

## 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.

**4.2.2 Sampel Penelitian**

Berdasarkan penelitian terdahulu yang pernah dilakukan oleh Tomar Sard Abdelkader mengenai "Teratogenicity and Brain Aromatase-Induction of Monosodium Glutamate in Estrogen-Responsive Mosaic Transgenic Zebrafish *Danio rerio*", maka jumlah sampel yang digunakan adalah 30 embrio dalam setiap sumur peneluran dengan tiga kali pengulangan (Abdelkader, 2012).

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan, yang terdiri dari:

- a) Kelompok kontrol yang diberi 0,05% DMSO yang merupakan pelarut genistein dengan konsentrasi terbesar
- b) Kelompok embrio zebrafish berumur 2 hpf yang diberi 5 µg/ml genistein 2 dalam DMSO
- c) Kelompok embrio zebrafish berumur 24 hpf yang diberi 5 µg/ml genistein dalam DMSO
- d) Kelompok embrio zebrafish berumur 48 hpf yang diberi 5 µg/ml genistein dalam DMSO

**4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

- Perbedaan waktu paparan genistein

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

- Motorik zebrafish

#### 4.3.3 Variabel Terkendali

- Umur zebrafish
- Temperatur akuarium

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Faal Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Mei sampai juli 2015.

### 4.5 Alat dan Bahan

#### 4.5.1 Bahan

- Zebrafish dewasa, *Danio rerio*, didapatkan dari toko hewan lokal yang disertifikasi LIPI
- Medium embrio yang terdiri dari 0,004% CaCl<sub>2</sub>, 0,163% MgSO<sub>4</sub>, 0,1% NaCl dan 0,003% KCl dalam aqua destilata
- Genistein (Sigma-aldrich G6649-5MG) dilarutkan dalam *dimethyl sulfoxide* (DMSO)
- *Tetramin Mini Granules*

#### 4.5.2 Alat

- Tangki akuarium dengan kapasitas 60 L
- Cawan petri

- Piring kultur 6 sumur
- Micropipet
- Blue tip dan yellow tip
- Pipet plastik
- Keranjang berjala
- Gelas ukur
- Kertas asturo berwarna hitam
- Falcon
- Inkubator
- Eppendorf
- Piring kultur 12 sumur
- Video recorder

#### **4.6 Definisi Operasional**

##### **4.6.1 Pemeliharaan Ikan**

Pemeliharaan Zebrafish dewasa dilakukan dalam akuarium 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 pagi dan 10 jam periode gelap. Pemberian makanan dengan Tetramin (TetraJapan Inc.) dua kali dalam sehari (Kishida, 1999).

##### **4.6.2 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.

##### **4.6.3 Pembuatan Medium Embrio**

Medium embrio dibuat dari bahan  $\text{CaCl}_2$  0,04 % sebanyak 0,04 gram,  $\text{NaCl}$  1% sebanyak 1 gram,  $\text{MgSO}_4$  1,63% sebanyak 1,63 gram, dan  $\text{KCl}$  0,03% sebanyak 0,03 gram yang di larutkan dalam 100 mL distilled water (DW). Selanjutnya medium embrio di bagi menjadi 10 dan diletakkan dalam cawan petri.

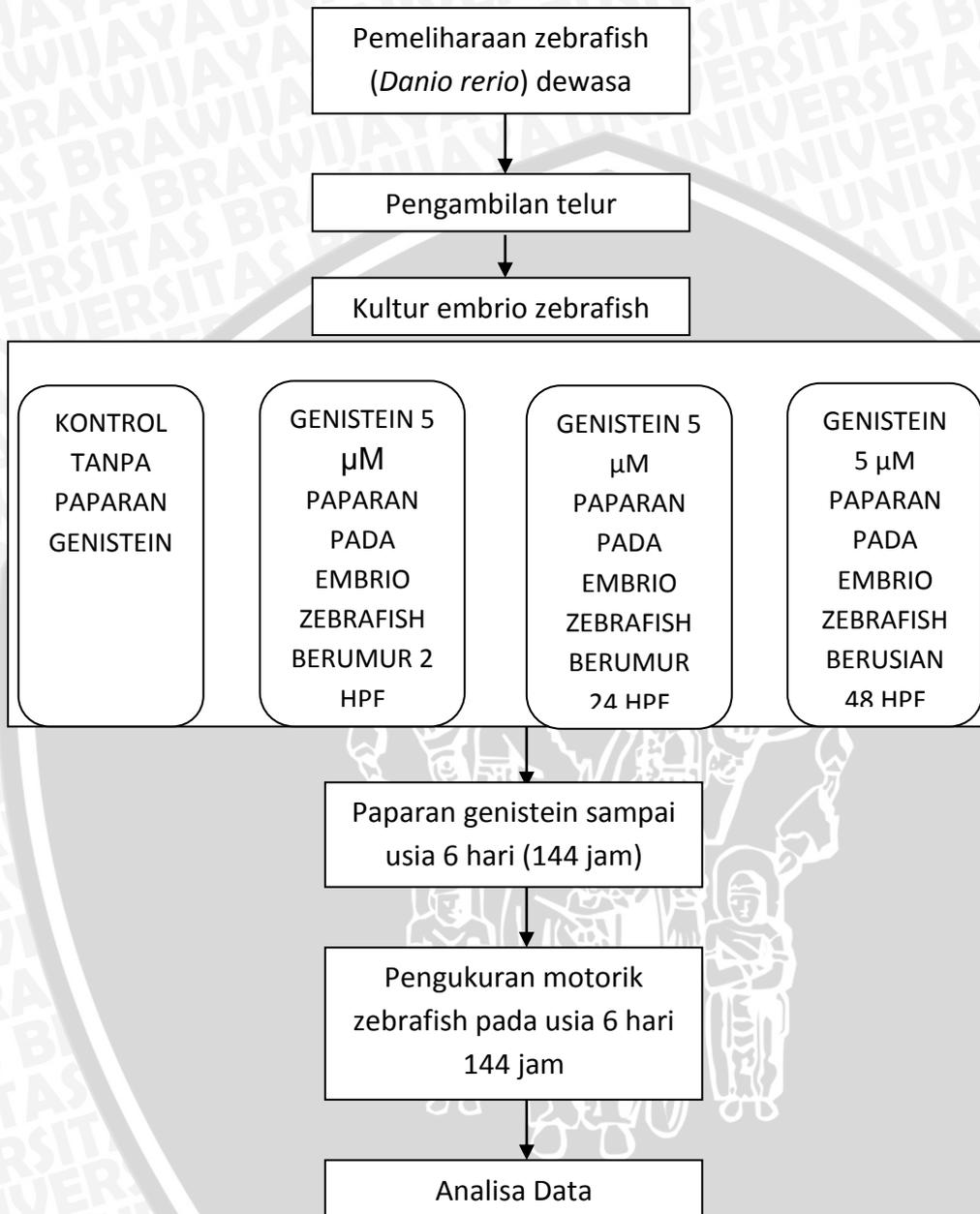
#### 4.6.4 Kultur Embrio

Telur yang telah dibersihkan diletakkan dalam cawan petri, lalu diamati dibawah mikroskop 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/8 mL embrio/sumur), dan diinkubasi pada suhu  $28 \pm 0,5$  °C. Embrio medium diganti satu kali setiap hari sesuai paparan yang diberikan (Kishida *et. al.*, 1999).

#### 4.6.5 Pengukuran motorik

Cara mengukur dengan menggunakan 24 larva zebrafish dari setiap kelompok perlakuan terdapat 4 kelompok, yaitu larva zebrafish berusia 2jam (2 hpf), 24jam (24 hpf), 48 jam (48 hpf), dan kontrol tanpa paparan genistein. Setelah 6 hari pemberian paparan genistein, kemudian zebrafish dimasukkan kedalam piring kultur 12 sumur yang telah diberi garis sehingga terbagi 4. Kemudian direkam larva zebrafish dalam satu menit per menit lalu dibandingkan jumlah garis yang terpotong antar kontrol dan kelompok perlakuan.

#### 4.7 Prosedur Penelitian



#### 4.8 Analisis Data

Data jumlah sampel 2 hpf, 24 hpf, 48 hpf, dan kontrol dikumpulkan dan dihitung dengan menggunakan software SPSS for Windows 17.0 dan dinyatakan dalam rerata  $\pm$  simpangan baku ( $mean \pm SD$ ). Data variable bebas bertipe ordinal dan variable terikat bertiperasio kemudian dilakukan uji beda aktivitas motorik. Dilakukan uji normalitas data dengan *Kolmogorov Smirnov Test* dan uji homogenitas data dengan *Levene Test*. Kemudian jika data terdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji parametric *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 non parametrik *Kruskall Wallis*.

