

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan studi eksperimental menggunakan model *true experimental - post test only control group design*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan embrio dan larva ikan zebra yang diambil dari ikan zebra dewasa akuarium. Jumlah sampel adalah 120 telur yang di dapat dari 10 ekor ikan zebra jantan dan 20 ekor ikan zebra betina. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*.

Kriteria inklusi:

- a) Telur telah terfertilisasi
- b) Telur berusia kurang dari 2 *hpf* (*hours post fertilization*)

Kriteria Eksklusi:

- a) Telur rusak / cacat morfologis (*Bleaching*)

Pada penelitian ini, ada delapan perlakuan yang diuraikan sebagai berikut:

- a) Kelompok yang diberikan 137,9 mM etanol dan 2,24 *ppm* ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).
- b) Kelompok yang diberikan 137,9 mM etanol dan 4,48 *ppm* ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*).
- c) Kelompok yang diberikan 137,9 mM etanol dan 8,96 *ppm* ekstrak daun kelor.
- d) Kelompok yang diberikan 2,24 *ppm* ekstrak daun kelor tanpa pemberian etanol

- e) Kelompok yang diberikan 4,48 ppm ekstrak daun kelor tanpa pemberian etanol.
- f) Kelompok yang diberikan 8,96 ppm ekstrak daun kelor tanpa pemberian etanol.
- g) Kelompok kontrol positif yaitu kelompok yang diberikan 137,9 mM etanol.
- h) Kelompok kontrol negatif yaitu kelompok tanpa pemberian ekstrak daun kelor maupun etanol (Medium embrio).

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya pada bulan Januari – Maret 2017.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah paparan ekstrak daun kelor dan etanol.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang diamati adalah perikardium dan danyut jantung pada embrio dan larva ikan zebra (*Danio rerio*).

4.4.3 Variabel Kontrol

Variable kontrol dalam penelitian ini adalah kualitas air, suhu, waktu pencahayaan, dan waktu paparan ekstrak daun *Moringa oleifera*.

4.5 Definisi Operasional Variabel

4.5.1 Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Ekstrak daun kelor yang digunakan dalam penelitian ini bubuk kasar 500 mesh yang berasal dari daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diperoleh dari perkebunan kelor, Kelorina, Blora, Jawa Tengah. Daun kelor diekstraksi dengan menggunakan teknik maserasi etanol di Laboratorium Farmasi Universitas Brawijaya lalu diencerkan dengan aquades menjadi dosis 2,24 ppm, 4,48 ppm, dan 8,96 ppm.

4.5.2 Etanol

Etanol didapatkan dari Laboratorium faal FKUB. Etanol yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari etanol yang diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi 137,9 mM.

4.5.3 Medium Embrio

Medium embrio adalah medium yang digunakan untuk pemeliharaan dan pemaparan zat terhadap telur hingga menjadi embrio. Medium embrio yang akan dipakai dibuat dari CaCl₂ 0,04%, NaCl 1%, MgSO₄ 1.63%, dan KCl 0.03% yang dilarutkan dalam 100mL aquades. Selanjutnya medium embrio dibagi menjadi 10 pengenceran dan diletakkan dalam cawan petri (Kishida et. al., 1999).

4.5.4 Embrio Ikan zebra

Sampel dari penelitian ini adalah embrio ikan zebra berusia 0-72 hpf yang berasal dari perkawinan indukan ikan zebra strain *wild-type*.

4.5.5 Larva Ikan Zebra

Larva ikan zebra yang digunakan berusia 96-120 hpf dan berasal dari indukan zebrafish strain *wild-type*.

4.5.6 Perikardium Larva Ikan Zebra

Perikardium merupakan bagian dari *coelemic cavity* yang tampak sebagai ruangan mengelilingi jantung dan memisahkannya dari dinding tubuh. *Coelemic cavity* merupakan ruangan berisi cairan yang memisahkan organ-organ dalam (Kimmel et. al., 1995).

4.5.7 Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra

Denyut jantung embrio ikan zebra adalah kontraksi dari atrium dan ventrikel secara bergantian. Denyut jantung diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x, dan dihitung selama 30 detik, kemudian dikali dengan dua untuk mengetahui perkiraan jumlah denyut jantung *zebrafish* selama satu menit (Rana et. al., 2010).

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan

- Ikan zebra dewasa (*Danio rerio*) strain *wild-type*
- Medium embrio yang terdiri dari 0,04% CaCl_2 , NaCl 1%, MgSO_4 1,63%, KCl 0,03% dilarutkan dalam 100 mL aqua destilata
- Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*)
- Etanol
- Tetramin *Mini Flakes*
- Kuning telur bebek 1 tetes

4.6.2 Alat

- Tangki akuarium dengan kapasitas 60L
- *Heater*
- *Thermometer*

- Filter akuarium
- Lampu
- *Timer*
- Tanaman artificial
- Aerator
- Cawan petri
- Well plate 2x3
- Pipet plastik
- Kertas asturo berwarna hitam
- Kertas saring
- Tabung falcon
- Kotak kayu berjala
- Saringan dengan kerapatan 0.5mm
- Lampu Philip putih 36 watt
- Mikroskop trinokular Olympus CX-41

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Penentuan Dosis Ekstrak Daun Kelor

Dosis didapatkan dari penelitian sebelumnya (belum dipublikasikan), yang menggunakan 3 dosis (0,56 ppm, 1,12 ppm, 2,24 ppm). Pada penelitian ini digunakan 4 kali besaran dari penelitian sebelumnya, sehingga didapatkan:

- dosis A = 2,24 ppm
- dosis B = 4,48 ppm
- dosis C = 8,96 ppm

4.7.2 Penentuan Dosis Etanol

Dosis yang menyebabkan perubahan struktur dan fungsi pada ikan zebra adalah pada dosis 137,9 mM (0,8% v/v) (Reimers et. al., 2004)

4.7.3 Ekstraksi Daun Kelor

Ekstraksi daun kelor dilakukan oleh Laboratorium Farmasi FKUB, dengan prosedur :

1. Menimbang 500 g serbuk daun kelor 500 mesh
2. Melarutkan serbuk kelor dengan 200 ml etanol
3. Memaserasi larutan selama dua jam
4. Setelah dibiarkan selama 24 jam, larutan disaring
5. Me-remaserasi ampas dengan 150 ml etanol selama dua jam
6. Setelah dibiarkan selama 24 jam, larutan disaring
7. Mengulangi langkah lima dan enam
8. Mencampur larutan yang dihasilkan
9. Melakukan rotav menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak daun kelor dalam bentuk pasta, dengan prosedur :
 - a. Memasang kabel *power heating bath*, pompa vakum, dan *rotary evapor* pada stop kontak
 - b. Memasukan ekstrak ke dalam labu atas bulat
 - c. Mengisi heating bath dengan aquadest
 - d. Mengatur posisi sudut labu alas bulat hingga tercelup ke dalam heating bath dengan memutar tombol *clockwise*
 - e. Mengalirkan air melalui *removing condenser*
 - f. Menyalakan *heating bath* dengan menekan tombol ON

- g. Mengatur suhu *heating bath* dengan menekan tombol pengatur suhu
- h. Mengatur kecepatan rotasi dengan memutar tombol pengatur rotasi
- i. Menyalakan pompa vakum dengan menekan tombol ON
- j. Melakukan proses rotav hingga mendapatkan kepekatan ekstrak yang diinginkan
- k. Mematikan *heating bath* dengan menekan tombol OFF
- l. Menghentikan putaran *rotary evapor* dengan menekan tombol OFF
- m. Mematikan vakum dengan menekan tombol OFF
- n. Memindahkan ekstrak dari labu alas bulat ke cawan porselen.
- o. Membersihkan labu alas bulat
- p. Mengaliri *removing condenser* dengan air
- q. Mencabut kabel *power heating bath* dari stop kontak
- r. Membuang aquadest dari *heating bath*
- s. Mencabut kabel *power* pompa vakum dan *rotary evapor* dari stop kontak

4.7.4 Pengenceran Ekstrak Daun Kelor

Pengenceran ekstrak daun kelor dilakukan oleh Laboratorium Faal FKUB dengan prosedur :

1. Menyiapkan tiga falcon berisi 50 ml aquadest
2. Menimbang 0,112 mg, 0,244 mg dan 0,488 mg ekstrak daun kelor menggunakan timbangan analitik

3. Memasukkan hasil timbangan ekstrak daun kelor ke masing-masing falcon
4. Menghomogenkan larutan dengan vortex 1500 rpm

4.7.5 Pemeliharaan Ikan

Pemeliharaan ikan *Ikan zebra* dewasa (berusia 5 bulan) dilakukan di akuarium berisi 60L air pada suhu $26 \pm 1^{\circ}$ C. Pengaturan cahaya dengan periode terang selama 14 jam dimulai dari pukul 08.00 dan periode gelap selama 10 jam. Pemberian makanan berupa Tetramin *mini flakes* 0.4 gram sebanyak dua kali pada siang dan sore hari (Reed dan Jennings, 2010).

4.7.6 Proses Peneluran Ikan dan Pengambilan Telur

Proses peneluran akan dilakukan dengan meletakkan kotak kayu berjala pada akuarium kosong yang telah di isi air bersih dan diberi aerator selama 1 hari. Selanjutnya, memindahkan ikan yang akan di telurkan pada akuarium tersebut dari akuarium asalnya sebanyak pada pukul 12.00. Pada sore hari pukul 16.00 meletakkan hiasan akuarium dengan tujuan merangsang ikan agar dapat bertelur lebih banyak. Malam hari pukul 22.00 meneteskan kuning telur bebek kedalam aquarium sebanyak 1 tetes.

Proses pengambilan telur akan dilakukan pada pukul 06.00 sebelum ikan diberi makan. Selanjutnya memindahkan kembali ikan yang sudah dikembangbiakan ke akuarium semula menggunakan jaring ikan. Akuarium yang kosong tersebut kita sedot menggunakan teknik siphon dengan tujuan membuang air dan mengambil telur ikan. Pada saat membuang air, di saring juga dengan penyaring yang kerapatannya 0.5mm. Setelah itu pindahkan telur

yang telah terseleksi ke cawan petri dan di bersihkan menggunakan air guna membersihkan dari debris (Aurora, 2012).

4.7.7 Pemeliharaan Embrio dan Pemaparan Ekstrak Daun Kelor

Telur yang telah dibersihkan diletakkan dalam cawan petri, lalu diamati secara langsung 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. Ekstrak kelor dilarutkan dalam aquades kemudian didilusi dalam medium embrio sampai mencapai konsentrasi 2,24 ppm, 4,48 ppm dan 8,96 ppm. Telur diletakkan pada piring kultur 4 well (30 telur/8mL medium embrio beserta paparan ekstrak daun kelor dalam setiap well), dan diinkubasi pada suhu $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Menginkubasi kelompok kontrol hanya dengan medium embrio dengan etanol tanpa penambahan ekstrak daun kelor. Mengganti medium embrio satu kali setiap hari sesuai paparan yang diberikan dan merawat sampai usia 120 *hpf* (Kishida et.al., 1999).

4.7.8 Penghitungan Denyut Jantung Embrio Ikan Zebra

Setelah embrio ikan zebra berusia sekitar 72 *hpf*, dilakukan penghitungan denyut jantung. Embrio ikan zebra dipindahkan dari *well plate* ke slide mikroskop menggunakan pipet plastik dan diberi sedikit air. Setelah itu, embrio diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x dan dihitung denyut jantungnya menggunakan *counter* selama 30 detik. Penghitungan denyut jantung dilakukan dengan menghitung kontraksi salah satu dari kedua ruang jantung (atrium atau ventrikel). Hasil akhir jumlah denyut jantung embrio ikan zebra dikali dengan dua untuk mengetahui perkiraan jumlah denyut jantung per menitnya (Rana et al, 2010).

Berikut adalah prosedur penelitian pengaruh ekstrak daun kelor terhadap denyut jantung embrio ikan zebra.

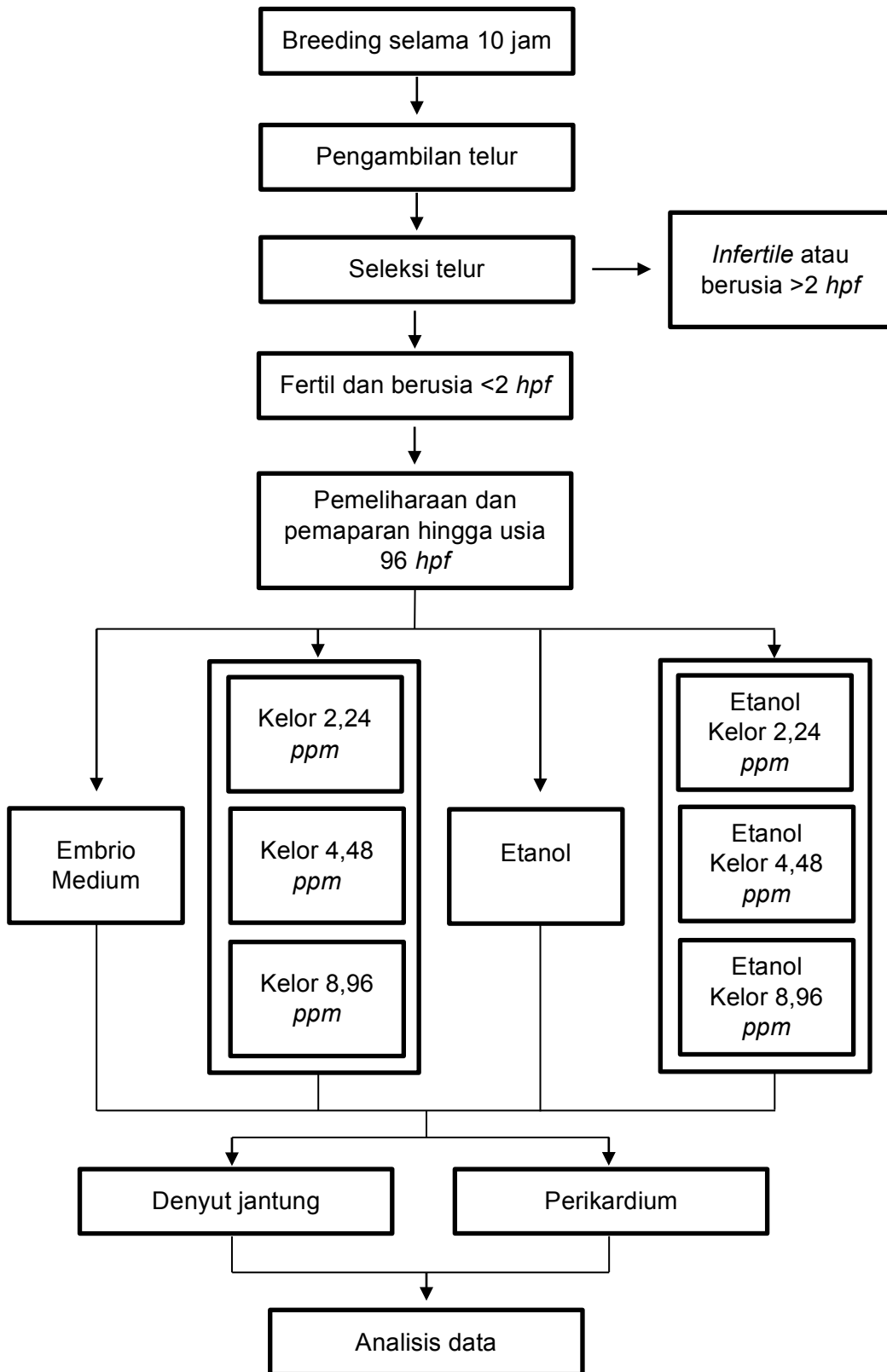
1. Mengambil satu embrio yang telah berusia 72 *hpf* dan meletakkan di objek glass menggunakan pipet plastik. Kemudian memberi sedikit air pada embrio ikan zebra agar tidak mati.
2. Mengamati embrio ikan zebra dibawah mikroskop, menghitung jumlah *heart rate* selama 30 detik, kemudian mengalikan dengan dua.
3. Meletakkan embrio yang telah diamati ke dalam well plate baru yang telah diberi medium.
4. Melakukan prosedur diatas terhadap embrio lainnya.

4.7.9 Pengamatan Perikardium Larva Ikan Zebra

Mengamati perikardium dari larva ikan zebra (*Danio rerio*) dengan menggunakan mikroskop cahaya. Langkah-langkahnya diuraikan sebagai berikut.

1. Mengambil larva pada 96 *hpf* menggunakan pipet dan meletakkan di *object glass*. Apabila larva terlalu banyak bergerak, menambahkan larutan metil selulosa 3%.
2. Dengan menggunakan mikroskop cahaya, mengamati dan menilai perikardium larva ikan zebra usia 96 *hpf* pada perbesaran 40 kali (Serluca, 2008).

4.8 Alur Penelitian



4.9 Pengolahan Data

Setelah mendapatkan data pengukuran denyut jantung dan perikardium ikan zebra, data diolah menggunakan software SPSS for Windows 20.0 dan menyatakan dalam rerata \pm simpangan baku (mean \pm SD). Data dianalisis menggunakan uji analisis ANOVA, untuk mengetahui adanya perbedaan antara 8 kelompok perlakuan. Apabila terdapat perbedaan yang signifikan, dilanjutkan dengan menggunakan uji Post-hoc test untuk mengetahui letak perbedaan pada kelompok tersebut. Derajat kebermaknaan yang digunakan adalah $\alpha = 0,05$.