

BAB 4

METODE PENELITIAN

Strategi pertama dalam eksplorasi penelitian adalah membuat model *stunting* larva *zebrafish* (*Danio rerio*), melalui pemberian paparan Rotenon. Kriteria utama dikatakan *stunting* yaitu, terjadi pemendekan panjang badan <-2 standar deviasi pada usia 2 tahun (de Onis & Blossner, 2003). Kriteria tambahan lainnya adalah tidak ada kelainan kongenital saat lahir (Fagge, 1871; Syed, 2015; Picasso, 2016), analogi usia larva *zebrafish* 0 hpf, 6 dan 9 dpf setara dengan bayi baru lahir, usia anak 2 dan 8 tahun (Sorribes, 2013). Strategi kedua pada penelitian ini adalah melakukan pemberian paparan rotenon bersamaan dengan pegangan, sebagai proteksi bagi larva *zebrafish* yang mengalami *stunting* akibat induksi rotenon, melalui ekspresi *Insulin Growth Factor-1* (IGF-1) dan *Insulin Reseptor Substrat* (IRS).

4.1. Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara *true eksperimental laboratorik*, dengan desain penelitian *randomize posttest only control group design* dengan random alokasi, dimana penentuan sampel ke masing-masing kelompok dilakukan secara acak (rancangan acak lengkap).

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi Penelitian ini adalah embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) usia 0-2 hpf, yang diperoleh dari hasil fertilisasi induk jantan dan betina *zebrafish*, jenis *wild type* dengan strip horizontal warna biru tua kehitaman dan dasar warna perak, yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) Malang, yang telah teruji dan tersertifikasi di Laboratorium Hidrologi Fakultas Perikanan (Khotimah *et al.*, 2015d).

4.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) pada usia 0-9 day post fertilization (dpf), dengan sampel setiap perlakuan adalah 4 embrio/ well dengan mempertimbangkan survival rate setiap well, maka jumlah embrio ditambah menjadi 20 setiap well (duplo) x 5 kelompok = 100 embrio. Keseluruhan kelompok dilakukan triplicate (ulangan 3 kali) (Lucitt *et al.*, 2008) sehingga jumlah keseluruhan embrio yang diperlukan adalah 300 embrio. Kelima kelompok tersebut adalah :

1. Kontrol negatif (KN) adalah sampel yang tidak diberikan paparan rotenon dan konsentrasi pegagan
2. Kontrol Positif rotenone (KP) adalah sampel yang hanya diberikan paparan rotenon
3. Perlakuan rotenon + pegagan 1 (RP1.25) adalah sampel yang diberikan paparan rotenon dan konsentrasi pegagan 1,25 µg/ml
4. Perlakuan rotenon + pegagan 2 (RP2.5) adalah sampel yang diberikan paparan rotenon dan konsentrasi pegagan 2,5 µg/ml
5. Perlakuan rotenon + pegagan 3 (RP5) adalah sampel yang diberikan paparan rotenon dan konsentrasi pegagan 5 µg/ml

4.3. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat Penelitian :

1. Pemeliharaan *zebrafish*, ekstraksi pegagan, pembuatan embrionik medium dan larutan rotenon, di Laboratorium farmakologi fakultas kedokteran universitas brawijaya Malang
2. Pemeriksaan ekspresi *Insulin Growth Factor-1* (IGF-1) dan *Insulin reseptor substrat* (IRS), di Laboratorium farmakologi dan Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

Waktu Penelitian : Pada bulan Februari – Juli 2017

4.4. Variabel Penelitian

1. **Variabel bebas** : Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*)
2. **Variabel Tergantung** : Panjang Badan (SL), Rasio panjang kepala, Ekspresi IGF 1 dan IRS pada larva *zebrafish*
3. **Variabel Kendali** : Konsentrasi Rotenon, Medium Embrionik (E3), Suhu Inkubator $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, Kebersihan Plate/well dan incubator, pakan larva (Tetramint), *Methylen blue* dan air filtrasi.

4.5. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria Inklusi

Keseluruhan embrio yang berwarna transparan, berusia 0-2 hpf, tidak berwarna putih dan tidak didapati serabut putih atau jamur ketika dilihat dibawah mikroskop optilab stereo.

2. Kriteria Eksklusi

Embrio *zebrafish* yang berwarna putih, kosong (terbuahi), tidak bulat, lengket dengan telur lainnya, terdapat serabut jamur dan hatching atau menetas sebelum 3 dpf, serta embrio yang mati atau cacat sebelum penelitian selesai dilaksanakan.

4.6. Definisi Operasional

Definisi operasional penelitian adalah sebagai berikut :

1. Kriteria *Stunting*

Ditentukan berdasarkan standar baku WHO-MGRS (*Multicentre Growth Reference Study*) tahun 2005 yaitu tinggi badan yang kurang menurut umur

dengan nilai z-scorenya kurang dari $-2SD$ *confidence coefficient* 95% (Kemenkes RI, 2016),

2. Ekspresi IGF-1 dan IRS

Ekspresi IGF-1 dan IRS pada larva *zebrafish*, dilakukan secara *wholmount* pada usia 9 dpf, diamati dengan menggunakan imunohistokimia. Setelah itu preparat untuk masing-masing perlakuan diamati gambarnya dengan mikroskop Olympus LED CX-22 dan diambil gambarnya dengan menggunakan camera digital (Panasonic DMC G6 Lumix) perbesaran 40 x, area yang akan diamati, diblok untuk dikuantifikasi densitas warna coklat yang muncul dalam nilai *integrated density* dengan menggunakan software *image J* versi 1.50. Semakin besar nilai intensitas warnanya ditandai warna coklat yang lebih gelap menunjukkan ekspresi yang semakin banyak, sedangkan semakin pudar warna coklat yang dihasilkan, menunjukkan ekspresi yang semakin sedikit (Indra, 2005; Susanto *et al.*, 2012).

3. Ukuran Panjang Badan Larva *Zebrafish*

Pengukuran panjang badan dilakukan dengan mengukur standar Leght (SL) yang diukur mulai dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai dengan pangkal sirip ekor (*caudal fin*) biasa disingkat *snout-fin* (Spence *et al.*, 2008), dengan menggunakan satuan millimeter (mm), teknik pengukuran dilakukan dengan cara memindahkan larva *zebrafish* pada objek glass dengan kondisi air dalam objek glass minimal, posisi ikan diam, tidak sedang bergerak dan lurus. Larva *zebrafish* diamati dengan mikroskop stereo (Olympus SZ61), dilakukan pengambilan gambar menggunakan Optilab versi 2.0 dan dilakukan pengukuran panjang badan pada *Software Image Raster Versi 3* yang sebelumnya telah dikalibrasi. Pengukuran dilakukan pada hari ke 3, 6 dan 9 dpf.

4. Ukuran Rasio Panjang Kepala

Rasio panjang kepala dan panjang badan larva *zebrafish* diamati, yaitu dari *snout-operkulum* dan panjang keseluruhan larva (*snout*) hingga pangkal sirip ekor (*caudal fin*), selanjutnya dibandingkan untuk membandingkan melihat proporsi panjang badan larva usia 3, 6 dan 9 dpf.

5. Embrio *zebrafish* (*Danio rerio*) :

Jenis embrio yang digunakan berwarna transparan (tidak berwarna putih), tidak berjamur (tidak berserabut putih dan menempel), berbentuk bulat dan berusia 0-2 hpf (*Hour Post Fertilization*). Embrio tersebut diperoleh dari hasil fertilisasi induk jantan dan betina. Induk *zebrafish* yang digunakan berjenis wildtype telah diidentifikasi di laboratorium Ilmu perairan FPIK-UB.

6. Rotenon

Rotenon diperoleh dari Sigma (R8875) dengan kemurnian $\geq 95\%$ dengan konsentrasi berdasarkan studi eksplorasi yaitu 12,5 ppb.

7. Ekstrak Pegagan

Pegagan berasal dari *Materia Medica* Batu, berdasarkan penelitian dari Khotimah (2015). Ekstraksi kasar pegagan diperoleh dengan menggunakan teknik maserasi (ethanol) 98 % yang dibagi dalam 3 dosis yakni dosis 1,25 $\mu\text{g/mL}$; 2,5 $\mu\text{g/mL}$; 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (Khotimah *et al.*, 2015a).

1.7 Pengolahan dan Analisis Data

Dalam penelitian ini menggunakan beberapa analisis data statistik yaitu :

1. Menguji perbedaan panjang badan dua kelompok kontrol dengan kelompok rotenon, Menggunakan Uji *Independent t-test*.
2. Menguji perbedaan panjang badan kelompok rotenon dan pegagan, serta menguji perbedaan Ekspresi IGF-1 dan IRS dengan kelompok perlakuan, yaitu menggunakan Uji *One Way ANOVA*, yang sebelumnya menguji

homogenitas dengan *Levene* dan normalitasnya terlebih dahulu dengan *Kolmogorov-Smirnov Test*, kemudian dilanjutkan uji uji *post hoc Tukey*

3. Uji korelasi antara ekstrak etanol pegagan dengan ekspresi IGF-1 dan IRS, serta korelasi antara ekspresi IGF-1 dengan IRS, menggunakan Uji *Pearson Correlation* (untuk mengetahui kekuatan dan arah hubungan serta signifikansi).

Arah hubungan berkaitan dengan nilai korelasi positif atau negative.

- 1) Korelasi bernilai positif (+), dapat diartikan terdapat hubungan positif, yang artinya penambahan konsentrasi ekstrak etanol pegagan, akan diikuti dengan peningkatan panjang badan larva *zebrafish* dan peningkatan ekspresi IGF-1 / IRS.
- 2) Korelasi bernilai positif (-), dapat diartikan terdapat hubungan negatif, yang artinya penambahan konsentrasi ekstrak etanol pegagan, akan diikuti dengan pemendekan panjang badan larva *zebrafish* dan penurunan ekspresi IGF-1 / IRS.

Kekuatan hubungan antara variable, dapat dilihat pada table 4.1 berikut :

Tabel 4.1 Koefisien korelasi

Nilai Koefisien korelasi	Interpretasi hasil
0	Tidak ada korelasi
0-< 0,2	Korelasi sangat lemah
0,2-< 0,4	Korelasi lemah
0,4-< 0,6	Korelasi sedang
0,6-< 0,8	Korelasi kuat
0,8-1	Korelasi sangat kuat

Keterangan : Koefisien korelasi terkait dengan kekuatan hubungan antara variable, semakin tinggi nilai koefisiennya, dapat diartikan semakin kuat korelasi antara variable(Dahlan, 2009).

1.8 Alat dan bahan

1.8.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Zebrafish

Alat dan bahan yang digunakan untuk memelihara zebrafish dan memperoleh telur dalam penelitian ini antara lain : aquarium 60 Liter, alat ukur konduktifitas, pH meter, penyaring air, jaring dan tempat penangkaran telur ikan, mikropipet dan tip (*Blue, yellow, white tip*), pompa air, *well plate* isi 6 sumuran, inkubator suhu $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, alat gerus (*homogenizer*), sentrifugasi dingin 4°C , pipet plastik, kamera digital, laptop (Terdapat Software Optilab dan Image Raster), mikroskop, *Zebrafish (Danio rerio)*, Medium embrionik (E3), Pakan (Tetramin) dan *Fish All* untuk menetralkan air.

1.8.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Pegagan

Alat dan bahan yang digunakan untuk ekstraksi pegagan dalam penelitian ini antara lain : *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut ethanol dan mengentalkan ekstrak, gelas ukur, corong *buchner*, pipet tetes, erlenmeyer, kertas saring, label, gunting, benang pengikat, spatel dan pinset, desikator, oven, blender, pompa air, selang pompa air, water bath, pompa vacum, botol hasil ekstraksi, mortir dan stamfer, vial, aluminium foil, plat tetes, dan timbangan analitik.

1.8.3 Alat dan Bahan Pembuatan Medium Embrionik (E3)

Alat dan bahan yang digunakan untuk membuat medium embrionik adalah tabung reaksi 500 ml, sendok pengaduk, timbangan digital (Mettler Toledo) dan kertas Saring. Bahan yang digunakan adalah CaCl 0,08 gr, KCl 0,06 gr, NaCl 2 gr, MgSO₄ 3,2 gr dan Air Filtrasi 200 ml.

1.8.4 Alat dan Bahan Pengukuran Ekspresi IGF-1

Pengamatan untuk melihat ekspresi IGF-1 dengan cara imunohistokimia (IHK). Bahan yang dibutuhkan untuk melakukan prosedur tersebut antara lain : MeOH (Etanol), H₂O₂ 3 %, Deionized water (DW), PBSTX (PBS + Triton X),

Acetone, Collagen, Asam asetat 10 %, Normal horse serum 10 %, 3 % bovine serum albumin, Antibodi Primer(Anti IGF-1(AbCam® lot 9J18V1)), antibody skunder, ABC reagent, AP Fast red, HCL, NHS glyserol dan PFA (Paraformaldehyde) 4%.

1.8.5 Alat dan Bahan Pengukuran Ekspresi IRS

Pengamatan untuk melihat ekspresi IRS dengan cara imunohistokimia (IHK). Bahan yang dibutuhkan untuk melakukan prosedur tersebut antara lain : H₂O₂ 3% MeOH (Methanol), *Distilated Water* (DW), PBSTx (PBS+Triton X), Aceton, Collagen, Asam asetat 10%, Normal Horse Serum 10%, 3% bovine serum albumin, Antibodi Primer (Anti IRS (SantaCruz® Tyr 989 lot 62611)), antibody sekunder, ABC reagent, AP fast red, HCl, Glycerol, PFA (Paraformaldehyde) 4%.

1.9 Prosedur Penelitian

1.9.1 Persiapan Fertilisasi dan Perawatan Embrio

Sebelum pelaksanaan fertilisasi, kondisi aquarium harus bersih dan bebas dari bahan berbahaya/ toksik. Untuk perawatan sehari-hari aquarium dibersihkan minimal 1 minggu sekali dan penyaringnya diganti setiap 3 hari sekali, dilakukan sponing dan pemasangan airator agar kebutuhan oksigen tercukupi. Pada pinggir aquarium ditutup dengan kertas karton untuk menghindari stress lingkungan. Sebelum *zebrafish* dimasukkan dalam aquarium, terlebih dahulu air aquarium diberikan anti klorin, kemudian didiamkan selama 30 menit. Jumlah air dalam aquarium adalah 60 Liter air tawar, dengan suhu 28,5 °C (Isogai *et al.*, 2001), Konduktivitas 400-1500 µS, Ph 6,8-7,5 . Untuk pakan sehari-hari *zebrafish* diberikan pakan sebanyak 3 kali sehari, pakan yang diberikan yaitu Tetramin) (Khotimah *et al.*, 2015d). Pelaksanaan fertilisasi disesuaikan dengan siklus gelap: terang (10:14). (Avdesh *et al.*, 2012). Di dalam penelitian ini pemasangan trap untuk menampung embrio dari hasil fertilisasi, sebelum

pelaksanaan tersebut pengaturan siklus gelap terang disesuaikan keinginan dari peneliti sendiri yaitu lampu dimatikan sebagai siklus gelap (10 jam dari pukul 20.00 sd 06.00 WIB) dan lampu dinyalakan (14 jam dimulai pada pukul 06.00 sd 20 WIB).

Setelah lampu dinyalakan ditunggu 20 menit untuk memberikan kesempatan *zebrafish* melakukan fertilisasi. Kemudian “trap” yang berisi embrio *zebrafish* segera diangkat dan dipindahkan ke petridish, selanjutnya embrio dibersihkan dengan menggunakan air dari pureit hingga embrio bersih dari kotoran dan jamur, pembersihan itu dilakukan dengan cepat tidak melebihi dari 2 hpf. Sebelum dilakukan perawatan embrio, embrio tersebut dipindahkan pada well plate 6 sumuran dengan memberikan embrionik medium. Sebelum dimasukan didalam inkubator dicek dahulu keadaan embrio menggunakan mikroskop stereo (Olympus SZ61). Embrio yang telah dicek kemudian dimasukan kedalam incubator dengan suhu 28 °C selama 3 hari (72 hpf).

1.9.2 Pembuatan Embrionik Medium

Pembuatan 200 ml embrionik medium mengacu pada (Avdesh *et al.*, 2012). Cara pembuatannya sebagai berikut : Memasukan kertas pengalas pada timbangan digital kemudian di 0 (nol) kan, kemudian seluruh bahan (CaCl 0,08 gr; KCl 0,06 gr; NaCl 2 gr; MgSO₄ 3,2 gr) ditimbang dan dimasukan dalam tabung reaksi, ditambahkan air filtrasi (Aqua) sampai dengan 200 ml, selanjutnya digoyangkan agar seluruh bahan larut. Setelah itu untuk bagian stok dimasukkan ke dalam botol, ditutup rapat dan disimpan dalam lemari es suhu 2-8°C. Pada saat penggunaan, medium embrionik ditambahkan air filtrasi dengan perbandingan medium embrionik dan air filtrasi adalah 1:9.

1.9.3 Pembuatan Larutan Rotenon

Pembuatan rotenone mengacu pada (Khotimah *et al.*, 2015d) yaitu : Rotenon yang digunakan yaitu berasal dari sigma (R8875) kemurniannya $\geq 95\%$. Dalam bentuk serbuk rotenone dilarutkan pada DMSO (*Dimethyl sulfoxide 1 %*). Rotenon yang telah diencerkan oleh DMSO diperoleh konsentrasi $2 \times 10^3 \mu\text{g/l}$ sebagai stok. Dalam pembuatan rotenone 12,5 ppb, dan volume yang dibutuhkan sebanyak 15 ml (5 ml x 3 sumuran), maka larutan dapat dibuat dengan mengambil dari stok konsentrasi [$2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$] dengan rumus sebagai berikut :

$V_1 \times M_1$	=	$V_2 \times M_2$	Keterangan : V_1 = Volume awal M_1 = Konsentrasi dari stok V_2 = Volume yang diinginkan M_2 = Konsentrasi akhir yang diinginkan
$V_1 \times 2 \times 10^3 \mu\text{g/l}$	=	15 ml x 12,5	
V_1	=	$\frac{15 \text{ ml} \times 12,5}{2 \times 10^{-3} \mu\text{g/l}}$	
V_1	=	$\frac{187,5}{2 \times 10^{-3} \mu\text{g/l}}$	
V_1	=	$93,75 \times 10^3 \text{ ml } \mu\text{g/ml}$	

Cara membuat Rotenon konsentrasi 12,5 ppb yaitu dengan menggunakan mikropipet stok rotenone diambil sebanyak 75 $\mu\text{L/mL}$, kemudian ditambahkan Embrionik medium sampai dengan 15 ml.

1.9.4 Pembuatan Ekstrak Pegagan

Pegagan yang digunakan yaitu berasal dari UPT Materia Medica Batu Jawa Timur dan telah bersertifikat. Salah satu zat aktif yang terkandung dalam pegagan adalah asiaticosida. Pengukuran kadar *asiticosida centella asiatica* yang diperoleh di Materia Madica batu yaitu dengan menggunakan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spetrometry*) (*Thermo Scientific, Accela*), diperoleh hasil bahwa terdapat komposisi *asiticosida* didalam pegagan. Bagian dari tanaman pegagan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak adalah bagian atas saja tanpa stolon dan akar (Khotimah *et al.*, 2015c). Prosedur pembuatan ekstrak pegagan sebagai berikut :

1. Pegagan sebanyak 1000 gram dicuci bersih kemudian dikeringkan, kemudian dipotong kecil-kecil dianginkan dan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 40 °C (meminimalisir dari kandungan air, ditandai dengan timbangan yang stabil).
2. Ekstraksi dimulai dengan pegagan yang telah kering tersebut di haluskan dengan cara diblender, dilakukan penimbangan sebanyak 100 gram dan dimasukkan kedalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter, selanjutnya direndam dalam etanol 98% sebanyak 900 ml, kemudian dikocok selama 30 menit hingga tercampur dan didiamkan semalam(24 jam) sampai mengendap.
3. Langkah selanjutnya rendaman serbuk pegagan diambil lapisan atasnya (campuran etanol (pelarut) berserta zat aktif) dan disaring menggunakan corong buncher. Perendaman tersebut dilakukan sebanyak 3 kali.
4. Pelaksanaan proses evaporasi dimulai saat memasukan hasil rendaman centella asiatica dalam labu evaporasi 1 liter, kemudian memasang labu evaporasi pada evaporator, water bath diisi air hingga penuh dengan pemanasanya diatur hingga suhu 70 °C (Disesuaikan dengan titik didih pelarut), selanjutnya memasang keseluruhan rangkaian alat termasuk evaporator, setelah itu disambungkan dengan aliran listrik, larutan etanol yang memisah dengan zat aktif yang telah ada pada labu penampung (1,5 hingga 2 jam untuk satu labu) 900 ml,
5. Langkah selanjutnya hasil ekstraksi ditimbang terlebih dahulu dan diperoleh ekstrak pegagan sebanyak 10.99 gram, kemudian dimasukkan kedalam botol plastik atau kaca dan dilakukan penyimpanan pada freezer (Selvi *et al.*, 2012).

1.9.5 Pembuatan Larutan Pegagan

Pembuatan larutan pegagan dalam penelitian ini, yaitu menggunakan hasil ekstraksi. Dengan menggunakan konsentrasi pegagan sebesar 1,25; 2,5 dan 5 µg/mL. Teknik pembuatannya dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

Konsentrasi awal/ stok (N1) didapatkan dari perhitungan :

$$\frac{10 \text{ mg pegagan}}{10 \text{ mL Aquades}} = 1 \text{ mg/mL} = 1000 \text{ µg/mL}$$

Konsentrasi 5 µ/mL

$V_1 \times N_1$	=	$V_2 \times N_2$
$V_1 \times 1000 \text{ µg/mL}$	=	$15 \text{ ml} \times 5 \text{ µg/mL}$
V_1	=	$\frac{15 \text{ ml} \times 5 \text{ µg/mL}}{1000 \text{ µg/mL}}$
V_1	=	$0,075 \text{ ml} = 75 \text{ µL}$

Keterangan :

- V_1 = Volume yang ditambahkan
- N_1 = Konsentrasi awal/ stok
- V_2 = Volume akhir
- N_2 = Konsentrasi akhir

Urutan larutan pegagan yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan konsentrasi 1,25 µg/ml dengan volume 7,5 µg/ml ; konsentrasi 2,5 µg/ml dengan volume 7,5 µg/ml dan konsentrasi 5 µg/ml dengan volume 75 µg/ml.

1.9.6 Pemberian Larutan Rotenon dan Ekstrak pegagan

Hasil eksplorasi telah menentukan konsentrasi yang dapat menyebabkan *stunting* yaitu 12,5 ppb dan hasil ekstrask pegagan yang digunakan pada perlakuan larva *zebrafish* adalah konsentrasi 1,25 µg/ml, 2,5 µg/ml dan 5µg/ml (Ridlayanti, 2016; Wijayanti, 2016). Pencampuran kedua larutan dilakukan dalam waktu yang bersamaan, dengan teknik pemberian larutan pada masing masing konsentrasi yaitu larutan rotenone terlebih dahulu, kemudian diikuti dengan larutan pegagan.

1. Kontrol positif (KP)

Dengan menggunakan mikropipet stok rotenon diambil sebanyak 93,75 µg/ml, kemudian ditambahkan embrionik medium sampai dengan 15 ml dan dibagi ke masing-masing well sebanyak 5 ml.

2. Rotenon dan pegagan konsentrasi I (RP1.25), II (RP2.5) dan III (RP5)

Pengenceran rotenon dengan ekstrak pegagan diperoleh beberapa konsentrasi berdasarkan rumus $v_1 \cdot n_1 = v_2 \cdot n_2$, dapat dijelaskan pada table berikut :

Tabel 4.2. Konsentrasi Pegagan dan Rotenon

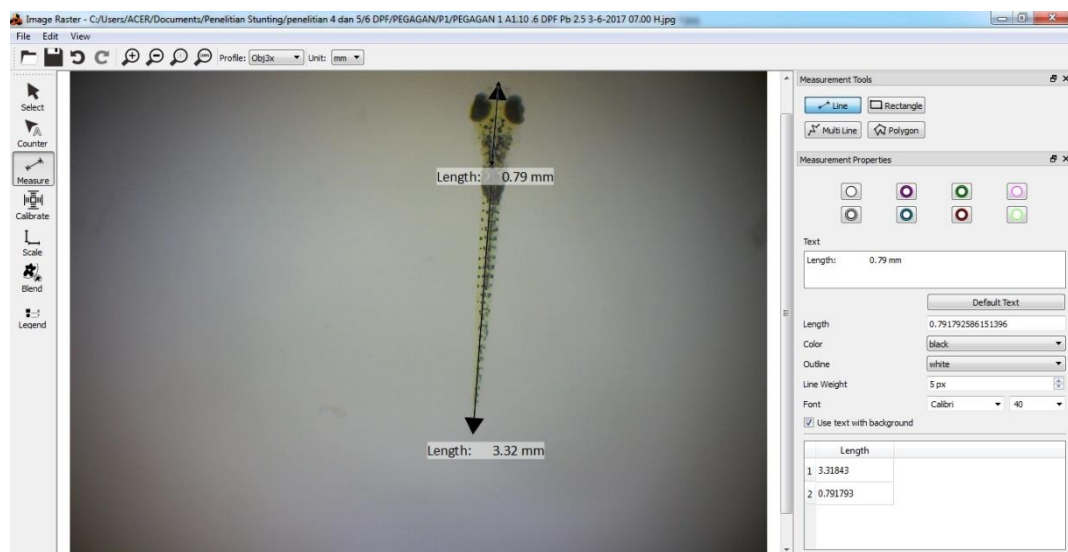
Nama	Konsentrasi yang diminta		Stok Rotenon (2×10^3) µg/L	Stok Pegagan (1) mg/mL	Air filtrasi mL	Jumlah Well	Tiap well mL
	Rotenon	Pegagan					
	µg/L	µg/mL					
RP1.25	12,5	1,25	93,75	18,75**	15	3	5
RP2.5	12,5	2,5	93,75	37,5*	15	3	5
RP5	12,5	5	93,75	75	15	3	5

Keterangan : * Diambil dari sedian 5 µg/L, ** Diambil dari sedian 2,5 µg/L

Pemberian paparan dilakukan pada *zebrafish* masih dalam periode embrionik tau dapat diasumsikan masih didalam kandungan (*intrauteri*). Paparan dilakukan sebanyak 3 kali yaitu 2 hpf, 24 hpf dan 48 hpf. Setelah usia 72 hpf (3 dpf) embrio dibilas dengan medium embrionik sebanyak 3 kali, hingga paparan tidak ada atau bersih selanjutnya hanya diberikan embrionik medium saja dan diganti setiap harinya dengan medium embrionik. Larva yang hatching dipindahkan dari well plate berisi 6 sumuran kedalam well plate berisi 24 sumuran dan sisanya sebagai stok diukur panjangnya dari 3 dpf, 6 dpf dan 9 dpf. pada usia 5 dpf larva *zebrafish* masih memperoleh nutrisi dari yolk sack, sedangkan pada usia 6 dpf larva *zebrafish* sudah membutuhkan nutrisi dari luar , oleh karena itu untuk mencegah kematian larva *zebrafish*, dapat diberikan pakan

tetramin, pakan ini digunakan sebagai nutrisi yang diperlukan *zebrafish* untuk kelangsungan hidupnya.

1.9.7 Pengukuran Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala



Gambar 4.1 Pengukuran Panjang Badan dan Rasio Panjang Kepala

Keterangan : Pengukuran panjang badan diukur dari ujung hidung hingga pangkal sirip ekor. Pengukuran panjang kepala diukur dari ujung hidung hingga operculum.

Pengukuran panjang badan dan rasio panjang kepala dilakukan pada usia 3, 6, dan 9 dpf. Teknik pengukuran dilakukan dengan cara memindahkan larva *zebrafish* pada objek glass dengan kondisi air dalam objek glass minimal, posisi ikan diam, tidak sedang bergerak dan harus lurus. Pengukuran panjang badan dilakukan dengan mengukur standar Leght (SL) yang diukur mulai dari ujung hidung (*tip of the snout*) sampai dengan pangkal sirip ekor (*caudal fin*) bias

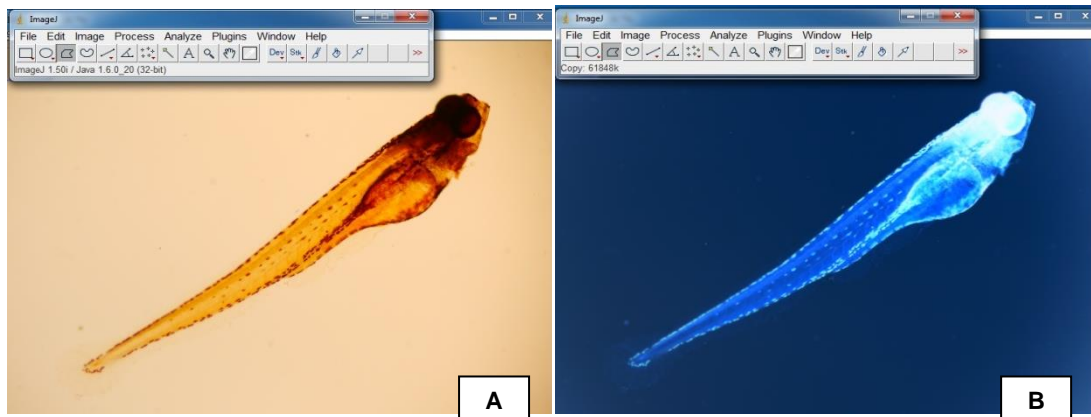
disingkat snout-fin (Spence *et al.*, 2008). Sedangkan pengukuran rasio panjang kepala dan panjang badan larva *zebrafish* yaitu, dari snout-operkulum dan dibandingkan keseluruhan panjang larva (ujung hidung ke pengkal sirip ekor). Pengukuran menggunakan satuan mm (millimeter). Larva *zebrafish* diamati dengan mikroskop stereo (Olympus SZ61) dan difoto menggunakan Optilab versi 2.2.1 dan dilakukan pengukuran skala pada *software Image Raster* versi 3 yang sebelumnya telah dikalibrasi.

1.9.8 Pengukuran dan pengamatan Ekspresi IGF 1 dan IRS

Setelah usia 9 dpf larva *zebrafish* dikumpulkan dan diperiksa dengan teknik *wholemout* dengan metode immunohistokimia untuk mengetahui ekspresi IGF 1

Didalam mikrotube larva *zebrafish* dikumpulkan dan dilakukan euthanasia dengan menggunakan air es selama 1 menit (Strykowski & Schech.,2015), kemudian difiksasi menggunakan PFA 4 % selama 3 jam pada suhu ruangan 4 °C selama satu malam. Setelah pelaksanaan fiksasi selesai, selanjutnya larva *zebrafish* dicat dengan menggunakan dengan metode IHC *wholemout*. Sebelumnya larva dilakukan bleaching dengan menggunakan H₂O₂ 3 % selama 24 jam. Larva tersebut dapat bertahan selama 1 minggu jika disimpan dalam methanol 100 % yaitu pada suhu 4 °C. Selanjutnya larva dicuci dengan menggunakan PBSTX sebanyak 3 x 5 menit kemudian dibilas dan diberikan Distilated water paling sedikit satu jam pada suhu ruangan serta menggunakan 200-300 µl per tube. Selanjutnya dicuci kembali menggunakan PBSTX sebanyak 3 x 5 menit. Dimasukan dalam aseton dan disimpan pada suhu 4°C selama 20 menit, dicuci kembali dengan menggunakan PBSTX sebanyak 3 x 5 menit.

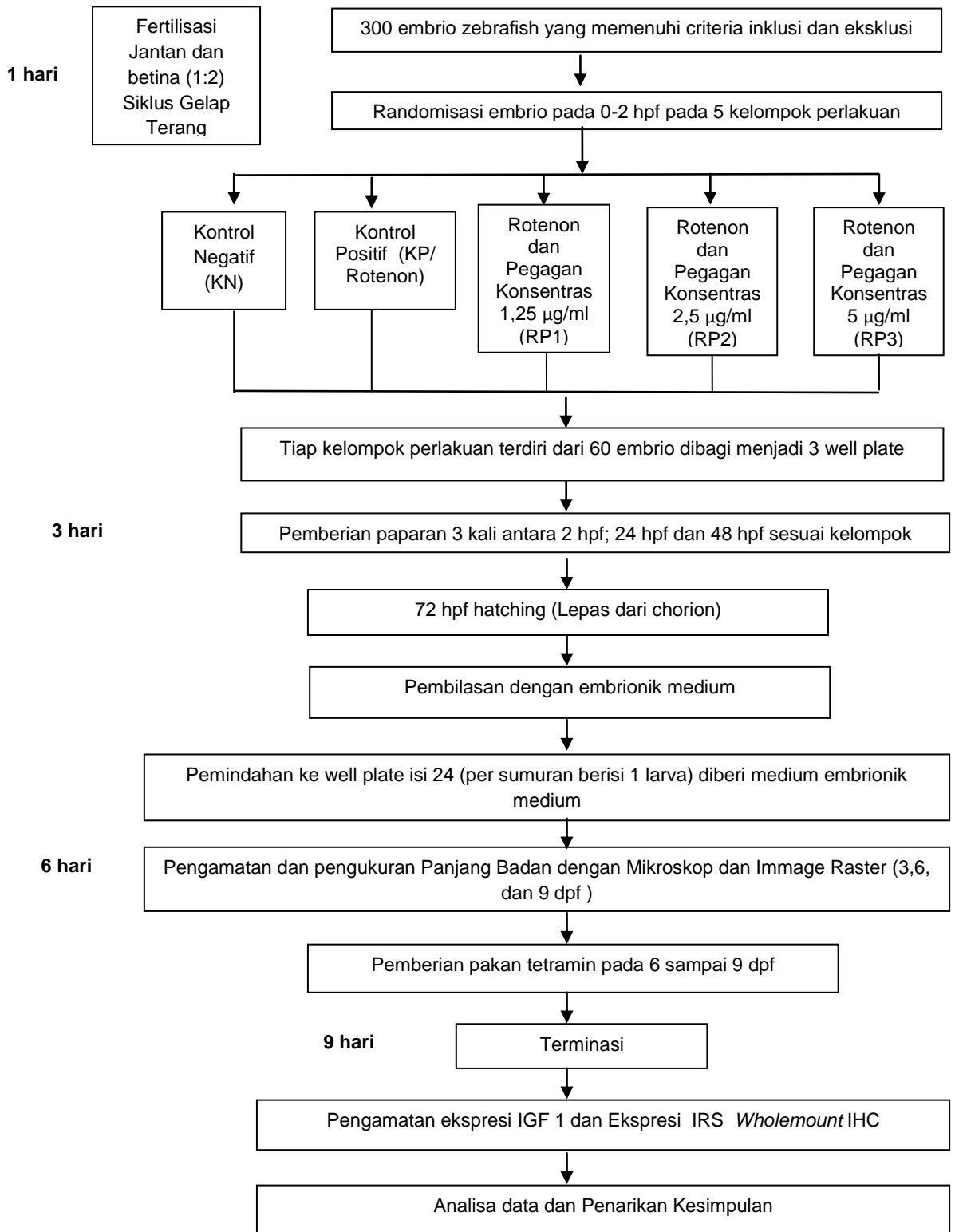
Dimasukan kedalam 10 % asam asetat (pembuatannya dengan cara 20 % acetic acid 500 μ l/DW 500 μ l) pada suhu 4⁰C selama 10 menit, selanjutnya dicuci kembali dengan menggunakan PBSTX sebanyak 3 x 5 menit. Diberikan normal horse serum dan 3% bovine albumin (pembuatannya dengan cara NHS 10 μ l/ 3% bovine serum pada PBS 900 μ l) kemudian disimpan pada suhu ruangan selama 3 jam dan dicuci dengan PBSTX dan disimpan pada suhu ruangan selama 1 x 2 jam. Inkubasi antibody primer dengan anti-IGF-1 (AbCam® lot 9J18V1) atau anti-IRS (SantaCruz® Tyr 989 lot 62611), dilarutkan dalam 1: 1500 (cara pembuatan antibody anti IGF-1 (1/10) 15 μ l/NHS 15 μ l/PBS 1 ml) pada suhu 4⁰C selama semalam (over night) setelah itu dicuci dengan menggunakan PBSTX pada suhu ruangan selama 1 jam sebanyak 4x. Inkubasi antibody skunder yang dilarutkan dalam 1: 1000 (dengan cara antibody 1 μ l/ NHS 15 μ l/ PBS 1 ml) pada suhu 4⁰C selama semalam (over night) setelah itu dicuci dengan menggunakan PBSTX pada suhu ruangan selama 1 jam sebanyak 2x. Ditambahkan ABC (Avidin Biotin Complex) reagent (reagent A 20 μ l/ PBS 1 ml, add dengan reagent B 20 μ l) disimpan pada suhu ruangan selama 40 menit kemudian dicuci dengan PBSTX pada suhu ruangan 3 x 5 menit, selanjutnya diberikan pewarna menggunakan DAB selama 5 menit pada suhu ruangan. Selanjutnya dicuci dengan menggunakan PBSTX sebanyak 3 x 5 menit dan disimpan pada suhu ruangan. Jika Larva disimpan pada glycerol 87 % bertahan sampai 6 bulan. Langkah terakhir adalah larva hasil IHC diamati dibawah mikroskop Olympus LED CX-22 dan diambil gambarnya dengan menggunakan camera digital (Panasonic DMC G6 Lumix) perbesaran 40 x dan 100x, kemudian area yang akan diamati, diblok dikuantifikasi densitas warna coklat yang muncul dalam nilai integrated density dengan menggunakan *software Image J* versi 1.50.



Gambar 4.2 Pengukuran dan Pengamatan Ekspresi IGF-1 dan IRS

Keterangan :A. Gambar kuning kecoklatan merupakan hasil IHC *Wholemount* dengan pewarnaan DAB, semakin coklat warna larva *zebrafish* maka semakin tereksresi IGF-1/ IRS.B.Gambar biru merupakan hasil pengukuran dengan menggunakan image J, semakin kontras yang terlihat maka semakin tereksresi IGF-1/ IRS.

1.10 Alur Penelitian



Gambar 4.3 Alur Penelitian.

Embrio zebrafish dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kontrol negatif, kontrol positif dan 3 kelompok perlakuan yang diberikan rotenon dan ekstrak pegagan dengan tiga konsentrasi 1,25, 2,5 dan 5 µg/ml, pada 2 hpf;24 hpf;48 hpf. Pada 72 hpf larva hatching dibilas dengan embrionik medium dan dipindahkan pada well plate isi 24 sumuran masing-masing sumuran berisi 1 larva. Kemudian diamati panjang badan pada 3,6 dan 9 dpf. Kemudian dilakukan pengukuran ekspresi IGF-1 dan IRS. Pada tahap akhir dilakukan analisa data dan penerikan kesimpulan hasil penelitian.

