

BAB IV

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

4.2.3 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

- Waktu pemaparan genistein

4.3.2 Variabel Tergantung

- Kadar HSP-70

4.3.3 Variabel Terkendali

- Umur *zebrafish*
- Temperatur akuarium
- Dosis genistein

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan November 2014 sampai dengan September 2015.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *zebrafish* (*Danio rerio*) dewasa, 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*) yang dilarutkan dalam dimethyl sulfoxide (DMSO) dan *tetramin mini granules* yang digunakan sebagai pakan ikan.

4.5.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tangki akuarium dengan kapasitas 60 L, cawan petri, piring kultur 6 sumur, *micropipette*, *blue tip* dan *yellow tip*, pipet plastic, keranjang berjala, gelas ukur, kertas asturo berwarna hitam, gelas ukur 100 mL, gelas ukur 10 mL, gelas beker 5000 mL, falcon, mesin PCR serta inkubator

4.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dari penelitian ini adalah:

- Perbedaan waktu paparan merupakan perbedaan waktu yang digunakan dalam pemaparan genistein. Pemaparan waktu dilakukan pada 2 jam, 24 jam dan 48 jam setelah fertilisasi.
- Genistein merupakan senyawa mirip estrogen yang terdapat pada tumbuhan. Pada penelitian ini genistein yang digunakan merupakan

genistein sintetis yang didapat dari CV.Gamma Scientific Biolab dengan merk zigma.

- *Zebrafish* dewasa merupakan binatang coba yang diperoleh dari toko hewan lokal dan dipelihara di dalam akuarium dengan pemeliharaan sesuai dengan cara kerja 4.7.1.
- HSP-70 merupakan variabel yang diukur dalam penelitian ini. HSP-70 diukur dengan menggunakan metode livak untuk mendapatkan kadar HSP-70.

4.7 Cara Kerja Penelitian

4.7.1 Pemeliharaan Ikan

Pemeliharaan *zebrafish* dewasa dilakukan dalam akuarium berisi 60 L air. Dalam satu akuarium terdapat 30 ekor ikan *zebrafish*. 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 pellet ikan bermerk tetramin (TetraJapan Inc.) dua kali dalam sehari (Kishida *et al.*, 1999).

4.7.2 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* (Aurora, 2012).

4.7.3 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. Telur diletakkan pada piring kultur 6 sumur (30 embrio/8 mL embrio/sumur) dan diinkubasi pada suhu $28 \pm 0,5$ °C. Medium embrio diganti satu kali setiap hari sesuai paparaan yang diberikan dan dirawat sampai usia 72 jam setelah fertilisasi (Kishida *et al.*, 1999). Telur *zebrafish* yang fertil (mengandung embrio) diberi paparan dan dirawat sampai usia 72 jam karena embriogenesis zebrafish berlangsung selama 72 jam, setelah itu embrio akan menetas (Aurora, 2012).

4.7.4 Pemaparan Genistein

Genistein yang digunakan dalam pemaparan ini merupakan genistein sintetis. Pemaparan dilakukan 2 jam, 24 jam, dan 48 jam setelah fertilisasi. Pada perlakuan dengan genistein, genistein didilusi dalam medium embrio sampai mencapai konsentrasi 10 μ M, sedangkan pada kelompok kontrol medium embrio mengandung 0,05% DMSO (*Dimethyl Sufoxide*) yang merupakan pelarut genistein dengan konsentrasi terbesar. Digunakan konsentrasi 10 μ M karena pada penelitian terdahulu terbukti menimbulkan efek toksik pada embrio *zebrafish* (Aurora, 2012).

4.7.5 Ekstraksi RNA

Langkah pertama yang dilakukan sebelum *Real-time PCR* adalah ekstraksi RNA. Prosedur ini bertujuan untuk mendapatkan RNA dari sampel yang telah dibuat untuk diaplikasikan pada *Real-time PCR*.

Ekstraksi RNA dilakukan dengan cara sebagai berikut (Chomczynski dan Sacchi, 2006) :

- Disiapkan alat dan bahan, antara lain *micropipet*, *yellowtip*, sampel di *eppendorf*, *tissue* dan *bluetip*.
- Dibuang cairan sampel yang berlebihan.
- Ditambahkan reagen OA 500 μ l.
- Ditambahkan *chloroform* 50 μ l.
- Dihomogenkan dengan vortex.
- Dilakukan sentrifugasi 12000 rpm selama 15 menit.
- Dipisahkan supernatan (fase cairan) ke dalam *eppendorf* baru yang sudah diberi label.
- Ditambahkan isopropanolol 25 μ l ke dalam supernatan.
- Dihomogenkan cairan dalam *eppendorf* baru dengan vortex.
- Dilakukan sentrifugasi 12000 rpm selama 8 menit.
- Diperiksa *pellet* yang terbentuk.
- Dibuang fase cairan ke *tissue* sehingga tersisa *pellet* di *eppendorf*.
- Ditambahkan etanol 75% sebanyak 500 μ l dengan mikropipet dan *bluetip*.
- Dilakukan sentrifugasi 8850 rpm selama 8 menit.
- Dibuang fase cairan di *tissue* hingga tersisa *pellet* saja.
- Diberi label pada *eppendorf* baru (yang kecil).

- Ditambahkan *water* DNase dan RNase sebanyak 50 µl dalam *eppendorf* besar menggunakan *yellow tip*.
- Dihomogenkan cairan dengan Vortex.
- Dimasukkan 3 µl campuran *eppendorf* besar yang sudah ditambahkan cairan DNase tadi ke *eppendorf* kecil yang telah diberi label.
- Disiapkan *eppendorf* kecil yang baru lagi dan memberi label.
- Dipindahkan supernatan ke dalam *eppendorf* kecil yang baru.
- Disimpan *eppendorf* pada suhu -80°C.

4.7.6 Nanodrop

Nanodrop adalah prosedur yang dilakukan untuk mengukur konsentrasi RNA. Dengan melakukan Nanodrop kita dapat mengetahui berapa banyak kadar RNA pada sampel (Erika *et al.*, 2007).

Nanodrop dilakukan dengan cara sebagai berikut :

- Disiapkan alat Spectrophotometer Nanodrop 1000.
- Digunakan aquadest steril untuk inialisasi alat.
- Digunakan aquadest steril untuk melakukan *blank measurement*.
- Diukur tiap sampel dan bersihkan pedestal dengan *tissue* setiap akan ganti sampel.
- Dibersihkan pedestal dengan *tissue*.
- Dicetak hasil pembacaan.

4.7.7 Optimasi

Optimasi dilakukan untuk menentukan suhu yang paling optimal saat dilakukan *Real-time PCR* (Elena, 2006). Primer yang digunakan dalam optimasi dan saat dilakukan *Real-time PCR* didapatkan dari CV. Gamma Scientific Biolab dengan merk IDT.

Optimasi dilakukan dengan cara sebagai berikut :

- Diencerkan primer ke dalam *ependorf* dengan 0,6 µl primer *forward* HSP-70 dengan 9,4 µl TE *buffer*.
- Diencerkan primer ke dalam *ependorf* dengan 0,6 µl primer *reverse* HSP-70 dengan 9,4 µl TE *buffer*.
- Disiapkan *ependorf*, sampel, primer *forward* HSP-70, primer *reverse* HSP-70, dan *dionite*. Primer yang disiapkan adalah primer yang sudah diencerkan sebelumnya.
- Dicampurkan PCR *mastermix* (10 µl), primer *forward* HSP-70 (1 µl), primer *reverse* HSP-70 (1 µl), *dionite* (6 µl), dan sampel (2 µl) ke dalam *ependorf*.
- Dimasukkan *ependorf* ke dalam alat PCR.

4.7.8 Pengamatan Ekspresi HSP-70 dengan *Real-time PCR*

Pengamatan ekspresi HSP-70 dilakukan dengan *metode Real-time PCR* menggunakan sampel yang sudah diekstraksi RNA (Erika *et al.*, 2007).

Real-time PCR dilakukan dengan cara sebagai berikut :

- Disiapkan primer *forward* HSP-70 (5'- CAT CGA CGC CAA CGG G -3'), primer *reverse* HSP-70 (5'- CCA GGG AGT TTT TAG CAG AAA TCT T -3'), *master mix*, *enzyme mix*, TE *buffer*, air steril, kapiler, dan sampel.
- Diencerkan primer ke dalam *ependorf* dengan 0,6 µl primer *forward* HSP-70 dengan 9,4 µl TE *buffer*.
- Diencerkan primer ke dalam *ependorf* dengan 0,6 µl primer *reverse* HSP-70 dengan 9,4 µl TE *buffer*.
- Disusun kapiler sebanyak sampel yang akan digunakan.

- Dicampurkan primer *forward* HSP-70 (0,5 μ l), primer *reverse* HSP-70 (0,5 μ l), *master mix* (5 μ l), *enzyme mix* (0,2 μ l), air steril (sesuai tabel kerja), dan sampel (sesuai tabel kerja) ke dalam kapiler yang telah disusun.
- Ditutup kapiler.
- Dilakukan *spin down*.
- Dimasukkan kapiler ke dalam alat *LightCycler 1.5* untuk melihat ekspresi HSP-70.

4.7.9 Metode Livak

Metode livak merupakan metode kuantitatif yang digunakan untuk menentukan berapa kali lipat nilai suatu ekspresi gen pada kelompok yang diuji jika dibandingkan dengan kontrolnya yang menggunakan *housekeeping gene* sehingga metode livak ini dapat menggambarkan perbedaan antar kelompok secara deskriptif (Livak dan Schmittgen, 2001).

Pada penelitian ini perhitungan ekspresi HSP-70 dengan menggunakan metode livak dapat terlihat pada tabel 4.1. Hasil yang didapatkan berupa rasio ekspresi relative terhadap β -actin (*housekeeping gene*).

Tabel 4.1 Metode Livak

ΔCt	$Ct \text{ target} - Ct \text{ reference}$
$\Delta\Delta Ct$	$\Delta Ct \text{ reference} - \Delta Ct \text{ target}$
Rasio Ekspresi Relatif	$2^{-\Delta\Delta Ct}$

(Livak dan Schmittgen, 2001)

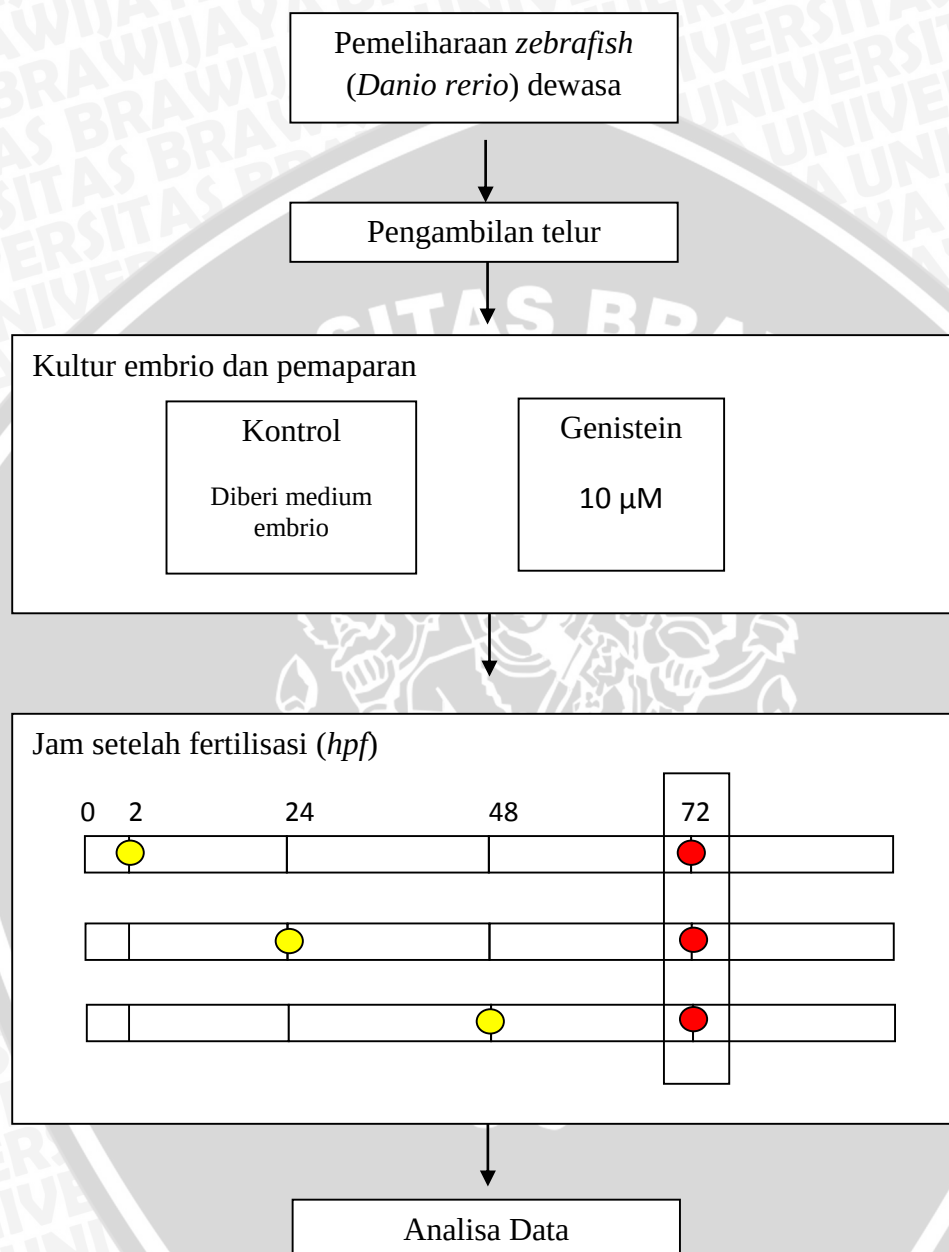
Keterangan:

ΔCt = Selisih gen HSP-70 dengan gen β -actin pada tiap sampelnya.

$\Delta\Delta Ct$ = Selisih gen β -actin dengan gen HSP-70 pada masing-masing pengulangan.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ = Rasio ekspresi relatif

4.8 Prosedur Penelitian



Keterangan :

- : Saat dilakukan perlakuan
- : Penghitungan kadar HSP-70

4.9 Metode Analisis Data

Setelah mendapatkan data, data dianalisis secara statistik menggunakan uji analisis ANOVA, untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara ketiga kelompok perlakuan. Sebelum dilakukan uji analisis ANOVA, terlebih dahulu dilakukan uji asumsi data yaitu normalitas distribusi data dan homogenitas ragam data. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan, dilanjutkan dengan menggunakan uji *Post-hoc test* untuk mengetahui pada kelompok mana letak perbedaan tersebut berada.

Apabila pada uji asumsi data tidak normal ataupun homogen, dilakukan transformasi kemudian dilakukan uji analisis ANOVA kembali. Apabila setelah transformasi data tetap tidak normal dan homogen, dilakukan uji Kruskal Wallis. Derajat kemaknaan yang digunakan adalah $\alpha = 0,05$.

