

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

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan yaitu konsentrasi paparan genistein.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang diamati adalah ekspresi *Bcl-2*.

4.3.3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah suhu inkubator, suhu akuarium, pencahayaan, paparan waktu genistein.

4.4 Lokasi dan Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Faal, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Januari – Agustus 2015.

4.5 Bahan dan Alat Penelitian

4.5.1 Bahan

1. Zebrafish dewasa (*Danio rerio*), didapatkan dari toko hewan lokal.
2. Medium embrio yang terdiri dari 0,004 % CaCl_2 , 0,163% MgSO_4 , 0,1 % NaCl dan 0,003 % KCl dalam aqua destilata.
3. Genistein (Sigma-Aldrich G6649-5MG) dilarutkan dalam *dimethyl sulfoxide* (DMSO).
4. Tetramin Mini Flakes.
5. Kit PCR *i-Green*TM OneStep qRT-PCR Kit (LR).
6. Isolasi RNA & PCR dengan menggunakan primer C Gamma Scientific IDT dengan susunan :

Forward : 5' – TTG TGG AGA AAT ACC TCA AGC AT – 3'

Reverse : 5' – GAG TCT CTC TGC TGA CCG TAC AT – 3'

4.5.2 Alat

1. Tangki akuarium dengan kapasitas 60 L.
2. Piring kultur 6 sumur.
3. Cawan petri.
4. Mikropipet.
5. *Blue tip* dan *yellow tip*.
6. Pipet plastik.

7. Keranjang berjala.
8. Kertas asturo berwarna hitam.
9. Gelas ukur 10 mL.
10. Gelas ukur 100 mL.
11. Gelas beker 500 mL.
12. Falcon 50 mL.
13. Inkubator.
14. Mesin PCR (*Lightcycler 1.5*).

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Pemeliharaan Ikan

Pemeliharaan zebrafish dewasa dilakukan dalam tangki berisi 60L air. Suhu air dijaga pada suhu 28°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 Pembuatan Medium Embrio

Medium embrio dibuat dari bahan CaCl_2 sebanyak 0,04 gram, NaCl sebanyak 1 gram, MgSO_4 sebanyak 1,63 gram, dan KCl sebanyak 0,03 gram yang dilarutkan dalam 100 mL DW. Selanjutnya medium embrio dibagi menjadi 10 dan diletakkan dalam cawan petri (Aurora, 2012).

4.6.3 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).

4.6.4 Kultur Embrio

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

4.6.5 Pemaparan Genistein

Pemaparan dilakukan 2 jam setelah fertilisasi. Genistein dilarutkan dalam *dimethyl sulfoxide* (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).

4.6.6 Pemeriksaan Ekspresi *Bcl-2*

Pemeriksaan ekspresi *Bcl-2* dilakukan dengan metode *Real-time PCR* menggunakan 20 ekor embrio zebrafish tiap sumur setelah 72 jam.

4.6.7 Isolasi RNA

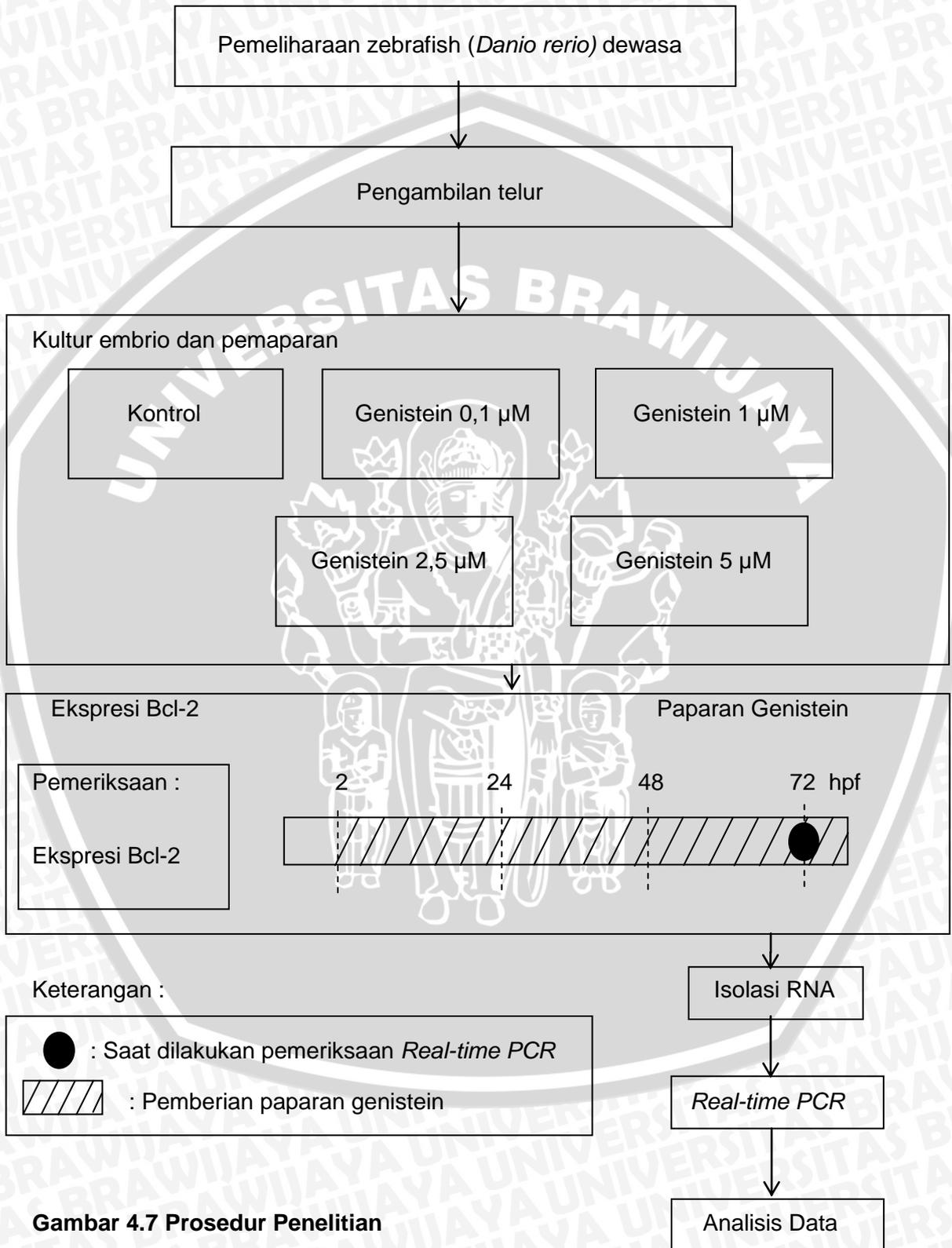
Isolasi RNA dilakukan pada setiap kelompok dengan 20 embrio menggunakan sarung tangan. Medium yang digunakan untuk isolasi harus mengandung detergen kuat untuk segera mendenaturasi RNase yang ada. Sampel yang disimpan dalam freezer dicairkan terlebih dahulu lalu dikeringkan dari sisa air dalam Eppendorf. Masing-masing sampel dihancurkan dengan penumbuk (*glider*). Homogenisasi dilakukan dengan menggunakan reagen TRIZOL. Volume sampel yang ditambahkan tidak boleh melebihi 10% dari volume reagen TRIZOL. Inkubasi sampel pada suhu ruang selama 5 menit untuk memisahkan kompleks protein. Sentrifugasi diperlukan untuk membuang debris sel pada sampel. Pada fase separasi, chloroform ditambahkan sebanyak 0,2 mL per 1 mL TRIZOL dan sentrifugasi tidak lebih dari 12000 rpm. Penambahan alkohol isopropil untuk presipitasi RNA dari fase cairan. Supernatan harus dipisahkan dari sampel agar hanya tersisa pellet setelah ditambahkan etanol 75%. Setiap pencampuran sampel dengan reagen harus divortex agar benar-benar tercampur (Chomczynski & Mackey, 1995). Setelah proses isolasi selesai, sampel dipindah ke eppendorf baru dan segera disimpan pada suhu -80°C .

4.6.8 *Real-Time PCR*

Real-Time PCR (*qPCR*) dilakukan sesuai protokol *i-Green*TM OneStep qRT-PCR Kit (LR). Reagen dicampurkan terlebih dahulu dengan formula 10 μL

master mix, 0,4 μL enzim mix, primer forward sebanyak 6 μM yang diencerkan menjadi 1 μL dan primer reverse 6 μM yang diencerkan menjadi 1 μL . Template mRNA yang digunakan sebanyak 1 μL dan ditambahkan *RNase free water* sebanyak 6,6 μL . Total reagen yang dicampurkan sebanyak 20 μL . Profil termal untuk real-time PCR adalah sintesis cDNA dengan suhu 42°C satu kali siklus selama 15 menit, aktivasi enzim dengan suhu 95°C satu kali siklus selama 10 menit, denaturasi dengan suhu 95°C selama 15 detik dan *annealing*/ekstensi dengan suhu 50°C selama 60 detik. Semuanya diulang sampai 35 siklus. *Melting curve* dibutuhkan untuk mengetahui titik T_m (50°C) dari amplicon yg terbentuk. β -*actin* digunakan untuk menormalkan hasil dengan menghilangkan variasi kuantitas dan kualitas dalam mRNA dan cDNA, masing-masing tingkat mRNA dinyatakan sebagai rasio mRNA β -*actin*. Ekspresi mRNA relatif untuk setiap gen dihitung sebagai perubahan kali lipatnya yang dibandingkan dengan kelompok kontrol (*i-GreenTM OneStep Protocol*).

4.7 Prosedur Penelitian



Gambar 4.7 Prosedur Penelitian



4.8 Analisis Data

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

