

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah eksperimental laboratorium, dimana digunakan kelompok kontrol dan perlakuan. Pada penelitian ini, zebrafish berusia 8 *mpf* (*months post-fertilization*) atau 8 bulan setelah fertilisasi dibagi menjadi lima kelompok. Masing-masing kelompok berisi lima ekor zebrafish dalam 3,4 Liter air, sehingga dalam penelitian ini diperlukan zebrafish sebanyak 25 ekor.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah zebrafish dewasa yang berusia 8 bulan atau 8 *mpf* (*month post-fertilization*) (Hasumura dkk., 2012) yang diperoleh dari laboratorium Farmakologi FKUB Malang dan dipelihara dalam akuarium laboratorium Fisiologi FKUB yang telah disertifikasi oleh Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini berjumlah 25 ekor zebrafish yang berusia 8 *mpf* yang terdiri dari lima kelompok, dan tiap kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor ikan zebrafish dalam 3,4 L akuarium. Lima kelompok tersebut terdiri kelompok DIO, Non DIO, DIO + 80 *ppm* antosianin; 120 *ppm* antosianin; dan 160 *ppm* antosianin (Lee dkk., 2014).

Kriteria inklusi:

- Ikan yang lincah bergerak
- Selalu berenang beriringan dalam kawanannya
- Tidak cacat

Kriteria eksklusi:

- Tidak mampu berenang
- Selalu berenang di dasar akuarium

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Reproduksi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya pada bulan Februari 2016 - Maret 2016.

4.4 Variabel Penelitian**4.4.1 Variabel Bebas**

Dosis paparan antosianin

4.4.2 Variabel Terikat

- *Intake* pakan zebrafish
- BMI zebrafish

4.4.3 Variabel Kontrol

- Umur zebrafish
- Temperatur air akuarium
- Pencahayaan
- Volume air
- Makanan
- Waktu pemaparan antosianin

4.5 Definisi Operasional

1. Zebrafish

Zebrafish yang digunakan adalah zebrafish *wildtype* dewasa berusia 8 *mpf* (Hasumura dkk., 2012) yang diperoleh dari laboratorium Farmakologi FKUB Malang yang telah disertifikasi oleh Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

2. Antosianin

Antosianin yang digunakan berasal dari ubi jalar ungu di lereng Gunung Kawi yang diekstraksi dengan teknik maserasi dengan 0,01% HCl pada etanol selama 14 jam yang dilakukang di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Institut Teknologi Bandung (ITB) (Sujadmoko, 2013).

3. *Diet-Induced Obesity* (DIO)

Diet-Induced Obesity (DIO) adalah diet tinggi lemak dan tinggi protein yang diberikan pada zebrafish agar dapat menjadi obesitas. DIO yang diberikan adalah artemia *nauplii* sebanyak 60 mg/hari/ekor selama tiga kali sehari dalam waktu 40 hari (Hasumura, 2012). Diet ini mengandung 22% lemak, 16%

karbohidrat, dan 44% protein dengan perhitungan 1 mg artemia mengandung 5 kalori, dengan estimasi bahwa seekor zebrafish mendapat 20 kalori dari 5 mg artemia pada 80% artemia yang dikonsumsi, dan 150 kalori dari 60 mg artemia pada 50% artemia yang dikonsumsi (Oka dkk., 2010).

4. *Artemia nauplii*

Artemia nauplii adalah larva tahap awal artemia yang baru menetas dari kista artemia setelah dikulturkan pada air asin selama 24-36 jam. Artemia adalah organisme sejenis *crustacean* yang merupakan makanan ikan dan udang-udangan (Dumitrascu, 2011).

5. *Intake Pakan*

Banyaknya *intake* pakan zebrafish dihitung dengan cara tidak langsung melalui sisa pakan yang tersisa. Sisa pakan zebrafish didapatkan dengan menghitung artemia yang tidak dimakan oleh zebrafish dengan cara menyaring artemia yang tersisa pada akuarium selama 120 menit melalui orang yang sama sebanyak tiga kali (Hasumura dkk., 2012; Meguro dkk., 2015) pada hari ke-39. *Intake* pakan zebrafish merupakan selisih dari banyak pakan awal yang diberikan dan sisa pakan zebrafish.

6. *Body Mass Index (BMI)*

Body Mass Index meliputi ukuran berat badan (g) dibagi dengan kuadrat panjang badan (cm²). Menurut penelitian Zang dkk (2013), pada zebrafish normal didapatkan BMI 0,033±0,0004 g/cm² (jantan) dan 0,053±0,0031 g/cm² (betina).

Panjang badan zebrafish yang diukur meliputi kaput hingga kauda zebrafish (Okadkk., 2010).

$$\text{BMI} = \frac{\text{Berat Badan (g)}}{\text{Panjang Badan}^2 (\text{cm}^2)}$$

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan

- Zebrafish (*Danio rerio*) strain *wild-type* berusia 8 mpf
- Artemia kaleng
- Antosianin ubi ungu
- Tetramin flakes (Tetra Japan Inc.)
- Saline
- Tricaine

4.6.2 Alat

- Akuarium dengan kapasitas 60 L
- Akuarium dengan kapasitas 6,4 L
- Aerator
- Filter set
- Timer
- Lampu ikan
- Termometer
- Kertas label
- Jala ikan
- Alat tulis
- Timbangan analitik
- Cawan petri
- Jangka sorong
- *Plankton net* 120 μm
- Gelas arloji
- Sendok plastik

4.7 Metode Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Aklimatisasi Zebrafish

Prosedur aklimatisasi Zebrafish menurut Reed dan Jennings (2011):

1. Menyiapkan akuarium berkapasitas 60 L berisi air dengan pH netral, memasang heater, aerator, filter, dan termometer di dalam akuarium
2. Memindahkan ikan yang baru sampai ke dalam akuarium
3. Menutup seluruh sisi akuarium dengan kain gelap
4. Memberi makan ikan dengan Tetramin dua kali sehari, yaitu pada jam 08.00 dan 15.00
5. Pada hari ke-31, memisahkan zebrafish ke dalam 5 akuarium yang berkapasitas 6,4 L berisi 3,4 L air, lalu melakukan aklimatisasi Zebrafish akuarium berkapasitas 6,4 L selama satu minggu

4.7.2 Prosedur Perlakuan

Berikut prosedur perlakuan menurut Hasumura *et al.* (2012) :

1. Memisahkan zebrafish berusia 8 *mpf* ke dalam lima akuarium yang berbeda dengan kapasitas lima ekor/ 3,4 L sesuai dengan kelompok perlakuan:
 - Kontrol negatif/non DIO
 - Kontrol positif/DIO
 - DIO A (Artemia 60 mg/ekor/hari) + 80 *ppm* antosianin
 - DIO B (Artemia 60 mg/ekor/hari) + 120 *ppm* antosianin
 - DIO C (Artemia 60 mg/ekor/hari) + 160 *ppm* antosianin
2. Memberi makan, antosianin, dan menguras akuarium tiga kali sehari selama 40 hari dengan jadwal sebagai berikut:

Tabel 4.1 Jadwal Pemberian *Artemia nauplii*, Ekstrak Antosianin, dan Pengurasan Akuarium

Waktu	Memberi <i>Artemia nauplii</i>	Memberi antosianin (pada DIO A, B, dan C)	Menguras akuarium
I	05.00	05.15	07.00
II	10.00	10.15	12.00
III	15.00	15.15	17.00

4.7.2 Prosedur Pengukuran *Intake Pakan*

Pengukuran *intake* pakan atau *feeding volume assay* dilakukan pada hari ke-39 dengan menghitung sebanyak tiga kali pada jam 07.00, 12.00 dan 17.00 dengan orang yang sama (Hasumura dkk., 2012; Meguro dkk., 2015). Prosedur pengukuran *feeding volume assay*:

1. Memberikan *Artemia* segar sebanyak 5 mg kista/ekor/hari pada zebrafish yang ditempatkan dalam akuarium 3,4 L (Diet non DIO) dan 60 mg kista/ekor/hari pada zebrafish dalam akuarium 3,4 L (Diet DIO)
2. Memberikan antosianin 15 menit setelah pemberian makan pada kelompok DIO + Antosianin dalam tiga dosis dosis terbagi yakni 80 ppm, 120 ppm, dan 160 ppm.
3. Mempersiapkan akuarium baru berisi air yang sudah di-*setting* suhu dan pencahayaannya untuk memindahkan zebrafish pada 105 menit kemudian setelah pemberian antosianin
4. Kemudian, zebrafish dipindahkan menggunakan jaring ikan dengan berhati-hati menuju akuarium baru yang telah dipersiapkan
5. Akuarium yang berisi air sebelumnya didiamkan hingga air tampak tenang dan terlihat feses ikan mengendap di dasar akuarium (Ostrander, 2000)

6. Menyipon feses yang mengendap dengan menggunakan pipet dengan perlahan lalu meletakkannya pada wadah terpisah (Ostrander, 2000)
7. Menyaring sisa pakan yang ada pada akuarium menggunakan *plankton net* yang berukuran 120 μm sebanyak tiga kali
8. Mengambil sisa pakan yang ada pada *plankton net* menggunakan spatula besi dan meletakkannya pada gelas arloji yang sudah ditimbang berat masing-masingnya
9. Menimbang sisa pakan dengan menggunakan timbangan analitik
10. Mengurangi berat total gelas arloji berisi sisa pakan dengan berat gelas arloji saja, maka didapatkan berat bersih sisa pakan zebrafish
11. Mengurangi berat pakan awal dengan sisa pakan, maka didapatkan jumlah *intake* pakan zebrafish.

4.7.3 Prosedur Pengukuran BMI (*Body Mass Index*)

Pengukuran BMI dilakukan setiap minggu, yakni pada hari ke-0, 14, 20, 27, 34 dan 40 pada zebrafish jantan dan betina dengan membandingkan pada kelompok kontrol DIO, kontrol Non DIO dan DIO + Antosianin dalam tiga dosis dosis (Hasumura dkk., 2012). Prosedur pengukuran BMI:

1. Menyiapkan jangka sorong, timbangan analitik, kertas tisu, sendok plastik dan cawan petri
2. Menyiapkan larutan anestesi pada cawan petri, yaitu dengan menggunakan tricaine 0,168 mg/ml (Westerfield, 2007)
3. Meletakkan gelas arloji kosong pada timbangan analitik dan menyetting jarum timbangan analitik ke angka 0

4. Menangkap salah satu ikan menggunakan jala ikan pada salah satu akuarium
5. Memasukkan ikan ke dalam cawan petri berisikan larutan anestesi
6. Mengeluarkan ikan dari cawan petri menggunakan sendok plastik saat ikan tidak lagi berespon pada stimulus eksternal (Matthews dan Varga, 2012) ke kertas tisu yang telah disediakan
7. Mengukur ikan dengan jangka sorong dari ujung kepala hingga ujung ekor
8. Mencatat hasil pengukuran panjang ikan dalam cm
9. Memindahkan ikan dari kertas tisu ke gelas arloji pada timbangan analitik
10. Mencatat hasil penimbangan ikan dalam gram
11. Mengulanginya pada setiap ikan pada seluruh kelompok

4.8 Pengolahan Data

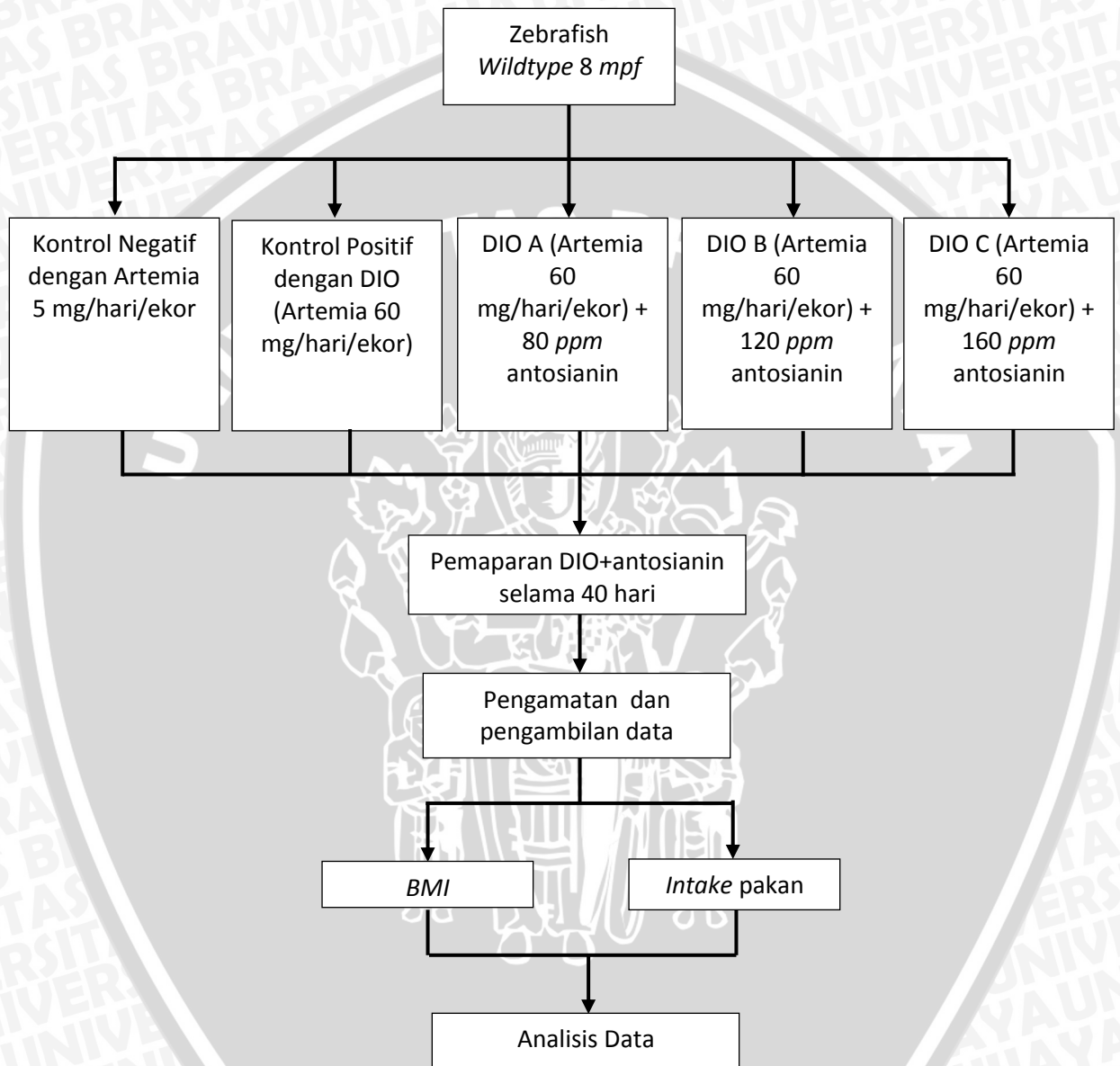
Semua data hasil pengamatan dan pengukuran dikumpulkan maka akan dilakukan analisis dengan menggunakan statistik parametrik. Data hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk $\text{mean} \pm \text{SD}$. Semua data dianalisis dengan menggunakan *One – Way Anova*.

4.9 Jadwal Kegiatan

Perlakuan selama 40 hari	: 11 Febuari 2016 – 21 Maret 2016
Pengukuran BMI hari ke-0	: 10 Februari 2016
Pengukuran BMI hari ke-14	: 24 Februari 2016
Pengukuran BMI hari ke-20	: 01 Maret 2016
Pengukuran BMI hari ke-27	: 08 Maret 2016
Pengukuran BMI hari ke-34	: 15 Maret 2016
Pengukuran BMI hari ke-40	: 21 Maret 2016
Pengukuran Feeding Volume Assay	: 20 Maret 2016



4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

