

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dikerjakan adalah penelitian eksperimental laboratorium, dengan hewan coba zebrafish berusia 8 *mpf* yang dibagi menjadi 5 kelompok.

### 4.2 Populasi dan Sampel

#### 4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah Zebrafish (*Danio rerio*) dewasa berusia 8 *mpf* (Hasamura *et al.*, 2012) yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah disertifikasi oleh Laboratorium Perikanan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang dan dipelihara dalam akuarium Laboratorium Fisiologi FKUB.

#### 4.2.2 Sampel Penelitian

Total sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor ikan berusia 8 *mpf* yang kemudian dibagi menjadi 5 kelompok, masing – masing kelompok perlakuan yang terdiri dari 5 ekor ikan dipelihara di dalam 3.4 L akuarium. Kelima kelompok tersebut terdiri dari kelompok DIO, Non DIO, DIO+ 80 ppm/mL/ekor ekstrak antosianin; 120ppm/mL/ekor ekstrak antosianin; dan 160ppm/mL/ekor ekstrak antosianin.

Kriteria Inklusi :

- Gerakan ikan yang lincah
- Berenang berkelompok dalam kawanan
- Tidak ditemukan adanya kelainan



Kriteria eksklusi :

- Adanya deformitas anatomis dan fisiologis
- Perilaku yang tidak sama dengan kawanannya
- Tidak mampu berenang

#### **4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Reproduksi Fakultas Ilmu Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya pada bulan Febuari 2015 – Maret 2016.

#### **4.4 Variabel Penelitian**

##### **4.4.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas yang dipergunakan adalah dosis pemaparan antosianin.

##### **4.4.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat yang diamati adalah kadar kolestrol total pada lemak viseral *zebrafish*.

##### **4.4.3 Variabel Kontrol**

Variabel kontrol dalam penelitian ini yaitu suhu akuarium, pencahayaan, volume air, makanan, dan waktu pemaparan antosianin.

## 4.5 Definisi Operasional

### 1. Zebrafish

Zebrafish yang digunakan didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang, yaitu ikan zebrafish strain wildtype dewasa usia 8 mpf, yang telah disertifikasi oleh Laboratorium Perikanan Fakultas Perikanan Brawijaya Malang.

### 2. Ekstrak Antosianin

Antosianin yang digunakan diperoleh dari ubi jalar ungu di lereng Gunung Kawi yang diekstraksi menggunakan teknik maserasi etanol 96% di Laboratorium Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknik Bandung oleh Dr. Ciptati MS, MSc. (Sujadmoko, 2013). Dengan dosis yang diberikan pada kelompok DIO A sebesar 80 ppm/ml/ekor, kelompok DIO B sebesar 120 ppm/ml/ekor dan pada kelompok DIO C 160 ppm/ml/ekor.

### 3. Diet-Induced Obesity (DIO)

*Artemia nauplii* (zooplankton) merupakan makanan normal dari zebrafish, umunya yang dikonsumsi sebesar 5mg/hari/ekor (Hasumura *et al.*, 2012). *Artemia* lebih disukai karena umunya lebih bergizi seimbang, menarik baik secara visual maupun kimiawi, serta mudah di cerna (Lawrance C, 2007). Beberapa keuntungan model DIO-zebrafish adalah respon yang sangat baik dari zebrafish terhadap *artemia*, hampir semua zebrafish yang diberimakan *artemia* berlebihan menjadi obesitas, membutuhkan 2 minggu untuk terjadi obesitas (Tainaka *et al.*, 2011). Dibandingkan dengan makanan serpihan,

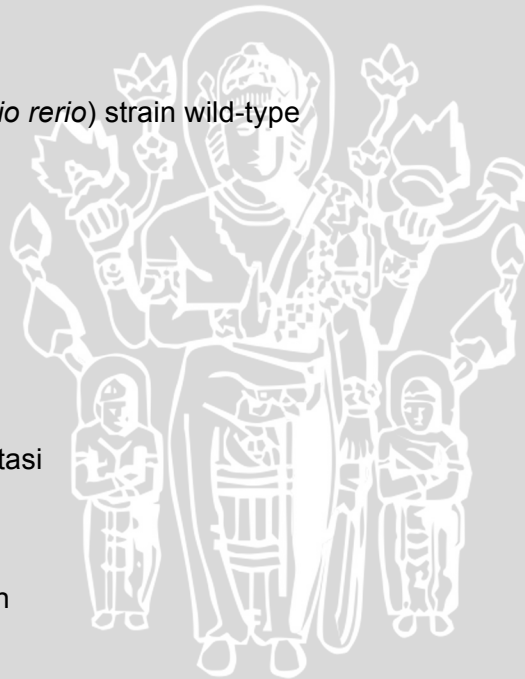


artemia memiliki kadar lemak yang tinggi dan memiliki efek rendah untuk mengenyangkan sehingga lebih memungkinkan untuk mencetuskan obesitas (Oka *et al.*, 2010). DIO diterapkan dengan pemberian makan kepada zebrafish menggunakan artemia nauplii sebanyak 60mg/hari/ekor. Setiap hari, zebrafish diberi makan sebanyak 3 kali, sehingga total pemberian artemia setiap ekornya masing – masing 20mg/ekor (Hasumura, 2012).

#### 4.6 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.6.1 Bahan

- Zebrafish (*Danio rerio*) strain wild-type
- Artemia
- Antosianin
- Tetramin
- Akuades
- Larutan presipitasi
- Assay buffer
- Working reagen



##### 4.6.2 Alat

- Tangki akuarium dengan kapasitas 60L
- Tangki akuarium dengan kapasitas 6.4L
- Heater
- Termometer
- Filter akuarium

- Aerator
- Plankton net 120  $\mu\text{m}$
- Skalpel
- Kit ( *EnzymChrom™ AF HDL and LDL/VLDL Assay Kit (E2HL-100)*)
- Alat centrifuges
- Mikropipet
- Vortex
- Tabung
- Label tabung
- Well reaksi
- Inkubator

#### **4.7 Metode Pengumpulan Data**

##### **4.7.1. Prosedur Aklimatisasi Ikan**

1. Mempersiapkan akuarium ikan berisi air dengan pH netral, kemudian pada akuarium dilakukan pemasangan heater, aerator, filter, serta termometer.
2. Memasukan ikan baru kedalam akuarium
3. Menutup setiap sisi akuarium dengan kain berwarna gelap
4. Memberi Tetramin sebagai makanan ikan sebanyak dua kali sehari pada pukul 08.00 dan 15.00
5. Proses aklimatisasi ini berlangsung selama 1 minggu

#### 4.7.2 Prosedur Perlakuan

1. Memisahkan zebrafish 8 *mpf* masing – masing lima ekor ke dalam 5 akuarium berbeda berkapasitas 3.4 L sesuai dengan kelompok perlakuan :

- Kontrol negatif/non DIO
- Kontrol positif/DIO
- DIO A (Artemia 60 mg/ekor/hari) + 80 *ppm* ekstrak antosianin
- DIO B (Artemia 60 mg/ekor/hari) + 120 *ppm* ekstrak antosianin
- DIO C (Artemia 60 mg/ekor/hari) + 160 *ppm* ekstrak antosianin

2. Memberi artemia nauplii, ekstrak antosianin, dan menguras akuarium sebanyak tiga kali sehari dengan jadwal sebagai berikut:

**Gambar 4.1 Jadwal pemberian artemia nauplii, ekstrak antosianin, dan menguras akuarium**

Waktu	Memberi Artemia nauplii	Memberi ekstrak antosianin (pada DIO A, B, dan C)	Menguras akuarium
I	07.00	05.15	07.00
II	10.30	10.15	12.00
III	14.00	15.15	17.00

#### 4.7.3 Prosedur Pengambilan Sampel

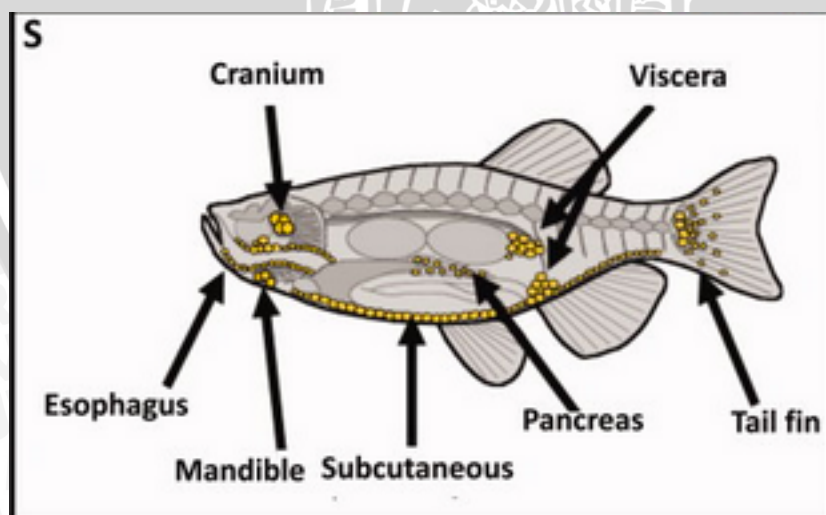
Setelah 40 hari perlakuan (hari ke 41), pengambilan sampel untuk pengukuran total kolesterol dilakukan dengan diseksi lemak viseral zebrafish. Sebelum dilakukan diseksi lemak viseral, zebrafish dianestesi terlebih dahulu dengan tricaine dosis 0.168 mg/ml (Zodrow dan Tanguay, 2003), kemudian dilakukan pemotongan ekor untuk mengambil sampel darah yang digunakan untuk sampel anggota penelitian lain dalam kelompok. Setelah itu dilakukan



diseksi abdomen ikan (Pedroso *et al.*, 2012) dan pengambilan organ – organ yang digunakan sebagai sampel kelompok penelitian, termasuk pengambilan lemak visceral. Kemudian lemak tersebut di proses dengan prosedur yang mengacu pada manual kit ( *EnzymChrom™ AF HDL and LDL/VLDL Assay Kit (E2HL-100)*), My biosource., USA.

Mengacu pada manual kit kit *EnzymChrom™ AF HDL and LDL/VLDL Assay Kit (E2HL-100)* untuk prosedur *colormetric*, sejumlah 96 *well plate* dilakukan prosedur pada masing – masing well reaksi, dicampurkan 55 µl Assay Buffer dengan 1 µl *enzyme mix* dan 1 µl *dye reagent*. Tambahkan 50 µl dari Working Reagent tersebut kedalam setiap well standart dan sample kemudian campurkan hingga merata. Setelah itu, lakukan inkubasi pada suhu ruangan selama 30 menit. Kemudian baca nilai *optical density* pada 570nm. Perhitungan total kolesterol dihitung berdasarkan rumus berikut,

$$[\text{Total}] = \frac{\text{OD}_{\text{TOTAL}} - \text{OD}_{\text{BLANK}}}{\text{OD}_{\text{STANDARD}} - \text{OD}_{\text{BLANK}}} \times 300 \text{ (mg/dL)}$$



Gambar 4.1. Distribusi lemak pada zebrafish (*Danio rerio*) (Imrie & Sadler, 2010)

#### 4.8 Pengolahan Data

Seluruh data hasil pengukuran dan pengamatan dikumpulkan yang selanjutnya akan dilakukan analisis menggunakan statistik parametrik. Data hasil penelitian akan ditampilkan dalam bentuk  $\text{mean} \pm \text{SD}$ . Keseluruhan data kemudian dianalisis dengan menggunakan *One – Way Anova*.

#### 4.9 Jadwal Kegiatan

Perlakuan selama 40 hari : 11 Februari 2016 – 21 Maret 2016

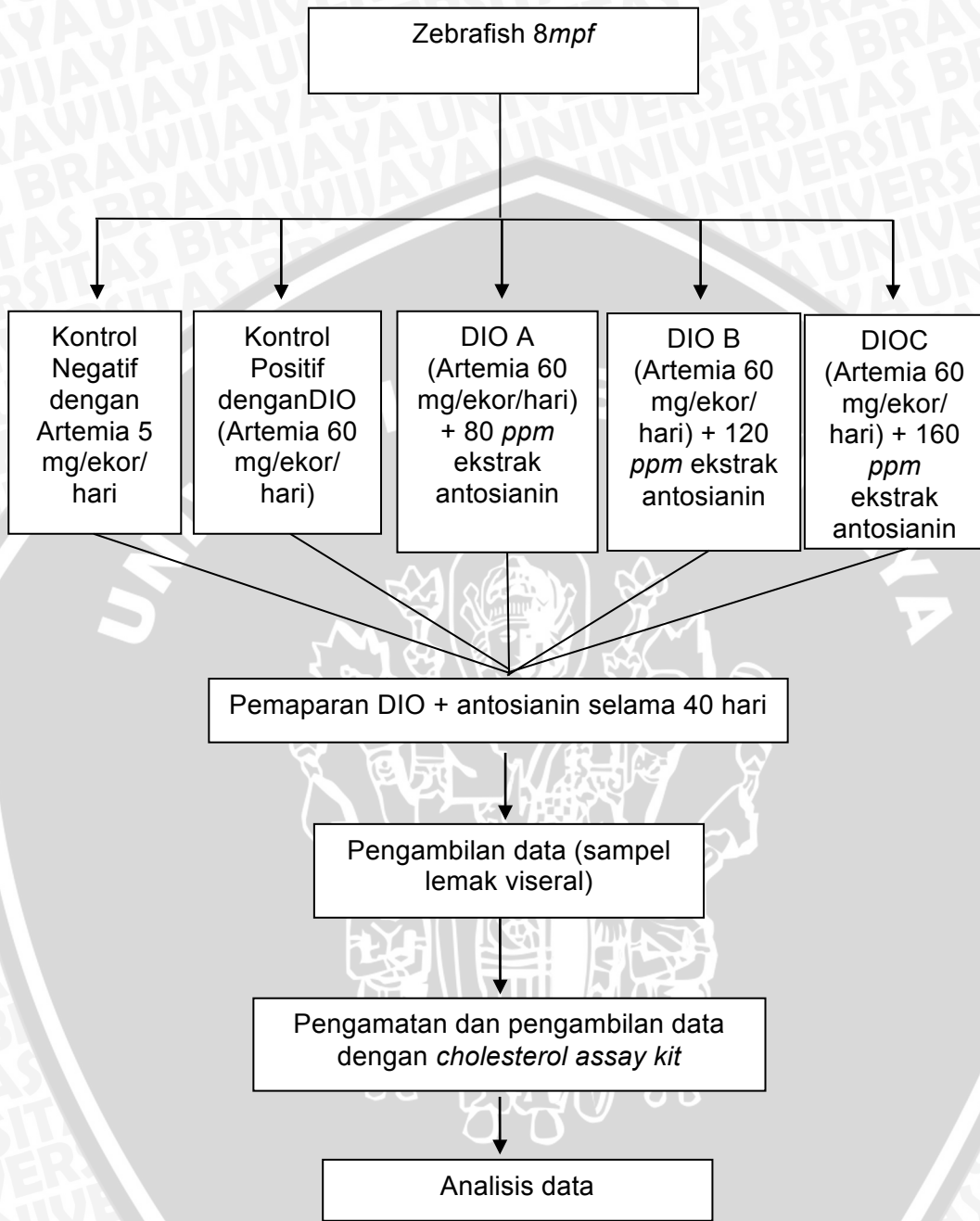
Pengambilan sampel lemak viseral : 23 Maret 2016

Pengukuran kadar total kolesterol : 23 Maret 2016





4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Bagan Skematik Alur Penelitian

