

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan eksperimental laboratorium dengan *post test only control group design*.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan embrio *zebrafish* dari *zebrafish* dewasa yang diperoleh dari toko lokal bersertifikat dan dipelihara di dalam akuarium. Sesuai dengan penelitian Abdelkader *et al.*, (2012), jumlah sampel kelompok kontrol dan perlakuan masing-masing adalah 30 embrio dengan tiga kali pengulangan. Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *simple random sampling*.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Faal, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juni hingga Juli 2013.

4.4 Variabel Penelitian**4.4.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas yang digunakan yaitu pemberian genistein dengan konsentrasi 2,5 μM , 5 μM , dan 10 μM serta dosis penghambat reseptor estrogen sebesar 10 μM .

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang diamati adalah respon taktil embrio pada 72 jam post fertilisasi.

4.4.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah umur *zebrafish* yang digunakan dan temperatur inkubator perawatan *zebrafish*.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Pemeliharaan Ikan

Pemeliharaan *zebrafish* dewasa dilakukan dalam tanki berisi 60L air. Suhu air dijaga pada suhu 25-30°C. Pengaturan cahaya dengan periode terang selama 14 jam dimulai dari pukul 10.00 pagi dan 10 jam periode gelap. Pemberian makanan dengan Tetramin (TetraJapan Inc.) dua kali setiap hari (Kishida *et al.*, 1999).

4.5.2 Pengambilan Telur

Pengambilan telur dilakukan dengan meletakkan keranjang berjala pada tanki *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 air untuk membersihkannya dari debris.

4.5.3 Kultur Embrio

Telur yang telah dibersihkan diletakkan dalam cawan petri lalu diamati di bawah mikroskop untuk menentukan apakah telur tersebut terfertilisasi atau tidak. Telur yang terfertilisasi pada bagian dalam cangkang terdapat bulatan

yang berwarna lebih keruh dari tengahnya. Pengamatan dilakukan tidak lebih dari 2 jam. Embrio diletakkan pada piring kultur dan diinkubasi pada suhu $28 \pm 0,5$ °C. Medium embrio diganti satu kali setiap hari sesuai paparan yang diberikan. Embrio dirawat sampai usia 72 jam setelah fertilisasi (Kishida *et al.*, 1999).

4.5.4 Pemaparan

Pemaparan dilakukan setelah 2 jam setelah fertilisasi. Pada kelompok perlakuan, genistein dilarutkan dalam medium embrio sampai mencapai konsentrasi 2,5 μM , 5 μM , dan 10 μM sedangkan pada kelompok kontrol, embrio mengandung 0,05% DMSO yang merupakan pelarut genistein dengan konsentrasi terbesar (Bakkiyanathan *et al.*, 2010; Abdelkader *et al.*, 2012).

Pada penelitian ini, ICI dilarutkan dengan konsentrasi 20 mM kemudian didilusi dalam medium embrio sampai mencapai 10 μM . Setelah itu, larutan ICI 10 μM dicampurkan dengan genistein 5 μM . Medium embrio mengandung 0,05% DMSO dan ICI yang telah dilarutkan dalam DMSO dengan konsentrasi 20 mM (Wyle and Chen, 2007).

4.5.6 Pengamatan Respon Taktil

Tes respon taktil dilakukan untuk menilai kemampuan motorik larva *zebrafish* pada 72 jam setelah fertilisasi, karena respon berenang larva terhadap rangsang taktil pada ekor muncul pada 27 jam setelah fertilisasi (Drapeu *et al.*, 2002). Tes dilakukan dengan memberikan stimulasi berupa jarum yang disentuh pada ekor larva yang diam. Kemudian dihitung jumlah larva yang

berenang setelah mendapat stimulasi. Larva dengan kelainan morfologi berupa curved tail tidak disertakan dalam tes penghitungan motorik.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan

- Zebrafish dewasa (*Danio rerio*)
- Medium embryo 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) dilarutkan dalam dimethyl sulfoxide (DMSO)
- . ICI 182, 780

4.6.2 Alat

- Tanki dengan kapasitas 60L
- Inkubator
- jarum
- Mikroskop binokular (Leica)
- Cawan petri
- Mikropipet dan tip
- Kamera

4.7 Analisis Statistik

Analisa statistik dalam penelitian ini menggunakan one-way analysis of varian (ANOVA) dilanjutkan dengan uji Tukey dengan software SPSS 16. Nilai perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$.

4.8 Alur Penelitian

