

## 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

##### 4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah embrio zebrafish dari zebrafish dewasa yang diperoleh dari toko hewan lokal dan dipelihara di dalam akuarium.

##### 4.2.1 Sampel Penelitian

Berdasarkan penelitian terdahulu yang pernah dilakukan oleh Tomar Sard Abdelkader mengenai "*Exposure Time to Caffeine Affects Heartbeat and Cell Damage-Related Gene Expression of Zebrafish Danio rerio Embryos at Early Developmental Stages*", maka digunakan 30 embrio dalam setiap sumur peneluran dengan tiga kali pengulangan (Abdelkader *et al.*, 2012). Dari setiap sumur, sampel yang diamati sebanyak 20 embrio karena sudah representatif setelah dilakukan penelitian pendahulua.

##### 4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*.

#### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Faal Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas

Brawijaya Malang, dan Laboratorium Genetika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang pada bulan November 2014 sampai dengan bulan Agustus 2015.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah waktu dimulainya paparan genistein terhadap embrio zebrafish sejak berusia 2 *hpf* sampai menjadi larva pada 72 *hpf*.

##### 4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah ekspresi gen *Bcl-2* pada larva zebrafish (72 *hpf*).

##### 4.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah temperatur akuarium, temperatur dalam inkubator, konsentrasi genistein dan pencahayaan.

#### 4.5 Alat dan Bahan

##### 4.5.1 Alat

- Tangki akuarium dengan kapasitas 60 L
- Cawan petri
- Piring kultur 6 sumur
- Micropipet
- *Blue tip, yellow tip, dan white tip*
- Pipet plastik
- Keranjang berjala

- Kertas asturo berwarna hitam
- Gelas ukur 100 mL
- Gelas ukur 10 mL
- Gelas beker 500 mL
- Tabung 1,5 mL
- Tabung falcon
- Sarung tangan bersih
- *Laminar air flow*
- Pembakar bunsen
- *Glider*
- Vortex
- Sentrifugator
- Spektrofotometri
- Mesin *Real-Time PCR*
- Inkubator

#### 4.5.2 Bahan

- Zebrafish dewasa, *Danio rerio*, didapatkan dari toko hewan lokal yang disertifikasi LIPI
- Medium embrio yang terdiri dari 0,004 gram  $\text{CaCl}_2$ , 0,163 gram  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 gram  $\text{NaCl}$  dan 0,003 gram  $\text{KCl}$  dalam aqua destilata
- Genistein (Sigma-aldrich G6649-5MG) dilarutkan dalam dimethyl sulfoxide (DMSO)
- *Tetramin Mini Granules*
- Aqua destilata

- Bahan untuk isolasi RNA yang terdiri dari *TRI reagent*, chloroform, isopropanolol, dan etanol 75 %
- Bahan untuk prosedur *Real-Time PCR* yang terdiri dari template RNA, aqua destilata, *enzyme mix*, *master mix*, primer *Bcl-2 forward*, primer *Bcl-2 reverse*, primer  $\beta$ -actin forward, dan primer  $\beta$ -actin reverse

#### 4.6 Definisi Operasional

##### 4.6.1 Tahap Perkembangan Awal

Tahap perkembangan awal Zebrafish dimulai sejak telur mengalami fertilisasi dan berkembang menjadi embrio pada 0 *hpf* dan berlangsung sampai proses embriogenesis selesai pada 48-72 *hpf* dan mengalami penetasan menjadi larva zebrafish (Kimmel *et al.*, 1995). Waktu pada tahap perkembangan zebrafish diekspresikan dalam *hour post-fertilization (hpf)*.

##### 4.6.2 Pemeliharaan Ikan

Pemeliharaan Zebrafish dewasa dilakukan dalam akuarium berisi 60 L air. Suhu air dijaga pada suhu  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ . Pengaturan cahaya dengan periode terang selama 14 jam dimulai dari pukul 08.00 pagi dan 10 jam periode gelap. Pemberian makanan dengan *Tetramin Mini Granules* (TetraJapan Inc.) dua kali dalam sehari (Kishida *et al.*, 1999).

##### 4.6.3 Pengambilan Telur

Pengambilan telur dilakukan dengan meletakkan keranjang berjala pada tank 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.

#### 4.6.4 Preparasi Genistein Murni

Genistein dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 20 mM kemudian didilusi dalam medium embrio sampai mencapai konsentrasi 5  $\mu$ M. Pada kelompok kontrol, medium embrio mengandung 0,25 % DMSO yang merupakan pelarut genistein dengan konsentrasi terbesar (Aurora, 2012).

#### 4.6.5 Pembuatan Medium Embrio

Medium embrio dibuat dari bahan  $\text{CaCl}_2$  0,04 gram, NaCl 1 gram,  $\text{MgSO}_4$  1,63 gram, dan KCL 0,03 gram yang di larutkan dalam 100 mL aqua destilata. Selanjutnya medium embrio di bagi menjadi 10 dan diletakkan dalam cawan petri.

#### 4.6.6 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 (Pramulawati, 2013). Pengamatan dilakukan tidak lebih dari 2 jam. Embrio diletakkan pada piring kultur 6 sumur (30 embrio/8 mL embrio medium dalam setiap sumur), dan diinkubasi pada suhu optimal untuk perkembangan embrio  $28 \pm 0,5$  °C (Kimmel et.al, 1995; Pype et.al, 2015). Embrio medium diganti satu kali setiap hari sesuai paparan yang diberikan dan dirawat sampai usia 72 jam setelah fertilisasi (Kishida et. al., 1999).

#### 4.6.7 Pemaparan Genistein

Pemaparan genistein dilakukan 2 jam, 24 jam, dan 48 jam setelah fertilisasi. Pada perlakuan dengan genistein, genistein dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 20 mM kemudian didilusi dalam medium embrio sampai mencapai konsentrasi 5  $\mu$ M, sedangkan pada kelompok kontrol embrio medium mengandung 0,025% DMSO yang merupakan pelarut genistein dengan konsentrasi terbesar. Medium pada seluruh kelompok diganti setiap 24 jam untuk mencegah adanya kontaminasi dari produk kotoran. Konsentrasi 5  $\mu$ M dipilih sebagai pertimbangan dengan pemaparan yang lebih tinggi terdapat mortalitas yang tinggi pada embrio zebrafish (Aurora, 2012). Pemaparan genistein dilakukan dengan cara dilusi karena perkembangan mulut selesai, sehingga zebrafish tidak dapat makan sampai dengan usia 7 hari setelah fertilisasi (Capiotti *et al.*, 2011). Digunakan konsentrasi 5  $\mu$ M karena pada penelitian terdahulu terbukti menimbulkan defek morfologis dan peningkatan mortalitas pada embrio zebrafish (Bertaningrum, 2012).

#### 4.6.8 Perbedaan Waktu Paparan

Waktu paparan genistein dibedakan sesuai kelompok perlakuan masing-masing. Pada kelompok 2 hpf dilakukan pemaparan genistein pada medium sejak embrio berusia 2 hpf hingga 72 hpf, pada kelompok 24 hpf dilakukann pemaparan genistein sejak 24 hpf hingga 72 hpf, pada kelompok 48 hpf dilakukan pemaparan genistein sejak 48 hpf hingga 72 hpf. Pemilihan perbedaan waktu paparan genistein pada embrio zebrafish disesuaikan dengan tahap perkembangan embryo zebrafish.

#### 4.6.9 Isolasi RNA

Prosedur isolasi RNA dilakukan pada 72 jam setelah fertilisasi untuk mengekstraksi RNA dari sampel embrio zebrafish dan dilakukan dengan

menggunakan metode *TRI reagent* dan metode *easy-spin<sup>TM</sup> RNA extraction kit* sesuai protocol dari pabrik pembuat. Proses isolasi RNA dilakukan dalam *laminar air flow* untuk mencegah kontaminasi.

#### 4.6.10 Penghitungan Kadar Total RNA

Penghitungan kadar total RNA dilakukan menggunakan alat NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 Spectrophotometer dengan melihat absorbansi molekul pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Rasio dari absorbansi di 260 / 280 nm ini juga dapat digunakan untuk melihat kemurnian dari RNA.

#### 4.6.11 Pemeriksaan Ekspresi *Bcl-2*

Pemeriksaan ekspresi *Bcl-2* dilakukan pada 72 jam setelah fertilisasi dengan metode *Real-Time PCR* menggunakan 20 ekor embrio dalam setiap sumur. Hasil pemeriksaan ekspresi gen tampak sebagai *Curve Point*, selanjutnya dilakukan penghitungan menggunakan rumus Livak (Gambar 4.1) untuk memperoleh hasil yang kuantitatif.

$$\text{Ekspresi gen} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

#### Gambar 4.1 Rumus pemeriksaan ekspresi gen dengan metode Livak

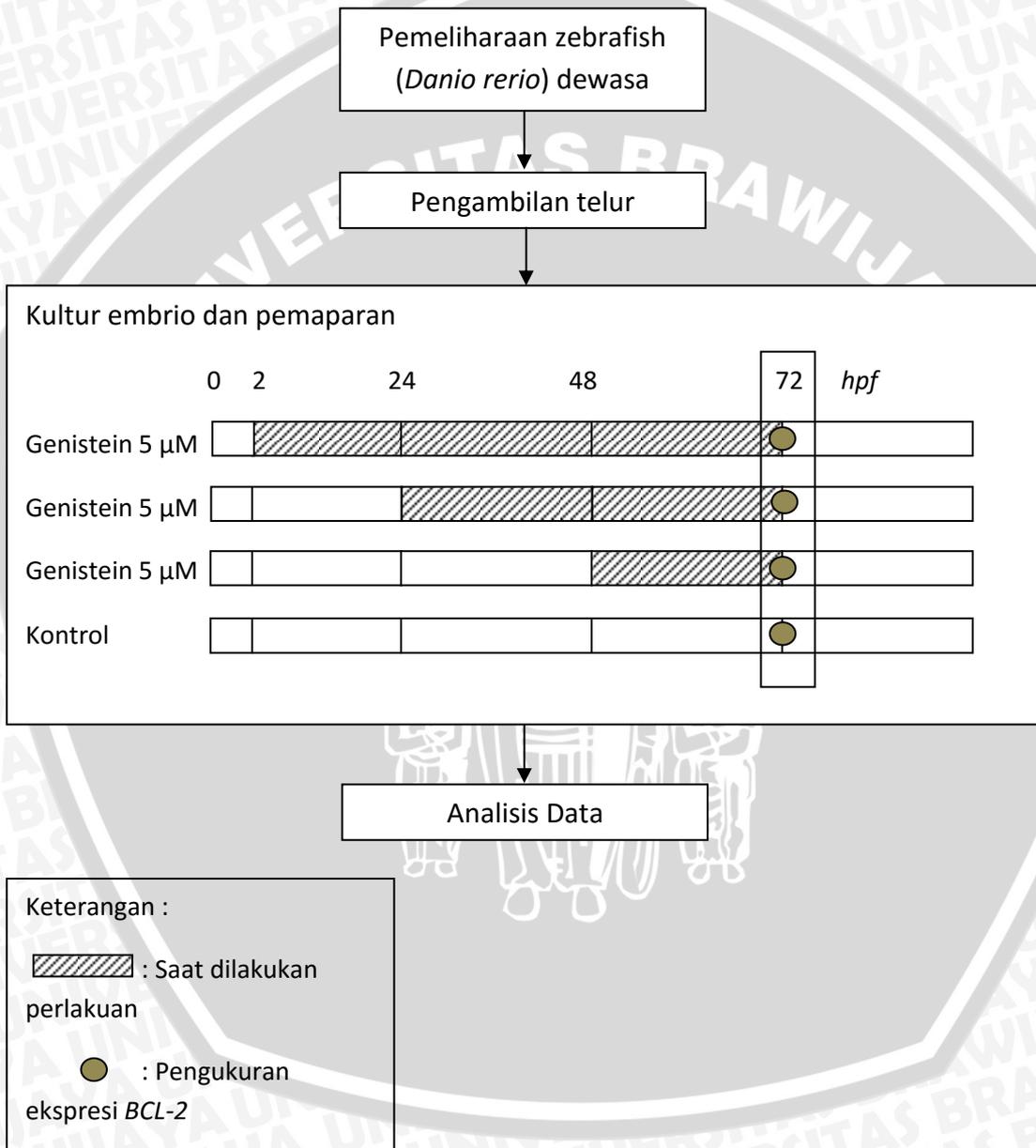
Keterangan : menggunakan normalisasi dari gen referensi,  $\Delta\Delta C_T = (C_{T,\text{Target}} - C_{T,\text{Actin}})_{\text{Time } x} - (C_{T,\text{Target}} - C_{T,\text{Actin}})_{\text{Time}}$

#### 4.6.12 *Real-Time PCR*

Pemeriksaan ekspresi gen dilakukan menggunakan metode *One-Step quantitative Real-Time PCR* dan hasil yang terbaca dinormalisasi dengan gen referensi  $\beta$ -aktin. *Real-Time PCR* merupakan proses amplifikasi DNA secara eksponensial melalui rangkaian siklus thermal. *Real-Time PCR* dipilih dibandingkan *PCR* karena memiliki keuntungan yaitu dapat memonitor kemajuan selama proses *PCR*, memiliki akurasi yang tinggi untuk mengukur jumlah DNA

yang diampifikasi, dan juga lebih sedikit terdapat kontaminasi dari tahap analisis *post-PCR* karena proses amplifikasi dan deteksi dilakukan dalam satu wadah yang sama.

#### 4.7 Prosedur Penelitian



#### 4.8 Analisis Data

Analisis statistik dalam penelitian ini menggunakan uji One-Way ANOVA dengan software SPSS 17 dengan syarat data terdistribusi normal dan sampel homogen. Nilai perbedaan dianggap bermakna jika  $p < 0,05$ . Setelah dilakukan uji *One-Way ANOVA*, analisis data dilanjutkan dengan uji *post-hoc* untuk melihat perbedaan antar kelompok. Data yang diamati merupakan data yang diambil dari tiga kali pengulangan (Aurora, 2012). Jika data tidak memenuhi syarat normalitas dan homogenitas, analisis statistik dilakukan dengan uji alternatif Kruskal-Wallis. Nilai perbedaan yang dianggap bermakna pada uji Kruskal-Wallis jika  $p < 0,05$ .

#### 4.9 Persetujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

