

BAB IV

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* yang diambil dari *zebrafish* dewasa dalam akuarium. Jumlah sampel kelompok dan perlakuan masing-masing adalah 30 telur yang didapat dari 10 ekor *zebrafish* jantan dan 20 ekor *zebrafish* betina. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*.

Kriteria inklusi:

- Telur telah terfertilisasi*
- Telur berusia kurang dari 2 hpf (hours post fertilization)

Kriteria eksklusi:

- Telur rusak/cacat morfologis

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan, yang terdiri dari:

- Kelompok yang diberi 40 µg/ml ekstrak antosianin
- Kelompok yang diberi 60 µg/ml ekstrak antosianin
- Kelompok yang diberi 80 µg/ml ekstrak antosianin
- Kelompok kontrol tanpa pemberian ekstrak antosianin

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Februari-Maret 2015

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan yaitu dosis paparan antosianin

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang diamati adalah aktivitas motorik dan motilitas

4.4.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah penelitian embrio dalam jenis air, suhu inkubator, suhu akuarium, pencahayaan, dan paparan waktu antosianin.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan

- *Zebrafish* dewasa (*Danio rerio*) strain wild-type berwarna ungu
- Medium embrio yang terdiri dari 0,04% CaCl₂, 1,63% MgSO₄, 1% NaCl, dan 0,03% KCl dalam aqua destilata
- Antosianin
- Tetramin Mini Granules

4.5.2 Alat

- Tangki akuarium dengan kapasitas 60L
- Heater
- Termometer
- Filter akuarium
- Hiasan akuarium

- Aerator
- Piring kultur 12 sumur
- Cawan petri
- Mikropipet
- *Blue tip* dan *yellow tip*
- Pipet plastic
- Keranjang berjala
- Kertas asturo berwarna hitam
- Gelas ukur 10 mL
- Gelas ukur 100 mL
- Gelas ukur 500 mL
- Tabung Falcon
- Inkubator
- Mikroskop stereo

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Antosianin

Antosianin yang digunakan berasal dari ubi jalar ungu di lereng Gunung Kawi yang diekstraksi dengan teknik ekstraksi, isolasi, pemurnian, dan karakterisasi antosianin di Laboratorium MIPA ITB oleh Dr. Ciptati MS, MSc.

4.6.2 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).

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 terakhir. Telur yang diperoleh kemudian dicuci dengan air untuk membersihkan dari debris (Aurora,2012).

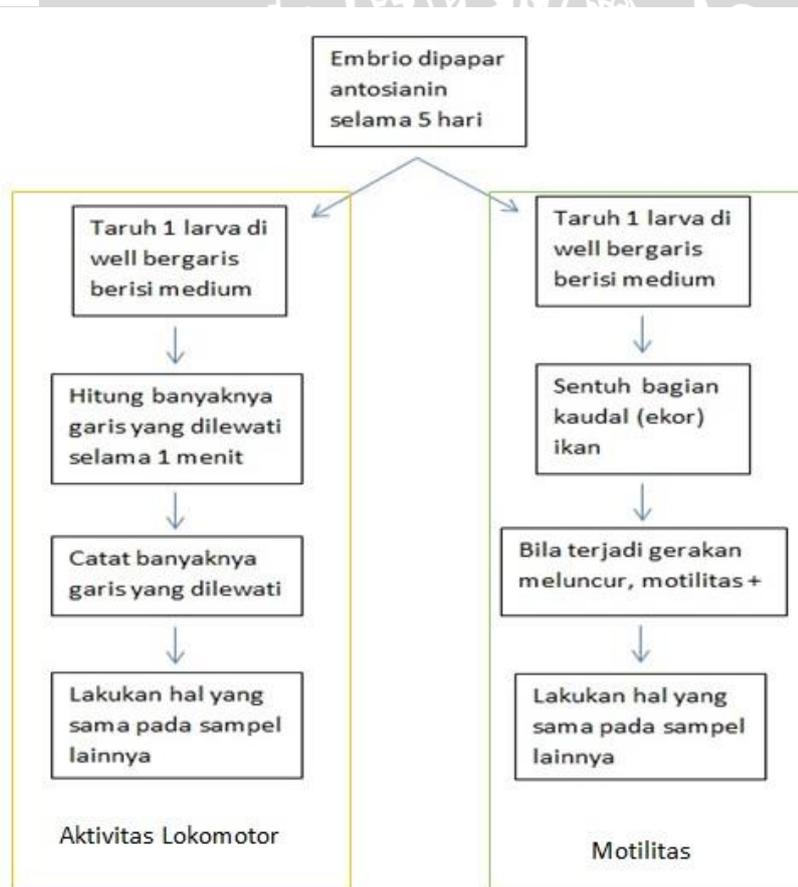
4.6.3 Kultur Embrio

Medium embrio dibuat dari bahan CaCl_2 0,04 % sebanyak 0,04 gram, NaCl 1% sebanyak 1 gram, MgSO_4 1,63% sebanyak 1,63 gram, dan KCl 0,03% sebanyak 0,03 gram yang dilarutkan dalam 100 mL DW. Selanjutnya medium embrio dibagi menjadi 10 untuk pengenceran dan diletakkan dalam cawan petri (Kishida *et. al.*, 1999).

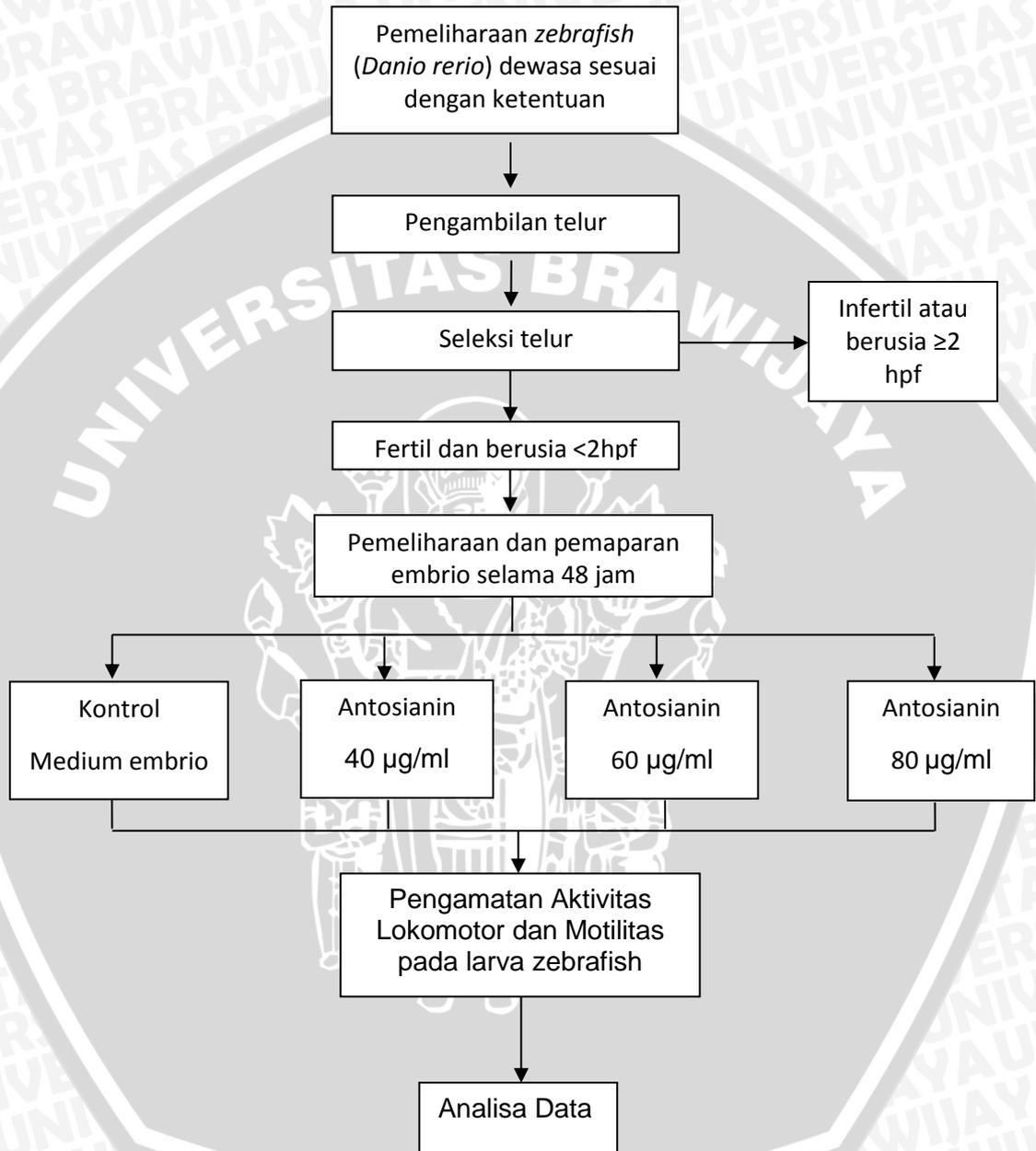
Telur yang telah dibersihkan diletakkan dalam cawan petri, lalu diamati secara langsung untuk menentukan apakah telur tersebut terfertilisasi atau tidak. Telur yang terfertilisasi pada bagian dalam cangkang terdapat bulatan yang berwarna lebih keruh dari tepinya. Pengamatan dilakukan tidak lebih dari 2 jam. Antosianin dilarutkan dalam aquades kemudian didilusi dalam medium embrio sampai mencapai konsentrasi 0,2 mM; 0,3 mM; dan 0,4 mM. Embrio diletakkan pada piring kultur 4 well (30 embrio/8 mL medium embrio beserta paparan antosianin dalam setiap well), dan diinkubasi pada suhu $28 \pm 0,5$ °C. Embrio medium diganti satu kali setiap hari sesuai paparan yang diberikan dan dirawat sampai usia 72 jam setelah fertilisasi (Kishida *et. al.*, 1999).

4.7 Prosedur penelitian

1. Setelah 5 hari diberi paparan antosianin, kemudian memasukkan zebrafish kedalam 12 well masing-masing well berisi 30 telur embrio yang kemudian menjadi 30 larva.
2. Kemudian memberi well garis dan mengamati banyaknya garis yang dilalui zebrafish dalam 1 menit lalu dibandingkan antara kontrol dan kelompok perlakuan apakah ada perbedaan pada aktivitas lokomotor.
3. Lalu mengamati motilitas dengan cara menyentuh bagian caudal (ekor) zebrafish yang telah diberi paparan antosianin untuk mengetahui perbedaan respon dibanding dengan zebrafish yang tidak dipapar.



4.7.1 Alur Penelitian



4.8 Pengolahan Data

Data jumlah sel apoptotik dikumpulkan dan diolah dengan menggunakan software SPSS for Windows 17.0 dan dinyatakan dalam rerata \pm simpangan baku ($mean \pm SD$). Data variabel bebas bertipe ordinal dan variabel terikat bertipe rasio kemudian dilakukan uji beda aktivitas lokomotor dan motilitas. Dilakukan uji normalitas data dengan *Kolmogorov Smirnov Test* dan uji homogenitas data dengan *Levene Test*. Kemudian jika data terdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji parametrik *One Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan *post hoc test* menggunakan uji Tukey dengan batas signifikansi $p < 0,05$ dan interval kepercayaan pada tingkat 95%. Bila data tidak terdistribusi normal atau tidak homogen, dilakukan uji nonparametrik *Kruskall Wallis*.

