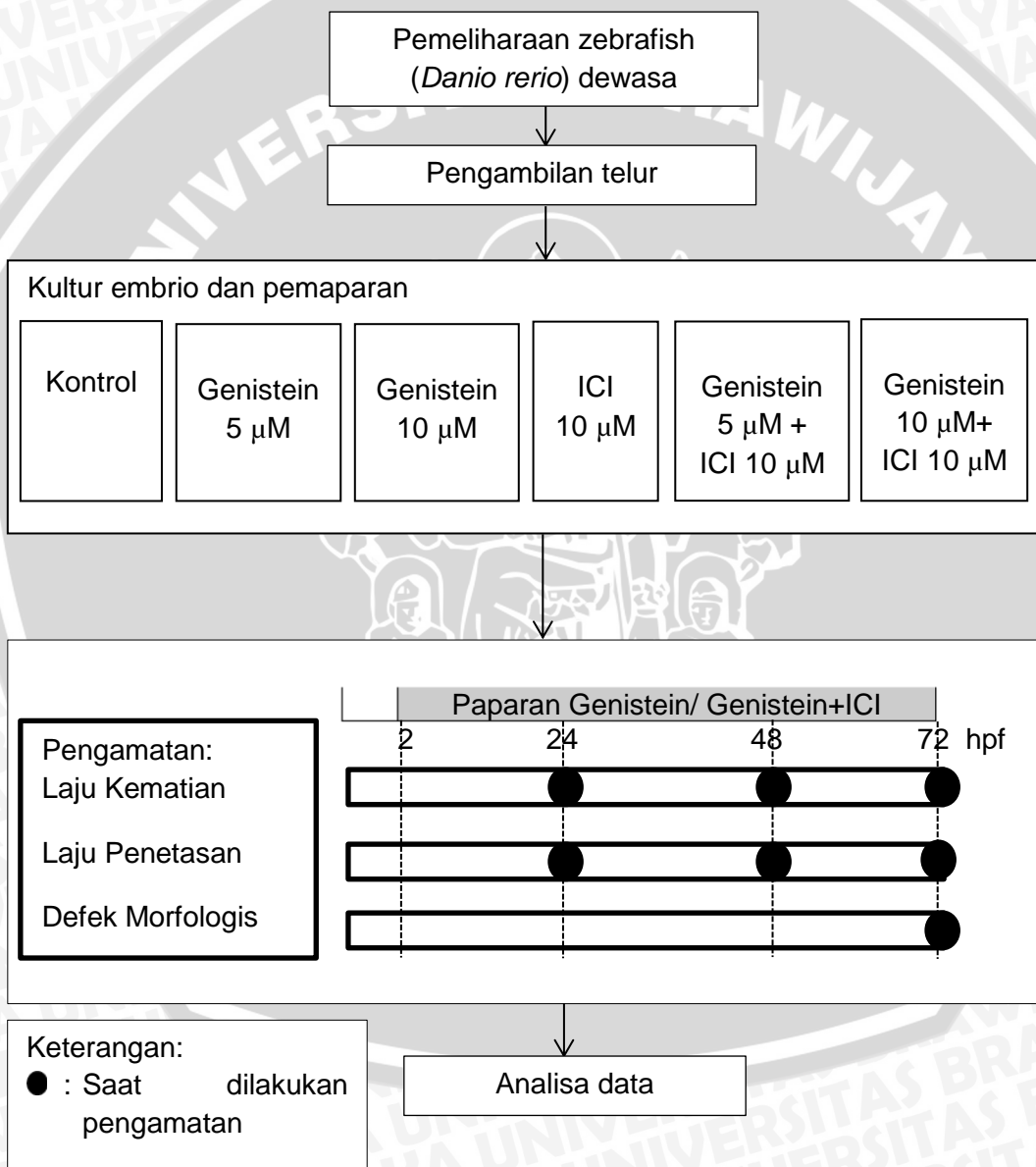
$$(6-1) (n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 15/5$$

$$n \geq 3+1$$

$$n \geq 4$$

4.7 Prosedur Penelitian



Gambar 4.7 Prosedur Penelitian



4.8 Analisa Data

Analisa statistik dalam penelitian ini menggunakan *one-way analysis of varian* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji Tukey dengan software SPSS 16. Nilai perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$. Data yang dianalisa merupakan data dari tiga kali pengulangan (Aurora, 2012; Abdelkader *et al.*, 2012; Seok *et al.*, 2008).

