

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan eksperimental laboratorium dengan *post test only control group design*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan embrio zebrafish yang diambil dari zebrafish dewasa dalam akuarium. Jumlah sampel kelompok kontrol dan perlakuan masing-masing adalah 20 telur. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

- Variabel bebas yang digunakan adalah dosis paparan genistein

4.3.2 Variabel Terikat

- Variabel terikat yang diamati adalah ekspresi *Bax*

4.3.3 Variabel Kontrol

- Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah temperatur embrio dalam inkubator, suhu akuarium, pencahayaan, dan paparan waktu genistein

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium Biomolekuler Universitas Islam Negeri Malang pada bulan Januari 2015-Agustus 2015

4.5 Bahan dan Alat

4.5.1 Bahan

- Zebrafish dewasa (*Danio rerio*), didapatkan dari toko hewan lokal disertifikasi oleh LIPI
- 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)
- Tetramin Flakes
- *Tempelate RNA* sampel
- *i-Green™ 2x qPCR Kit (LR)*

4.5.2 Alat

- Tangki akuarium dengan kapasitas 60 liter
- Piring kultur 6 sumur
- Cawan petri
- Mikropipet
- *Blue tip* dan *Yellow tip*

- Pipet plastik
- Keranjang berjala
- Gelas ukur
- Kertas asturo hitam
- Falcon
- Mesin *cycler real time* PCR

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Pemeliharaan Ikan

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

4.6.2 Pengambilan Telur

Pengambilan telur dilakukan dengan meletakkan keranjang berjala pada akuarium 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 medium embrio untuk membersihkan 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 hpf. Embrio diletakkan pada piring kultur 6 sumur (20 embrio dalam 8 mL embrio medium setiap sumur) dan diinkubasi di ruangan pada suhu ruang sekitar $28 \pm 0,5$ °C. Medium embrio diganti satu kali setiap hari sesuai paparan yang diberikan. Embrio dirawat sampai usia 72 hpf setelah fertilisasi (Kishida et al., 1999).

4.6.4 Pemaparan Genistein

Pemaparan dilakukan 2 hpf setelah fertilisasi. Genistein dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 20 μM kemudian didilusi dalam medium embrio sampai mencapai konsentrasi 0,1 μM ; 1 μM ; 2,5 μM ; dan 5 μM . Pada kelompok kontrol, medium embrio mengandung 0,025% DMSO yang merupakan pelarut genistein dengan konsentrasi terbesar (Aurora, 2012)

4.6.5 Ekspresi Bax

Pengamatan ekspresi Bax dilakukan dengan metode *real time PCR* menggunakan 20 ekor embrio zebrafish tiap sumur dengan diberi paparan genistein dosis konsentrasi 0,1 μM ; 1 μM ; 2,5 μM ; dan 5 μM , primer Bax didapatkan dari IDT (*Integrated DNA Technologies*)

Sequence primer DNA Bax :

Forward : 5'- GAG CTG CAC TTC TCA ACA ACT TT-3'

Reverse : 5'-CTG GTT CAA ATA GCC TTG ATG AC-3'

Sequence primer DNA β -actin :

Forward : 5'- AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC-3'

Reverse : 5'- AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG -3'

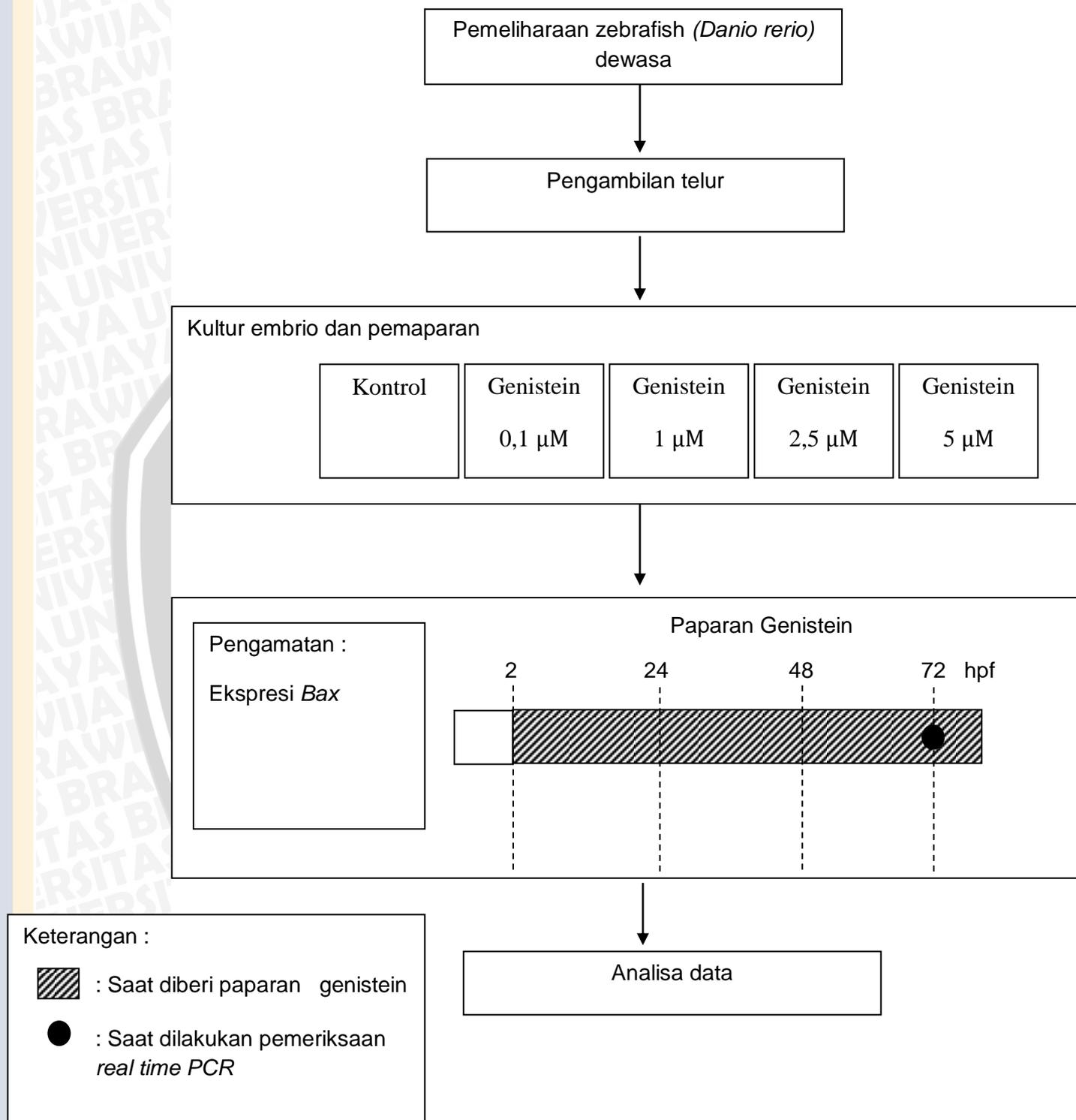
4.6.5.1 Ekstraksi dan Isolasi RNA

Sebelum melakukan pemeriksaan dengan real time PCR, terlebih dahulu dilakukan ekstraksi RNA. Ekstraksi RNA dilakukan pertama-tama dengan menghancurkan embrio zebrafish yang telah dipapar genistein dengan glider di tube yang telah diberi label, kemudian ditambahkan reagen OA, kloroform, dan isopropanol setelah itu divortex dan disentrifugasi, setelah itu dipisahkan larutan supernatannya, dilihat apakah ada pellet tipis dan setelah itu di beri larutan RNAase, kemudian sebagian diambil dengan mikropipet dipindah ke tube yang kecil untuk dilakukan pemeriksaan *nanodrop RNA*, sebelum dilakukan pemeriksaan nanodrop RNA hasil ekstraksi di tube disimpan dalam suhu -80°C.

4.6.5.2 Pemeriksaan dengan *real time PCR*

Pemeriksaan dengan *real time PCR* merupakan pemeriksaan *real time* kuantitatif untuk melihat ekspresi *Bax* pada sampel embrio zebrafish yang telah dipapar genistein sebelumnya. Hal pertama yang dilakukan adalah mencairkan 5 μ L *i-green 2x real time PCR master mix (LR)*, *template RNA* 0,2 μ g, *primer forward* dan *reverse Bax* masing-masing 0,5 μ L, *enzyme mix* 0,2 μ L dan *DNase/RNase free water*, kemudian mencampur sesuai takaran dalam protokol *real time PCR*, setelah itu memrogram *thermal cycler* sehingga sintesis cDNA mengikuti seiring berjalannya amplifikasi *real time PCR*, menempatkan PCR *tubes* pada *real time cycler* dan mulai *cycling* program, kemudian setelah reaksi telah selesai dan komplet lakukan analisis penghitungan ekspresi gen relatif *Bax* dengan menggunakan metode *Livak*.

4.7 Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Prosedur Penelitian

4.8 Analisis Data

Analisa statistik dalam penelitian ini direncanakan menggunakan *One Way ANOVA*, akan tetapi apabila tidak memenuhi syarat maka menggunakan analisis *Kruskall wallis*. Nilai perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$

