

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*True experimental*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK).

4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah model embrio ikan jenis *Danio rerio*. Embrio yang digunakan adalah embrio yang telah dibuahi, sehat, dan langsung dari akuarium. Masing – masing kelompok berisi 30 embrio ikan zebra. Dalam penelitian ini, pengulangan dilakukan 3 kali, sehingga dalam penelitian ini diperlukan embrio ikan zebra sebanyak 360 ekor (Cindelaras, 2005). Pada uji toksisitas ini menggunakan 4 kelompok embrio :

1. Kelompok 1: kelompok kontrol (embrio ikan zebra yang tidak diberikan ekstrak kulit manggis dan hanya diberi *embryonic medium*)
2. Kelompok 2: embrio ikan zebra berusia 2 hpf yang diberi paparan ekstrak kulit manggis konsentrasi I (750 µg/mL)
3. Kelompok 3: embrio ikan zebra berusia 2 hpf yang diberi paparan ekstrak kulit manggis konsentrasi II (1000 µg/mL)
4. Kelompok 4: embrio ikan zebra berusia 2 hpf yang diberi paparan ekstrak kulit manggis konsentrasi III (1250 µg/mL)

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli, Agustus sampai dengan September 2013.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*) yang dibagi dalam kelompok berdasarkan uji pendahuluan.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah *Laju Penetasan*, *Daya Tahan Hidup* dan *Kecacatan* pada embrio ikan zebra.

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar obyek penelitian selalu terkendali dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah:

1. Pemberian diet standard ikan
2. Kondisi lingkungan aquarium dan *embrionic medium*
3. Pemberian konsentrasi ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*)

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio ikan jenis *Danio rerio* yang telah diidentifikasi di Laboratorium Ilmu Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

4.5.2 Ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana*)

Ekstraksi kulit manggis menggunakan metode maserasi. Kulit manggis adalah bagian pericarp manggis (*Garcinia mangostana*). Manggis yang digunakan berasal dari famili *Guttiferae* yang didapatkan dari pasar tradisional Kota Malang yang berasal dari daerah Lumajang.

4.5.3 *Embryonic medium*

Embryonic medium adalah medium bagi embrio ikan zebra yang dipenuhi dengan kandungan nutrisi dan pH yang cocok untuk embrio ikan zebra yang pembuatannya dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB. *Embryonic medium* mengandung MgSO₄ 0,815 g, NaCl 5,0 g, KCl 0,15 g, CaCl₂.2H₂O 0,26/ distilled water (DW) 500ml (OECD, 2013) yang diencerkan 10 kali.

4.5.4 Embrio Ikan Zebra

Embrio sehat adalah embrio yang berkembang secara normal, dengan struktur mata, telinga, dan otak jelas. Sebaliknya, embrio yang cacat menunjukkan malformasi struktur kepala dan batang serta mengeruhnya korion telur sehingga dapat dibedakan saat melakukan penelitian (Fleming, 2007).

4.5.5 Menentukan Embrio Ikan Zebra yang Mengalami Defek atau Kematian

Embrio ikan zebra yang mengalami mortality adalah embrio ikan zebra yang memiliki *chorion* keruh dan tidak memiliki denyut jantung. Embrio ikan zebra yang mengalami defek adalah embrio ikan zebra yang mengalami pembengkokan pada tubuhnya, ukurannya lebih kecil dari normal, dan malformasi organ pada 72 hpf (OECD, 2013).

4.5.6 Menentukan Larva Ikan Zebra yang Mengalami Kematian

Larva ikan zebra yang mengalami kematian apabila tidak terdapat denyut jantung dan tidak berespon saat disentuh dengan jarum (*Poke Test*) (OECD, 2013).

4.6 Alat dan Bahan

1. Perawatan embrio ikan zebra

Inkubator yang diatur pada suhu 28 ± 1 °C yang terbuat dari kayu yang dilengkapi thermostat untuk menjaga temperature agar tetap fisiologis bagi embrio ikan zebra.

2. Pemberian Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*)

Alat : Pipet, gelas ukur, kertas saring, 6-Well Plate

Bahan : ekstrak etanol kulit manggis, *embrionic medium*, aquades, tabung ukur hasil ekstrak.

3. Pengamatan Embrio Ikan zebra

Alat :

1. 6 Well Plate
2. Inkubator bersuhu $\pm 28^{\circ}\text{C}$
3. Mikroskop stereo Olympus SZ60 yang dilengkapi kamera OptiLab

4. Jarum pentul untuk Poke Test
5. Kardus penutup sisi akuarium

Bahan :

1. Pakan Ikan zebra (TetraMin®)
2. Air yang disaring dari Pure It®
3. Medium yang mengandung MgSO₄ 0,815 g, NaCl 5,0 g, KCl 0,15 g, CaCl₂.2H₂O 0,26/ distilled water (DW) 500ml (OECD, 2013) yang diencerkan 10 kali
4. Ekstrak Kulit Manggis
5. Ikan zebra dewasa

4.7 Prosedur Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*) menggunakan etanol

Proses pengeringan

1. Kulit Manggis (*Garcinia mangostana*) dipotong kecil-kecil agar mudah kering
2. Dioven dengan suhu 80°C atau dengan panas matahari sampai kering (bebas kandungan air)

Proses ekstraksi

1. Setelah kulit manggis kering, dihaluskan dengan blender sampai halus
2. Ditimbang sebanyak 100 gram sampel kering dan dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.
3. Direndam dengan ethanol 90% sampai volume 1 liter.
4. Dikocok sampai benar-benar tercampur (± 30 menit)
5. Didiamkan 1 malam sampai mengendap
6. Lapisan atas atau bagian pelarut diambil, disaring menggunakan kertas saring.

Proses evaporasi

1. Diambil lapisan atas campuran ethanol dengan zat aktif yang sudah terambil

2. Dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter
3. Dipasang labu evaporasi pada evaporator
4. Water bath diisi dengan air sampai penuh
5. Semua rangkaian alat termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (diatur sampai 80°C) dipasang kemudian disambungkan dengan aliran listrik
6. Larutan etanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu
7. Ditunggu sampai aliran ethanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu)
8. Hasil ekstraksi dimasukkan dalam botol plastik
9. Disimpan dalam freezer (Nagulendran, K.R., 2007 dengan modifikasi laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya)

2. Perawatan pada Ikan Zebra dewasa

Ikan zebra dipelihara di dalam akuarium dengan suhu 26 ± 1 °C, pH antara 7,9 – 8,3, kadar oksigen > 95%. Ikan zebra diberi makan sebanyak 3 kali sehari pada jam 8 pagi, 12 siang dan 4 sore. Di dalam akuarium diberi wadah berukuran 26cm x 20 cm x 12,5 cm dengan diberikan jaring pada penutup wadah tersebut agar telur ikan zebra bisa masuk ke dalam wadah. Bagian luar dari akuarium ikan zebra diberikan penutup yang terbuat dari kardus atau kain agar ikan zebra bisa memperoleh lingkungan yang nyaman, karena ikan zebra sangat sensitif terhadap lingkungannya. perawatan pada ikan zebra juga harus memperhatikan siklus gelap terangnya dengan perbandingan 10:14 jam (OECD, 2013).

3. Perlakuan pada Embrio Ikan Zebra

Embrio ikan zebra ditampung pada wadah berukuran 26 cm x 20 cm x 12,5 cm mula – mula dipindahkan pada cawan petri yang telah

dibersihkan dan diisi dengan air yang dilewatkan pure it secukupnya. Embrio dipindahkan dengan menggunakan pipet tetes secara hati – hati dan dipilih telur yang telah terbuahi, serta dilakukan penghitungan untuk mengetahui berapa jumlah embrio yang didapatkan. Setelah semua embrio dipindahkan ke well yang besar, embrio ikan zebra tersebut dibilas dengan air yang dilewatkan pure it sebanyak kurang lebih 5 kali sampai bersih. Setelah embrio ikan zebra bersih, dilakukan pengamatan di bawah mikroskop untuk mengetahui embrio ikan zebra yang telah dipilih sehat dan tidak mengalami defek atau mati. Jika ditemukan embrio yang mengalami defek atau mati, embrio tersebut segera dikeluarkan dari cawan petri. Setelah itu, embrio ikan zebra diletakkan pada *plate 6 well* yang sudah diberi embrionik medium, masing – masing diisi 30 embrio. Embrio ikan zebra berumur 2 hpf yang akan dilakukan uji toksisitas diberikan ekstrak kulit manggis sesuai dengan dosis yang akan diuji. 3 well pertama dijadikan sebagai kontrol. 9 well selanjutnya sebagai embrio yang diberi ekstrak. Embrio ikan zebra diberikan ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 750 µg/mL, 1000 µg/mL, dan 1250 µg/mL. Ekstrak kulit manggis dan juga embrionik medium yang diberikan pada embrio ikan zebra dilakukan penggantian setiap hari.

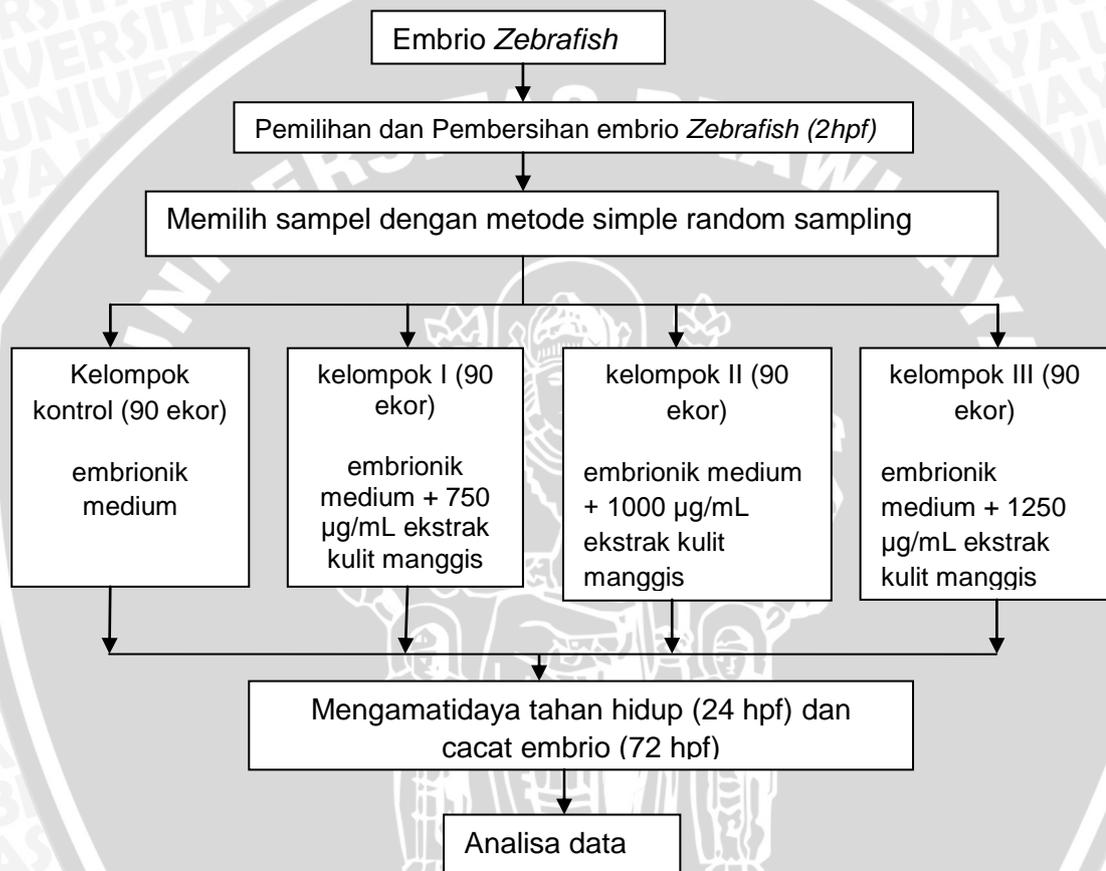
5 Pengamatan Embrio

Pengamatan embrio dilakukan pada jam ke 24, 48, 72 dengan mikroskop stereo (Olympus SZGI) yang dilengkapi dengan kamera OptiLab untuk merekam dan memotret sampel.

4.8 Pengolahan Data

Pengolahan data survival rate menggunakan *Software Statistical Product and Service Solution (SPSS)*, penentuan konsentrasi LC 50 dapat ditentukan dengan menggunakan Probit analisis dari program SPSS dan persamaan garis liner.

4.9 Alur Kerja Penelitian



Bagan 4.1 Alur Kerja Penelitian