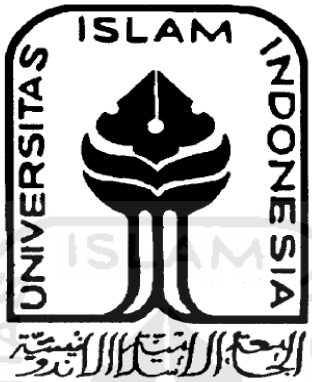
PENGEMBANGAN METODE UJI REGENERASI PENYEMBUHAN LUKA MELALUI PENGAMATAN SIRIP KAUDAL IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)

SKRIPSI



Oleh :

RIANITA MEILINDA

16613085

PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA

YOGYAKARTA

JULI 2020

PENGEMBANGAN METODE UJI REGENERASI PENYEMBUHAN LUKA MELALUI PENGAMATAN SIRIP KAUDAL IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia Yogyakarta

Oleh:

RIANITA MEILINDA

16613085

PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA

YOGYAKARTA

JULI 2020

SKRIPSI

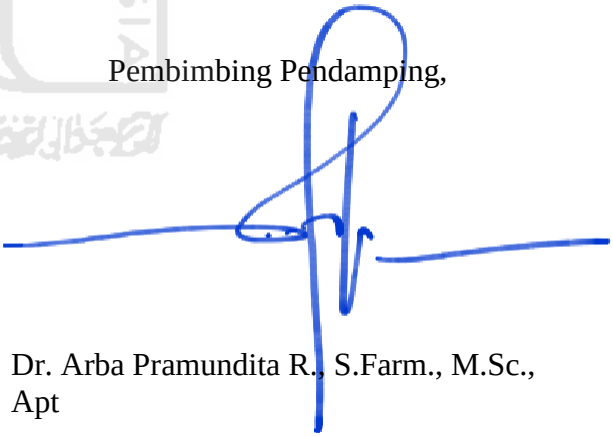
PENGEMBANGAN METODE UJI REGENERASI PENYEMBUHAN LUKA MELALUI PENGAMATAN SIRIP KAUDAL IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)

Yang diajukan oleh:

RIANITA MEILINDA

16613085

Telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama,	Pembimbing Pendamping,
	
Dr. Farida Hayati, S.Si., M.Si., Apt	Dr. Arba Pramundita R., S.Farm., M.Sc., Apt

SKRIPSI

PENGEMBANGAN METODE UJI REGENERASI PENYEMBUHAN LUKA MELALUI PENGAMATAN SIRIP KAUDAL IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)

Oleh:

RIANITA MEILINDA

16613085

Telah lolos uji etik penelitian

dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Tanggal: 27 Juli 2020

Ketua Penguji	: Dimas Adhi Pradana, M.Sc., Apt	(.....)
Anggota Penguji	:1. Dr. Farida Hayati, S.Si., M.Si., Apt	(.....)
	2. Dr. Arba Pramundita R., S.Farm., M.Sc., Apt	(.....)
	3. drh. Sitarina Widyarini, M.P., Ph.D	(.....)

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia

Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 27 Juli 2020

Penulis,



Rianita Meilinda

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahi rabbil 'alamin, puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala nikmat dan karunia-Nya dan atas takdir-Nya penulis bisa menjadi pribadi yang berpikir, berilmu, beriman, dan bersabar. Semoga keberhasilan ini dapat menjadi satu langkah awal untuk masa depan penulis dalam meraih cita-cita. Dengan ini saya persembahkan karya ini kepada:

1. Orangtua penulis, Bapak H. M. Yusri Sukri dan Ibu Hj. Sri Syakriati yang selalu memberikan kasih sayang, dukungan, motivasi, serta limpahan doa yang sangat berarti.
2. Saudara penulis, Kak Rio Yustio Hadi, Kak Riky Adi Putra, Mbak Miftha, dan Caluela yang sudah bersedia menjadi tempat berkeluh kesah, membagi ilmu, selalu menyayangi, dan mendukung disetiap langkahnya.
3. Dosen pembimbing, Ibu Farida Hayati dan Ibu Arba Pramundita yang sudah sabar mendampingi dari awal hingga akhir dalam membimbing dan menyempatkan waktunya walaupun di keadaan serba *online.* Serta, mbak Faizah yang sangat sabar mendampingi selama proses penelitian di laboratorium.
4. Tim *Danio rerio* (Tiara, Echa, Cahya, dan Radinal) sangat beruntung rasanya bisa berjuang bersama dengan kalian untuk menyelesaikan amanah ini. Terimakasih untuk bantuan, kerjasama, kekompakan, perjuangan, dan kesedihan yang telah dilalui bersama di laboratorium farmakologi tercinta.
5. Sahabatku Delapans (Raudya, Dina, Maylita, Yolanda, Azmi, Resti, dan Tiara) dan Bella, Terimakasih telah memberikan semangat, doa, dan selalu ada walaupun berjauhan semoga segala cita-cita dan harapan kita bisa tercapai.
6. Sahabatku seperantauan perbungaan, Nina, dan Rizkaayu, dan teman KKN 248 yang sangat paham *ups and down* kehidupan selama masa kuliah. Terimakasih atas bantuan, waktu, tenaga, ilmu, dan kenangan selama 4 tahun ini.
7. Seluruh anggota Farmasi B 2016 teman seperjuangan dari awal masuk semester satu yang sangat baik, kompak, dan seru.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul "Pengembangan Metode Uji Regenerasi Penyembuhan Luka Melalui Pengamatan Sirip Kaudal Ikan Zebra (*Danio rerio*)". Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi Prodi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia. Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ibu Dr. Farida Hayati, S.Si., M.Si., Apt. dan Ibu Dr. Arba Pramundita Ramadani, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, mengarahkan, memberikan saran, motivasi, dan dukungan selama penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Bapak Dimas Adhi Pradana, M.Sc., Apt. dan Ibu drh. Sitarina Widyarini, MP., Ph.D. selaku dosen penguji yang telah memberikan dukungan, motivasi dan saran yang bersifat membangun.
3. Bapak Prof. Riyanto, M.Si., Ph. D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
4. Bapak Saepudin, S.Si., M. Si., Ph. D., Apt. selaku Ketua Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
5. Dosen Pengajar Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan bekal ilmu kepada penulis selama dibangku perkuliahan.
6. Laboratorium Farmakologi beserta staf yang telah menyediakan fasilitas dan membantu penulis selama penelitian.

Penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini tidak terlepas dari kekurangan dan jauh dari sempurna. Akhir kata, semoga skripsi ini dapat berguna

dan bermanfaat bagi pembaca dalam pengembangan ilmu dan pengetahuan khususnya dalam bidang kefarmasian.

Yogyakarta, 27 Juli 2020

Penulis,



Rianita Meilinda

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL i
HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PERSETUJUAN ii
HALAMAN PENGESAHAN iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS iv
HALAMAN PERSEMBAHAN v
KATA PENGANTAR vi
DAFTAR ISI viii
DAFTAR LAMPIRAN x
DAFTAR GAMBAR xi
DAFTAR TABEL xii
INTISARI xiii
ABSTRACT xiv

BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 2
1.3 Tujuan penelitian 2

BAB II STUDI PUSTAKA 3
2.1 Tinjauan Pustaka 3
2.1.1 Penyembuhan Luka (*Wound Healing)* 3
2.1.2 Ikan zebra (*Danio rerio*) 4
2.1.3 Regenerasi Sirip Kaudal Ikan Zebra 5
2.1.4 Parameter Regenerasi Sirip Kaudal 7
2.1.5 Anestesi 8
2.1.6 *Software ImageJ* 8
2.2 Landasan Teori 9
2.3 Hipotesis 9

2.4 Kerangka Konsep Penelitian 10

BAB III METODE PENELITIAN 11

3.1. Alat dan Bahan 11

3.1.1. Alat 11

3.1.2. Bahan 11

3.1.3. Subyek Uji 11

3.2 Prosedur Kerja 11

3.2.1 Pengajuan *Ethical Clearance* 11

3.2.2 Uji Aktivitas Regenerasi pada Ikan Zebra 11

3.3 Analisis Hasil 13

3.4 Skema Kerja Penelitian 14

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 15

4.1 *Ethical Clearens* 15

4.2 Anestesi Ikan Menggunakan Tricaine 15

4.3 Proses Regenerasi Sirip Kaudal Ikan Zebra 17

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 21

5.1 Kesimpulan 21

5.2 Saran 21

DAFTAR PUSTAKA 22

LAMPIRAN 25

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Identifikasi Ikan Zebra (Danio rerio).....25
Lampiran 2 Dokumentasi Perubahan Sirip Kaudal 28
Lampiran 3 Hasil Pengujian Waktu Anestesi.....30
Lampiran 4 Hasil Pengukuran Luas Area Sirip Kaudal 30
Lampiran 5 Hasil Pengamatan Sirip.....31
Lampiran 6 Hasil Pengujian Statistik Normalitas Luas Area Regenerasi sirip kaudal Ikan Zebra Menggunakan uji *Saphiro-Wilk*.....31
Lampiran 7 Hasil Pengujian Statistik Homogenitas Luas Area Regenerasi sirip kaudal Ikan Zebra.....32
Lampiran 8 Hasil Pengujian Statistik *Wilcoxon Test* antara luas area sesudah amputasi dan luas area 14 hari setelah amputasi.....32

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Proses penyembuhan luka 3
Gambar 2. 2 Ikan zebra (*Danio rerio*).....5
Gambar 2. 3 Struktur sirip ikan zebra.....6
Gambar 2. 4 Regenerasi sirip kaudal ikan zebra 7
Gambar 3. 1 Skema kerja penelitian.....14
Gambar 4. 1 Pengamatan sirip kaudal.....18

DAFTAR TABEL

Tabel 4. 1 Hasil pengujian waktu anestesi 16
Tabel 4. 2 Luas area sirip 19
Tabel 4. 3 Hasil perhitungan %regenerasi sirip kaudal.....20

PENGEMBANGAN METODE UJI REGENERASI PENYEMBUHAN LUKA MELALUI PENGAMATAN SIRIP KAUDAL IKAN ZEBRA (*Danio rerio*)

Rianita Meilinda
Program Studi Farmasi

INTISARI

Ikan zebra (*Danio rerio*) memiliki keistimewaan pada beberapa bagian jaringan dan organnya karena memiliki kemampuan meregenerasi secara alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode terbaik untuk uji regenerasi penyembuhan luka melalui pengamatan sirip kaudal ikan zebra. Metode yang dilakukan dengan cara pemberian anestesi Tricaine®. Kemudian dilakukan pemotongan sirip kaudal ikan zebra menggunakan pisau steril. Pengujian ini menggunakan 10 ekor ikan zebra sehat dipelihara pada suhu 28,5°C. Selanjutnya dilakukan pengamatan aktivitas regenerasi penyembuhan luka dari sirip kaudal dibawah mikroskop stereo. Analisis data yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan menghitung persen area pertumbuhan sirip menggunakan software imageJ™. Hasil regenerasi menunjukkan sirip kaudal ikan zebra diawali dengan fase penyembuhan luka dan pembentukan blastema pada hari pertama. Fase proliferasi dan pemanjangan pada hari ke-8 dan ke-9. Pengamatan pada hari ke-14 menunjukkan terjadinya fase diferensiasi sirip dengan regenerasi sebesar 26,6%. Hasil uji statistik *wilcoxon test* ($P<0,05$) menunjukkan perbedaan signifikan antara rata-rata luas area sirip 0 jam pasca pemotongan dengan 14 hari pasca pemotongan.

Kata Kunci: Ikan Zebra, Regenerasi, Sirip Kaudal

DEVELOPMENT METHOD FOR REGENERATION OF WOUND HEALING IN CAUDALFIN OF ZEBRAFISH (*Danio rerio)*

Rianita Meilinda
Pharmacy Study Program

ABSTRACT

Zebrafish (Danio rerio) has features on several parts of its tissues and organs because it has the ability to regenerate naturally. This study aims to develop the best method for regeneration testing through observing zebra fish caudal fins. The method is performed by administering Tricaine® anesthesia. Then the zebra fish caudal fins are cut using a sterile knife. This test uses 10 healthy zebra fish kept at 28,5^{o} C. Furthermore, the regeneration activity of the caudal fin under the microscope stereo. Data analysis conducted in this study was to calculate the percent growth area of the fins using imageJ software. The regeneration results showed the zebrafish caudal fin begins with the phase of wound healing and blastema formation on the first day. Proliferation and elongation phase on days 8 and 9. Observation on the 14th day showed a fin differentiation phase with regeneration of 26.6%. Wilcoxon test statistical results ($P < 0.05$) showed a significant difference between the average area of the fin area 0 hours post-cut and 14 days after cutting.

Keywords : Zebrafish, Regeneration, Caudalfin

BAB I
PENDAHULUAN
1.1 Latar Belakang

Prevalensi kasus luka di indonesia pada tahun 2018 mengalami peningkatan sebanyak 9,2% (RISKESDAS, 2018). Di dunia menurut *MedMarket* asosiasi luka di Amerika menyebutkan bahwa luka bedah menduduki peringkat tertinggi sejumlah 110.300.000 kasus tiap tahunnya (Driscoll, 2014). Proses penyembuhan luka dapat terjadi secara alami maupun dengan bantuan zat kimia atau obat. Penyembuhan luka umumnya bertujuan untuk memulihkan jaringan yang rusak dengan perbaikan seperti penggantian struktur melalui sel-sel yang sudah ada (Gonzalez *et al*., 2016).

Beberapa tahun terakhir, ikan zebra (*Danio rerio*) sudah cukup dikenal sebagai hewan model dalam banyak studi praklinis. Salah satu kemampuan luar biasa yang dimiliki hewan ini adalah kemampuan regenerasi dan mengembalikan fungsi jaringan pada bagian substansial tubuhnya (Eming *et al*., 2009). Ikan zebra dapat meregenerasi banyak jaringan dan organ, seperti sirip, jantung, retina, ginjal, dan sistem saraf pusat (Gemberling *et al.*, 2013). Bagian sirip dan retina dari ikan zebra memiliki peran besar untuk aktivitas regeneratif (Yoshinari dan Kawakami, 2011).

Cedera dapat memicu kemampuan meregenerasi sel fotoreseptor dan neuron retina pada sirip ekor ikan zebra (Stewart *et al.*, 2009). Adanya sinyal sel protein khusus yang disebut *fibroblast growth factors* (FGF) berfungsi untuk melihat bahwa sum-sum tulang belakang membaik dari cedera (Goldshmith *et al.*, 2012). Pertumbuhan sirip baru dari ikan zebra melewati 4 tahap yaitu penyembuhan luka akibat cedera, pembentukan blastema, diferensiasi, dan regeneratif (Mathew *et al.*, 2009b; Petrie *et al*., 2014). Pemilihan hewan model pada penelitian ini dipertimbangkan karena akan adanya trauma fisik, cedera pada jaringan dan organ, serta mengurangi kualitas hidup, dan akibatnya akan menurunkan populasinya (Mathew *et al*., 2009a). Sampai saat ini, di Indonesia belum banyak dilakukan penelitian terkait uji regenerasi sirip kaudal ikan zebra. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan sebagai pengembangan metode

dalam percobaan uji regenerasi alami pada ikan zebra (*Danio rerio)*. Oleh karenanya, penelitian ini diharapkan dapat menjadi metode jangka panjang yang sesuai untuk pengembangan metode uji regenerasi secara morfologi sirip kaudal ikan zebra (*Danio rerio*) di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimanakah pengembangan meode uji regenerasi penyembuhan luka melalui pengamatan sirip kaudal serta pengamatan pemberian anestesi pada ikan zebra (*Danio rerio*) ?

1.3 Tujuan penelitian

Mengembangkan metode untuk uji regenerasi penyembuhan luka melalui pengamatan sirip kaudal serta pengamatan pemberian anestesi pada ikan zebra (*Danio rerio*).

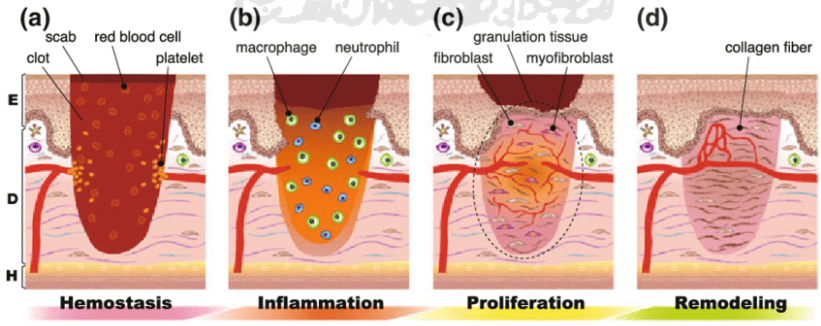
1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat:

1. Menambah ilmu pengetahuan kepada tenaga kesehatan mengenai ikan zebra sebagai model hewan uji aktivitas regeneratif.
2. Memberikan informasi mengenai metode yang digunakan untuk rujukan ke penelitian selanjutnya.

BAB II
STUDI PUSTAKA
2.1 Tinjauan Pustaka
2.1.1 Penyembuhan Luka (*Wound Healing)*

Luka dapat menyebabkan sejumlah komplikasi termasuk infeksi dan perubahan homeostasis. Proses penyembuhan luka dan regenerasi jaringan terdiri dari urutan peristiwa molekuler dan seluler yang terjadi setelah munculnya lesi jaringan sebagai upaya untuk mengembalikan jaringan yang luka atau rusak. Peristiwa sel dan biokimiawi dalam proses penyembuhan luka dibagi dalam beberapa tahapan berikut: reaksi inflamasi, proliferasi sel dan sintesis elemen-elemen yang membentuk matriks ekstraseluler, dan tahap posterior yang disebut fase remodeling. Keseluruhan fase tersebut adalah peristiwa berurutan yang dapat terjadi dengan melibatkan mediator terlarut, sel darah, dan sel parenkim (Gonzalez *et al.*, 2016). Homeostasis menjadi tahap pertama dari penyembuhan luka akut dengan melibatkan pembentukan matriks dalam beberapa jam setelah terjadi cedera (Reinke and Sorg, 2012). Fase regenerasi meliputi transformasi dan proliferasi. Fase proliferasi akan berfokus pada proses penyembuhan, pemulihan luka, pembentukan jaringan granulasi, dan pemulihan jaringan pembuluh darah (Palagummi *et al.*, 2014).



Gambar 2. 1 Proses penyembuhan luka ((Kawasumi et al., 2012)).

Pada gambar 2.2 menjelaskan bahwa penyembuhan luka pada kulit manusia meliputi 4 fase yaitu homeostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling. (a) Trombosit mengaktifkan faktor koagulasi yang berperan dalam pembekuan darah. (b) Neutrofil dan makrofag menyerang proses pembekuan darah dan memicu terjadinya respon peradangan. (c) Terjadi pembentukan jaringan granulasi.

Fibroblas mengangtikan matriks menjadi matriks yang penuh dengan kolagen dan mentransformasi ke dalam myofibroblas. (d) Terjadi peralihan dari granulasi ke jaringan parut yang akan diperbaiki terus-menerus dibawah permukaan luka (Kawasumi et al., 2012).

2.1.2 Ikan zebra (*Danio rerio*)

Danio rerio atau yang biasa dikenal ikan zebra memiliki ukuran tubuh sekitar 3 cm. Ikan yang berasal dari Asia Selatan lebih tepatnya India, biasa ditemukan di air tawar bahkan banyak yang menggunakan sebagai hewan peliharaan didalam akuarium. Ikan zebra sudah banyak digunakan sebagai hewan model karena memiliki kesamaan dalam fungsi fisiologis dan gen (Santorielli, 2012). Hewan model yang mudah diamati menggunakan mikroskop bedah karena transparan. Ikan zebra umumnya hidup di daerah perairan dengan arus yang tenang, contohnya seperti sungai atau sawah yang berlumpur. Ikan zebra termasuk pemakan binatang kecil seperti serangga. Ikan zebra dapat berkembangbiak sepanjang tahun saat ikan berumur 4 – 6 bulan (Olmeda, 2011). Adapun klasifikasi ikan zebra adalah sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Class : Actinopterygii
Ordo : Cypriniformes
Famili : Cyprinidae
Sub Famili : Danioninae
Genus : *Danio*
Spesies : *Danio rerio*



Gambar 2. 2 Ikan zebra (*Danio rerio*) (Dokumentasi pribadi).

Ikan zebra hidup di sungai, parit, saluran air buatan, kolam, dan aliran air sawah. Umum dijumpai di anak sungai dikaki bukit. Termasuk hewan omnivora pemakanan zooplankton, fitoplankton, cacing dan krustasea kecil, dan serangga. Perkembangbiakan ikan zebra disebabkan karena suhu dan ketersediaan makanan (Vishwanath, 2010). Umumnya hidup didalam air yang memiliki tingkat keasaman yaitu sekitar 16,5 dalam suhu 34^{o}C (Arunachalam *et al*., 2013).

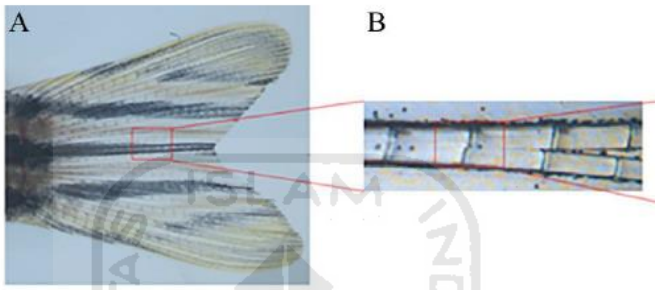
2.1.3 Regenerasi Sirip Kaudal Ikan Zebra

Ikan zebra mempunyai kemampuan mengembalikan fungsi cukup baik (Lush, 2014). Hal ini dibuktikan dari kemampuan meregenerasi sel fotoreseptor dan neuron retina yang disebabkan karena adanya cedera. Perlakuan yang dilakukan dengan mengamputasi sirip ekor belakang dan perut untuk menganalisis aktivitas regenerasi.

Adapun tahapan regenerasi yang terjadi secara umum pada sirip ikan zebra yaitu diawali dengan penyembuhan luka, pada fase ini terjadi migrasi beberapa sel epidermis menuju daerah yang luka sehingga luka akan tertutup dan membeku membentuk scab yang dapat dilihat berupa jaringan transparan sekitar luka. Selanjutnya, fase pembentukan blastema yang terjadi karena proliferasi sel-sel mesenkim. Proliferasi sel-sel akan berdifferensiasi secara mitosis sampai pada tahap puncak blastema sudah menjadi maksimal atau tidak membesar lagi. Kemudian, pertumbuhan regeneratif terbentuknya pulau-pulau darah yang akan berkembang menjadi pembuluh darah. Terakhir fase redifferensiasi, berhentinya proliferasi sel-sel blastema serta membentuk ruas atau jari-jari dan membran yang

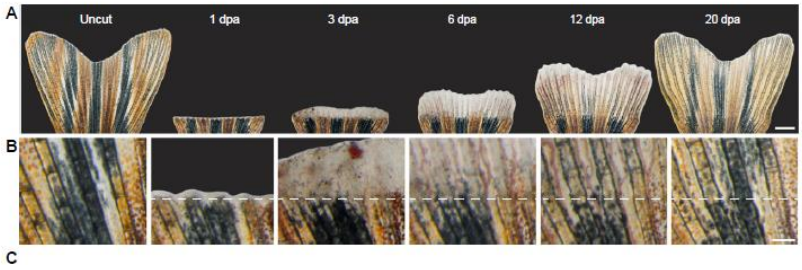
terjadi secara berurutan dan terus menerus sehingga memperbaiki struktur anatomi dan histologis yang hampir mirip dengan aslinya (Kimbal, 1993; Iza, 2010).

Terjadinya proses metolasi histone dilokasi amputasi mengakibatkan sel-sel ikan zebra menjadi "aktif" seperti sel induknya (Stewart *et al.,* 2009). Ikan zebra menggunakan sinyal sel protein khusus yaitu *fibroblast growth factors* (FGF) yang digunakan untuk melihat bahwa sum-sum tulang belakang membaik dari cedera (Goldshmith *et al.,* 2012).



Gambar 2. 3 Struktur sirip ikan zebra (Tu & Johnson, 2011).

Ikan zebra memiliki bagian sirip ekor yang merupakan salah satu jaringan yang dapat digunakan karena aksesibilitas, struktur yang sederhana, serta regenerasinya yang cepat dan hampir tidak terbatas. Fase regenerasi sirip pada ikan zebra dibagi menjadi tiga, yaitu penyembuhan luka (*wound healing*), pembentukan blastema, dan pertumbuhan regeneratif. Ketika sirip kaudal diamputasi terjadi pengaktifan regenerasi dan memerlukan waktu sekitar 2 minggu untuk meregenerasi keseluruhan jaringan dan menyusun fungsional sirip. Dalam waktu 1-3 jam setelah amputasi (*hours post amputation*/hpa) sel-sel akan melakukan migrasi untuk menutup luka. Kemudian 18-24 jam pasca amputasi bagian epidermis apikal akan terbentuk dan blastema akan terakumulasi. Pada jam ke-24 pasca amputasi blastema sel memisah menjadi dua kompartemen dan setelah 48 jam aktivitas regenerasi mulai terjadi dan pertumbuhan renegeratif terus berlanjut sampai tumbuh seperti jaringan asli (Azevedo *et al*., 2011).



Gambar 2. 4 Regenerasi sirip kaudal ikan zebra (Pfefferli, *et al.*, 2015).

Pada gambar 2.4 menjelaskan proses regenerasi sirip kaudal ikan zebra pada suhu 27◦C. Pada hari ke-1 pasca amputasi terbentuk jaringan putih di atas amputasi yang terdiri dari luka epidermis dan beberapa sel blastema. Pada hari ke-3 pasca amputasi, bagian putih di atas bidang amputasi berisi blastema. Pada hari ke-6 pasca amputasi, terjadi perluasan bidang; jaringan putih mempertahankan batas sirip, sedangkan hasil proksimal mulai memperlihatkan bentuk tulang dan pigmentasi sebagai tanda redifferensiasi. Pada hari ke-12 pasca amputasi, regenerasi teus berlanjut. Pada hari ke-20 pasca amputasi, ukuran sirip hampir menyerupai seperti semula dari segi ukuran dan pola. Bagian putih jaringan tetap bertahan di bagian ujung untuk melakukan pertumbuhan homeostatis (Pfefferli, *et al.*, 2015).

2.1.4 Parameter Regenerasi Sirip Kaudal

Adanya variasi ukuran ikan dan tingkat regenerasi sirip banyak ditemukan karena variasi alami dari kondisi masing-masing ikan atau tempat perkembangbiakannya (Cardeira *et al.*, 2016). Penyebaran ukuran panjang dan berat pada ikan adalah hal yang normal dijumpai. Umumnya, ikan yang dibudayakan bersama akan dapat merubah perilaku dan mempertahankan wilayahnya secara individu.

Penelitian yang dilakukan di Mumbai, India melaporkan studi genetik dua generasi menunjukkan bahwa sifat pertumbuhan seperti standar ukuran panjang dan berat badan telah menjadi sifat yang diwariskan. Sebanyak 1516 pengamatan yang dilakukan untuk berat badan dan panjang standar populasi adalah 195 ± 1,87 mg dan 2,17 ± 0,01 cm. Faktor genetik dan non-genetik dapat mempengaruhi sifat pertumbuhan secara signifikan. Diluar keadaan fisiologis ikan, kualitas air seperti

suhu, pH, amonia, nitrit, dan nitrat harus dimonitor secara teratur (Pathan *et al.*, 2019).

Dalam beberapa kondisi faktor suhu membawa pengaruh yang cukup besar terhadap regenerasi dan bentuk tubuh ikan. Suhu yang lebih rendah dapat menghasilkan bagian tubuh yang lebih besar. Salah satu dari bagian tubuh yang dipengaruhi regenerasi dan bentuknya adalah sirip (Sfakianakis, *et al*., 2011).

2.1.5 Anestesi

Anestesi umumnya diberikan untuk menghindarkan dari rasa sakit dan trauma selama proses bedah dengan menghilangkan kesadaran yang bersifat *reversible.* Efek anestesi dapat bertahan jauh melampaui waktu yang diperlukan dan menyebabkan efek samping. Anestesi umum mempengaruhi pada beberapa bagian otak (Leung, *et al*., 2014). Keterlibatan dari beberapa jenis reseptor membran dan saluran ion sebagai target dari obat anestesi.Tricaine methanesulfonate (MS-222) banyak dibuktikan dapat digunakan untuk anestesi dan euthanasia pada hewan uji vertebrata akuatik (Katz, *et* al., 2020). MS-222 sebagai pelemas otot yang memblokir natrium dan menyebabkan tindakan yang spontan merupakan serbuk yang larut dalam air bersifat asam dan dapat menurunkan pH buffer hingga 5. Penelitian yang telah dilakukan sebelumya menggunakan konsentrasi 168 mg/L dapat memberikan efek anestesi (Matthews *et al*., 2012). Sedangkan tricaine pada konsentrasi 0,2-0,3 mg/ml memberikan efek euthanasia (Wilson, *et al*., 2009; Matthews *et al*., 2012).

2.1.6 *Software ImageJ*

Sekitar 30 tahun belakangan perangkat lunak *ImageJ* digunakan sebagai alat untuk menganalisis gambar secara ilmiah. Beberapa ahli biologi telah menggunakan variasi berbagai perangkat lunak untuk memperoleh, menganalisis data, serta konektivitas dengan alat (Schneider, *et al.*, 2012). ImageJ memungkinkan penggunaan konektivitas dengan perangkat lunak lain. Program ini sangat berkembang jauh melampaui ruang lingkup awalnya sehingga dapat cukup kuat untuk digunakan dibidang analisis oleh para ahli (Rueden, *et al.*, 2017). Penelitian terdahulu, menggunakan perangkat ini untuk menganalisis gambar struktur tulang ikan seperti operkulum, sinar sirip ekor, dan sisik serta tingkat dan

intensitas pewarnaan spesifik tulang ikan. ImageJ tersedia bagi seluruh komunitas penelitian ikan zebra untuk standarisasi protokol skrining di dunia akademis dan industri (Tarasco, *et al.*, 2020).

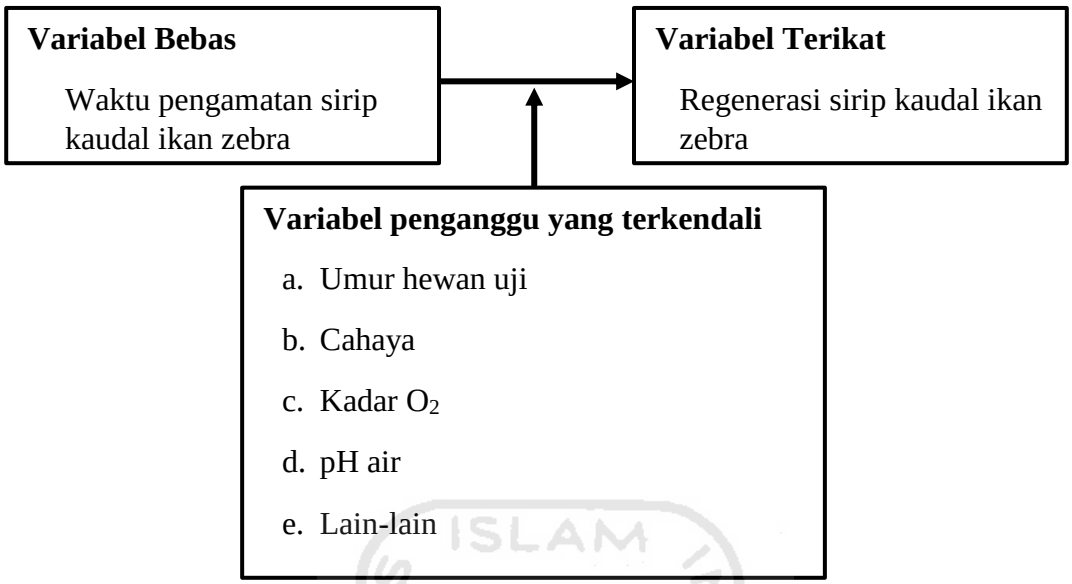
2.2 Landasan Teori

Pemotongan sirip kaudal bertujuan untuk mengetahui aktivitas regenerasi sirip kaudal ikan zebra (*Danio rerio*). Penelitian terdahulu membuktikan adanya daya regenerasi yang cukup baik dari sirip kaudal ikan zebra. Pada penelitian yang pernah dilakukan di Indonesia menjelaskan bahwa perkembangan regeneratif dimulai dari hari ke-3 sampai dengan hari ke-25 (Sari *et al*., 2016). Amputasi sirip tidak akan menganggu kelangsungan hidup ikan dan regenerasi dapat terjadi sangat cepat selama dua minggu (Brandão, 2019). Terjadi pengaktifan regenerasi pada sirip kaudal ikan zebra setelah pemotongan dan memerlukan waktu sekitar 2 minggu untuk meregenerasi keseluruhan jaringan dan menyusun fungsional sirip (Azevedo *et al*., 2011). Umumnya pemberian anestesi dilakukan agar tidak terjadinya trauma akibat pemotongan sirip. Namun, anestesi menggunakan tricaine dapat menjadi salah satu faktor yang terlibat dalam kondisi fungsional dari hewan uji. Perbedaan parameter regenerasi seperti adanya variasi alami karena perbedaan tempat perkembangbiakan di Indonesia sendiri belum banyak dibahas. Kemungkinan adanya perbedaan antara ikan zebra diluar negeri dengan di Indonesia memungkinkan adanya efek yang berbeda. Sehingga pada penelitian ini akan membuktikan kemampuan regenerasi alami menggunakan metode uji pemotongan sirip kaudal pada ikan zebra melalui perbandingan luas daerah sirip sebelum pemotongan dan setelah pemotongan serta pengamatan respon ikan zebra terhadap larutan anestesi.

2.3 Hipotesis

Berdasarkan landasan teori yang telah dijelaskan didapatkan dugaan bahwa pembakuan metode uji regenerasi penyembuhan luka sirip kaudal ikan zebra (*Danio rerio*) dapat dilakukan dari hari ke-0 sampai 2 minggu setelah pemotongan sirip serta memperhatikan faktor lain diantaranya yaitu pemaparan larutan anestesi.

2.4 Kerangka Konsep Penelitian



BAB III
METODE PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain peralatan gelas, akuarium, timbangan analitik, mikroskop merk olympus, pisau steril/*Surgical blade, Salinity meter*.

3.1.2. Bahan

Pakan ikan Tetramin®, air, Tricaine®, ASW® *salt mix,* aquasafe.

3.1.3. Subyek Uji

Subyek uji diperoleh dari salah satu peternak ikan di Bogor. Jumlah hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah sebanyak 10 ekor ikan zebra. Hewan uji yang digunakan adalah ikan zebra dewasa berusia 3-6 bulan. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Praklinik, Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Pengajuan *Ethical Clearance*

Pengajuan *ethical clearance* dilakukan dengan mengajukan permohonan dan proposal penelitian kepada komite etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

3.2.2 Uji Aktivitas Regenerasi pada Ikan Zebra

3.2.2.1 Identifikasi Ikan Zebra

Identifikasi hewan uji dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor untuk mengetahui spesies dan varietas dari ikan zebra yang akan digunakan untuk penelitian ini.

3.2.2.2 Kriteria Hewan Model

Kriteria inklusi hewan model yang digunakan pada penelitian ini adalah ikan zebra dewasa berusia 3-6 bulan, dengan keadaan ikan sehat. Untuk memastikan ikan sehat dilakukan pengamatan dari aktivitas berenang ikan (berenang di bagian tengah) dan aktvitas bergerak ikan. Adapun kriteria

eksklusi dari hewan model yang akan digunakan yaitu ikan yang sakit, cacat, dan mati selama penelitian dilakukan.

3.2.2.3 Aklimatisasi

Aklimatisasi ikan dilakukan setidaknya satu minggu sebelum dilakukan pengujian. Pada saat masa aklimatisasi ikan akan disimpan di akuarium yang terpisah dan diberi pakan 2 kali sehari. Suhu dan pH air dipertahankan masing-masing sebesar 27-28^{o}C dan 7,2 (Spinello *et al*., 2019). Selama proses aklimatisasi ada ikan yang tidak dapat diikutkan kedalam penelitian, hal ini mengacu pada kriteria inklusi dan eksklusi.

3.2.2.4 Pemeliharaan Ikan Zebra

Ikan zebra yang digunakan sebagai penelitian uji aktivitas regenerasi penyembuhan luka dipelihara menggunakan media air keran didalam akuarium dengan suhu 28,5 ^{o}C. Pemeliharaan didalam sistem pencahayaan 14 jam terang dan 10 jam gelap (Sun *et al*., 2019).

3.2.2.5 Anestesi

Anastesi digunakan untuk menghindari adanya ketidaknyamanan saat perlakuan. Pada penelitian ini menggunakan Tricaine. Tricaine adalah bubuk yang dapat larut dalam air dan bersifat asam. Pembuatan tricaine mengacu pada penelitian yang telah dilakukan sebelumya pada konsentrasi 0,168 mg/ml dapat memberikan efek anestesi (Matthews *et al*., 2012). Adapun waktu-waktu yang dapat diamati ketika anestesi yaitu waktu anestesi merupakan waktu yang dibutuhkan ikan dari kondisi sadar ke kondisi tidak sadar. Waktu perlakuan merupakan rentang waktu yang dibutuhkan ketika perlakuan dari ikan mulai dikeluarkan dari larutan anestesi sampai ikan dimasukkan kembali kedalam air biasa. Waktu sadar merupakan waktu yg dibutuhkan ikan pada saat mulai menunjukkan tanda-tanda sadarkan diri, seperti contohnya menggerakkan ekor atau membalikkan badan. Waktu pulih merupakan waktu yang dibutuhkan ikan dari adanya tanda pergerakan sampai dengan ikan kembali berenang normal.

3.2.2.6 Amputasi Sirip Kaudal

Ikan zebra yang berusia 3-6 bulan diberikan anestesi menggunakan triciaine dengan cara perendaman. Sebelum dilakukan amputasi sirip kaudal perlu dilakukan pengamatan dibawah mikroskop, untuk melihat keadaan normal sirip dan dilakukan dokumentasi sebagai keadaan sirip sebelum pemotongan. Selanjutnya, sirip kaudal dipotong lurus dengan menggunakan pisau steril pada satu segmen sirip yang letaknya dibawah percabangan pertama. Setelah pemotongan sirip kaudal diamati lagi dibawah mikroskop dan dilakukan dokumentasi dianggap sebagai keadaan sirip 0 jam pasca pemotongan. Setelah itu dapat dilakukan pengamatan kembali pada hari ke-14 dan dilakukan dokumentasi dibawah mikroskop untuk melihat hasil pertumbuhan sirip kaudal.

3.2.2.7 Perhitungan Luas Area Sirip Menggunakan *ImageJ*™

Perhitungan luas area dilakukan menggunakan hasil dari dokumentasi yang telah dilakukan pada saat sebelum dilakukan amputasi, 0 jam pasca amputasi, dan 14 hari pasca amputasi untuk membandingkan data luas area regenerasinya. Penggunaan untuk setiap foto dilakukan kalibrasi ukuran menjadi cm. Selanjutnya klik *binary* dan *make binary* untuk menjadikan area sirip berwarna hitam seluruhnya. Klik *tools selection* untuk menseleksi bagian sirip yang akan dihitung luasnya. Kemudian, klik *analyze* → *tools* → *ROI Manager* → *add* → *Measurement.* Akan mencul tabel luas area dari sirip.

3.3 Analisis Hasil

Untuk mengetahui hasil pertumbuhan sirip perlu dilakukan analisis kuantitatif menggunakan perhitungan regenerasi sirip kaudal yang dilakukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop optilab dan menggunakan aplikasi *ImageJ*™. Adapun cara perhitungan yang akan dilakukan sebagai berikut (Utami, 2018) :

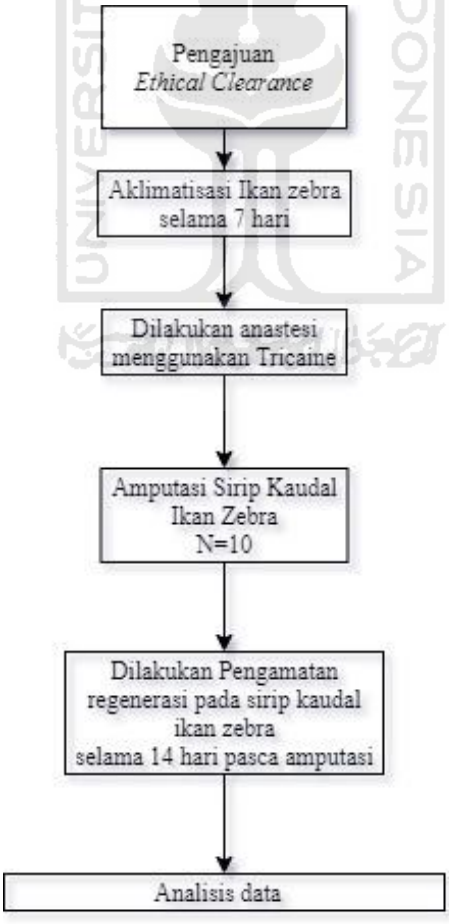
Daerah yang hilang = Daerah sebelum amputasi – Daerah pasca amputasi

Daerah regenerasi = Daerah hari ke-14 pasca amputasi – Daerah yang hilang

$$\text{Presentase regenerasi} = \frac{\text{Daerah regenerasi}}{\text{Daerah yang hilang}} \text{ x } 100\ \%$$

Kemudian dilakukan analisis menggunakan uji statistik. Uji statistik diawali dengan penentuan normalitas distribusi data. Apabila data yang didapatkan memenuhi syarat distribusi normal atau mendekati normal dapat menggunakan uji statistik parametrik yaitu *Paired T Test*, apabila data tidak memenuhi syarat uji parametrik dapat dilanjutkan dengan uji non-parametrik yaitu *Wilcoxon Test.* Kedua uji tersebut membandingkan antara luas area sesudah amputasi dan luas area regenerasi setelah amputasi dianggap memiliki perbedaan ketika nilai P < 0,05 (Santoso, 2010).

3.4 Skema Kerja Penelitian



Gambar 3. 1 Skema kerja penelitian.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui metode regenerasi penyembuhan luka melalui pengamatan sirip kaudal serta pengamatan pemberian anestesi pada ikan zebra (*Danio rerio*). Sebanyak 10 ekor ikan zebra yang digunakan dalam penelitian ini. Tahap awal penelitian ini melihat respon ikan terhadap larutan anestesi agar dapat digunakan untuk menghindarkan ikan dari trauma akibat pemotongan sirip. Pemotongan sirip dilakukan dibelakang percabangan. Pengamatan yang dilakukan ditujukkan untuk mengetahui regenerasi sirip dan dibuktikan dengan perhitungan persen regenerasi sirip kaudal. Pengamatan dilakukan setelah 14 hari pasca amputasi sirip dengan memperhatikan faktor lain seperti pemaparan anestesi dan suhu pemeliharaan.

4.1 *Ethical Clearens*

Penelitian ini telah mengajukan surat kelayakan etik yang diajukan kepada tim Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia di Yogyakarta.

4.2 Anestesi Ikan Menggunakan Tricaine

Pada penelitian ini dilakukan pemberian anestesi dengan tujuan agar sesuai dengan prinsip kesejahteraan hewan yaitu 3R dan 5F. *Refinement,* sebagai salah satu prinsip 3R yaitu upaya pemeliharaan hewan uji dari tindakan yang menyebabkan rasa sakit dan stress, salah satunya dengan pemberian anestesi yang adekuat. Adapun prinsip 5F yang ditarget adalah *Freedom from pain, injury and diseases* terkait dengan prosedur yang dilakukan sebagai tindakan pencegahan dengan pemberian obat pengurang rasa sakit. Menurut *US Food and Drug Administrasi* (FDA) tricaine methanesulfonate (MS-222) merupakan anestesi dan penenang yang sudah terbukti paling banyak digunakan untuk spesies akuatik salah satunya adalah ikan zebra (Matthews *et al*., 2012). Penyiapan tricaine perlu diperhatikan karena pada konsentrasi 0,2-0,3 mg/ml sudah dapat mematikan ikan (Wilson, *et al*., 2009; Matthews *et al*., 2012). Pada penelitian ini anestesi dibuat dalam konsentrasi tricaine 0,168 mg/ml dengan volume yang berbeda yaitu 100 ml dan 50 ml.

Tabel 4. 1 Hasil pengujian waktu anestesi.

	Anestesi * (detik)	Perlakuan ** (detik)	**Pemulihan (detik)**		
			Sadar ***	Pulih ****	Total
rata-rata	47,7	159,39	36,3	86,1	110,4

(*waktu dari keadaan sadar sampai hilang kesadaran. **mulai dari dikeluarkan dari larutan anestesi sampai dimasukkan kembali ke air. ***pada saat mulai menunjukkan pergerakan. ****berenang normal)

Data anestesi ini diurutkan dari awal pembuatan larutan tricaine dan urutan ikan yang masuk kedalam larutan. Dari hasil penelitian ini didapatkan waktu rata-rata yang dibutuhkan ikan dari keadaan sadar hingga teranestesi adalah selama 47,7 detik. Waktu pemulihan tidak dapat ditarik kesimpulan yang definit namun dapat dikatakan bahwa waktu perlakuan dapat berpengaruh terhadap total waktu pemulihan akhir yang dibutuhkan. Perlakuan yang ideal dilakukan dalam waktu 3-8 menit sebelum ikan dimasukkan kembali direndam kedalam air kembali. Tidak ada perbedaan yang signifikan dari pengamatan tingkah laku ikan pada larutan tricaine dengan volume 50 ml dan 100 ml, hanya saja pada volume 100 ml ikan lebih bebas bergerak sebelum akhirnya teranestesi.

Penggunaan anestesi tricaine dengan dosis 0,168 mg/ml ini tidak dapat dipaparkan ke ikan setiap hari, idealnya bisa dalam rentang waktu 7 hari setelah paparan pertama. Sehingga, perlu dilakukannya optimasi larutan tricaine dosis lebih rendah untuk penelitian yang membutuhkan pengamatan setiap hari. Adanya respon tingkat stres ikan ketika direndam kedalam larutan anestesi dapat mempengaruhi kondisi ikan. Selama proses anestesi tidak jarang ikan mengalami pendarahan pada tubuhnya lebih tepatnya di area dekat kepala. Didukung dari hasil penelitian terdahulu yang menyebutkan bahwa pendarahan pada insang dapat mudah terjadi. Hal ini disebabkan karena adanya respon stress asam atau asidosis karena induksi anestesi, perubahan osmolaritas plasma ikan, dan peningkatan tekanan darah. Tricaine MS-222 dapat menjadi netral dengan perendaman kedalam larutan natrium bikarbonat atau natrium hidroksida (Harper and Lawrence, 2011). Adapun efek samping lain dari pemaparan MS-222 adalah kerja jantung dapat menurun sehingga dapat menyebabkan kematian pada ikan. Pemberian isofluran dan MS-222 pada

ikan zebra mampu menurunkan denyut jantung kembali normal, serta mampu memperpanjang waktu anestesi dan mempersingkat waktu pemulihan (Huang, *et al.*, 2010).

Faktor lain yang dapat mempengaruhi efek tricaine adalah penyimpanan. Tricaine umumnya disimpan disuhu ruang menggunakan gelas beaker dan ditutup dengan *alumunium foil*. Selama percobaan anestesi dapat digunakan selama 2 minggu. Didukung oleh penelitian sebelumnya terkait stabilitas dari larutan tricaine yang telah disimpan selama 4-6 bulan pada suhu 4°C dan -20°C dengan larutan yang masih baru ternyata tidak ada perbedaan yang signifikan secara klinis pada ikan zebra (Katz, *et* al., 2020). Penggunaan larutan tricaine sebagai anestesi idealnya tidak lebih dari 15 ikan karena dapat mempengaruhi respon ikan terhadap tricaine, waktu anestesi semakin lama, dan waktu total pemulihan juga semakin lama. Sehingga perlu dilakukan pergantian larutan tricaine agar anestesi kembali optimal.

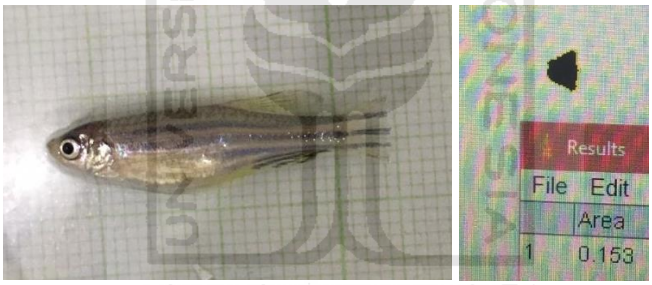
4.3 Proses Regenerasi Sirip Kaudal Ikan Zebra

Pada penelitian ini hasil pengamatan sirip kaudal ikan zebra sebelum amputasi tidak ada kecacatan pada ruas tulang ekornya. Pemotongan dilakukan dibelakang percabangan dengan rata-rata daerah yang hilang yaitu 0,181±0,051. Setelah proses pemotongan tidak jarang ikan mengalami pendarahan pada bagian ekornya, namun pendarahan ini hilang setelah 24 jam pasca amputasi. Ditemukan adanya perubahan warna di bagian yang dekat dengan pemotongan. Perubahan warna ini terjadi pada hari ke-1 pasca amputasi sampai hari ke-3 diikuti dengan pertambahan bentuk sirip. Setelah hari ke-3 sirip mengalami pemanjangan dan perlahan warna yang berbeda tersebut mulai menghilang pada daerah proksimal dekat dengan tubuh. Pengamatan yang dilakukan pada hari ke-14 setelah pemotongan ekor percabangan dan ruas-ruas terlihat jelas dan hampir sempurna seperti awal. Namun, adanya ruas yang terlihat tidak rata mengikuti ruas semula (Gambar 4C). Menurut penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya perubahan warna berhubungan dengan pertumbuhan melanosit pola pigmen. Penelitian lain menyebutkan, garis keputihan yang muncul bertujuan untuk menutupi bagian amputasi dapat terjadi pada hari pertama sampai hari ke-5 jaringan putih ini akan

bertahan di daerah dekat dengan pertumbuhan, sedangkan daerah lain akan melakukan perbaikan kembali dan memperoleh pigmentasi (Pfefferli, *et al.*, 2015). Ketika sirip mulai tumbuh terjadi fase proliferasi yang akan memperpanjang organ. Perpanjangan struktur sirip akan terjadi pada setelah hari ke-3 sampai hari ke-8. Dilanjutkan dengan mulai terjadi pembentukan ruas pada hari ke-9 sampai dengan hari ke 11 (Sari, *et al*., 2016).



(a)



(b)



(c)

Gambar 4. 1 Pengamatan sirip kaudal. (a) sebelum amputasi, (b) setelah amputasi, (c) setelah 14 hari, diamati dibawah mikroskop stereo Sdibantu dengan aplikasi Image Raster ™

Penelitian lain menyebutkan bahwa pengamatan pada hari ke-13 sampai 14 ruas-ruas sudah mencapai bagian dekat dengan daerah ujung ekor (Sari, *et al*., 2016). Adanya bentuk ruas yang tidak sama seperti semula disebabkan karena ruas

daerah regenerasi tumbuh dengan diameter yang lebih kecil dibandingkan ruas daerah yang tidak terpotong. Regenerasi alami pada sirip ikan zebra karena ditemukan adanya beberapa ikatan gen dan protein yang memiliki mekanisme sebagai komunikasi sel dan pertumbuhan jaringan (Quoseena, *et al*., 2020).

Tabel 4. 2 Luas area sirip.

Subjek	Sebelum amputasi (cm^2)	Setelah amputasi (cm^2)	
		0 jam	14 hari
1	0,31	0,15	0,22
2	0,38	0,17	0,24
3	0,28	0,13	0,19
4	0,30	0,17	0,20
5	0,35	0,15	0,25
6	0,45	0,17	0,30
7	0,28	0,15	0,17
rerata	0,34	0,16	0,23
sd	0,06	0,02	0,04

Pada penelitian ini terdapat 3 ekor ikan yang mati pada hari ke-3 dan hari ke-7, sehingga dimasukkan kedalam kriteria eksklusi atau dikeluarkan dari kelompok penelitian. Keterbatasan penelitian ini ialah tidak dapat menyimpulkan penyebab dari kematian ikan karena tidak dilakukan analisis lebih lanjut terkait hal tersebut. Kemungkinan adanya faktor-faktor lain penyebab kematian ikan karena kondisi fisiologis dari masing-masing ikan. Menurut OECD 203 terkait jumlah dan penanganan hewan uji dalam percobaan dapat digunakan minimal 7 ekor ikan (OECD, 2019). Sehingga dari 7 ekor ikan zebra tersebut dapat dilakukan pengujian data perbandingan luas area menggunakan uji statistik *Wilcoxon Test* dan didapatkan nilai $P < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan adanya perbedaan yang signifikan antara luas area 0 jam setelah amputasi dan luas area 14 hari setelah amputasi.

Tabel 4. 3 Hasil perhitungan %regenerasi sirip kaudal.

Subjek	%Regenerasi
1	43,51
2	15,71
3	22,08
4	43,88
5	25,25
6	8,33
7	27,41
rata-rata	26,60
SD	13,29

Didapatkan nilai rata-rata % regenerasi dari tujuh ikan yaitu sebesar 26,60 ± 13,29. Kelemahan dari penelitian ini adalah belum dilakukannya konsistensi terhadap ukuran panjang ekor yang dipotong dan tidak semua hewan uji mengalami tahapan yang sama setelah fase penyembuhan luka sehingga memunculkan adanya variasi dari persen regenerasi. Didukung oleh penelitian terdahulu, adanya penghambatan salah satu jalur sinyal pembetukan epitel luka dan terjadi hambatan komunikasi yang dapat mempengaruhi pembentukan blastema (Pfefferli, *et al.*, 2015). Selain itu, faktor suhu juga dapat berpengaruh. Pemeliharaan ikan pada penelitian ini yaitu pada suhu 28,5℃. Menurut penelitian yang telah dilakukan sebelumnya yang membandingkan suhu pemeliharaan ikan dalam suhu 33℃ terbukti lebih cepat mengalami pembentukan blastema dibandingkan pada suhu 25℃ (Sari, *et al*., 2016). Hal ini menjadi cukup penting karena kehadiran blastema akan mempengaruhi pembentukan jaringan pada permukaan bekas luka.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Metode pemotongan sirip kaudal terbukti menunjukkan adanya regenerasi penyembuhan luka di hari ke-14 pada suhu pemeliharaan 28,5℃ dengan rata-rata luas regenerasi sirip kaudal dari tujuh ekor ikan yaitu sebesar 26,6%. Perendaman ikan pada larutan anestesi menggunakan tricaine dengan konsentrasi 0,168 mg/ml terbukti memberikan efek yang baik.

5.2 Saran

1. Perlu adanya penelitian percobaan terhadap variasi suhu yang berpengaruh terhadap regenerasi
2. Perlu adanya penelitian mengenai pengaruh faktor stress akibat anestesi terhadap lama waktu regenerasi
3. Perlu adanya penelitian lanjutan yang mengkaji terkait keabnormalan regenerasi sirip kaudal ikan zebra
4. Perlu dilakukannya konsistensi ukuran panjang pemotongan sirip kaudal ikan zebra

DAFTAR PUSTAKA

Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., Mayden R. L., 2013. Natural History of Zebra Fish (*Danio rerio*) in India. *Zebra fish*. 10 (1): 1-14. doi: 10.1089/zeb.2012.0803. PMID 23590398

Azevedo, A.S., Grotek, B., Jacinto, A., Weidinger, G., Saúde, L., 2011. The Regenerative Capacity of the Zebrafish Caudal Fin Is Not Affected by Repeated Amputations. *PLoS ONE 6*, e22820. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022820

Brandão, A. S. D. S. P. (2019). Mechanisms of osteoblast reprogramming and differentiation during zebrafish caudal fin regeneration.

Cardeira, J., Gavaia, P. J., Fernández, I., Cengiz, I. F., Moreira-Silva, J., Oliveira, J. M., ... & Laizé, V. (2016). Quantitative assessment of the regenerative and mineralogenic performances of the zebrafish caudal fin. *Scientific reports*, *6*, 39191.

Driscoll, P. (2014). Wound Prevalence and Wound Management : 2012-2020. Opgeroepen op 05 27, 2017, van mediligence.com : http://blog.mediligence.com/2013/01/29/w ound-prevalence-and-wound-management2012-2020/

Eming, S.A., Hammerschmidt, M., Krieg, T., Roers, A., 2009. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. Semin. Cell Dev. Biol. 20, 517–527

Gemberling, M. *et al*., The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet.* 29, 611–620 (2013)

Goldshmith, Y., Sztal, T.E., Jusuf, P.R., Hall, T.E., Nguyen-Chi, M., Currie, P.D., 2012. Fgf-Dependent Glial Cell Bridger Facilitate Spinal Cord Regeneration In Zebrafish. *The Journal of Neuroscience*. 32 (22): 7477-92. doi:10.1523/JNEUROSCI.0758-12.2012.PMID22649227

Gonzalez, A. C., Costa, T. F., Andrade, Z. A., & Medrado, A. R. (2016). Wound healing - A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*, *91*(5), 614–620. doi:10.1590/abd1806-4841.20164741

Harper C, Lawrence C. 2011. The Laboratory Zebrafi sh. Boca Raton: CRC Press.

Huang W, Hsieh Y, Chen I, Wang C. 2010. Combined use of MS-222 (tricaine) and isofl urane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafi sh. Zebrafi sh.

Iza, N. (2010). *Ikan gatul (Poecilia sp.) sebagai kandidat hewan model: proses regenarasi sirip kaudal* (Doctoral dissertation, Universitas Negeri Malang).

Kawasumi, A., Sagawa, N., Hayashi, S., Yokoyama, H., Tamura, K., 2012. Wound Healing in Mammals and Amphibians: Toward Limb Regeneration in Mammals. *Current topics in microbiology and immunologi*. pp. 33–49. https://doi.org/10.1007/82_2012_305

Katz, E. M., Chu, D. K., Casey, K. M., Jampachaisri, K., Felt, S. A., & Pacharinsak, C. (2020). The Stability and Efficacy of Tricaine Methanesulfonate (MS222) Solution After Long-Term Storage. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*.

Kimball, J. W. 1993. *Biologi Umum*. Erlangga. Jakarta.

Leung, L. S., Luo, T., Ma, J., & Herrick, I. (2014). Brain areas that influence general anesthesia. *Progress in neurobiology*, *122*, 24-44.

Lush, M.E., Piotrowski, T., 2014. "Sensory Hair Cell Regeneration In The Zebrafish Lateralline". *Developmental Dynamics*. 243 (10): 1187-202. doi:10.1002/dvdy.24167. PMC 4177345. PMID 25045019

Mathew, L.K., Sengupta, S., Franzosa, J.A., Perry, J., La Du, J., Andreasen, E.A., Tanguay, R.L., 2009a. Comparative expression profiling reveals an essential role for raldh2 in epimorphic regeneration. *J. Biol. Chem*. 284, 33642–33653

Mathew, L.K., Simonich, M.T., Tanguay, R.L., 2009b. AHR-dependent misregulation ofWnt signaling disrupts tissue regeneration. *Biochem. Pharmacol*. 77, 498–507

Matthews, M., & Varga, Z. M. (2012). Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR journal*, *53*(2), 192-204.

OECD, 2019. *Fish, Acute Toxicity Testing*, in: 203.

Olmeda, J., F. Vanquez. 2011. Thermal Biology of Zebrafish (Danio rerio). *Journal Of Thermal Biology*. Elsevier

Palagummi, S., Harbison, S.A., Fleming, R., 2014. A time-course analysis of mRNA expression during injury healing in human dermal injuries. *Int J Legal Med* 128: 403-414

Pathan, M. A., Chaudhari, A., & Krishna, G. (2019). Inbred zebrafish lines: A genetic repository for zebrafish researchers. *Indian J. Genet*, *79*(1 Suppl 150), 159.

Petrie, T.A., Strand, N.S., Yang, C.T., Rabinowitz, J.S., Moon, R.T., 2014. Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* 141, 2581–2591

Pfefferli, C., & Jaźwińska, A. (2015). The art of fin regeneration in zebrafish. *Regeneration*, *2*(2), 72-83.

Quoseena, M., Vuppaladadium, S., Hussain, S., Banu, S., Bharathi, S., & Idris, M. M. (2020). Functional role of annexins in zebrafish caudal fin regeneration - A gene knockdown approach in regenerating tissue. *Biochimie*, *175*, 125–131. Advance online publication. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.014

Reinke, J.M., Sorg, H., 2012. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 49: 35-43

Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS). 2018. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementrian RI tahun 2018. http://www.kesmas.kemkes.go.id/assets/upload/dir_519d41d8cd98f00/files/Hasil-riskesdas-2018_1274.pdf

Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC bioinformatics*, *18*(1), 529.

Santorielli C, Zon LI. 2012. Hooked! Modeling Human Disease in Zebrafish. *The Journal of Clinical Investigation*

Santoso, S. (2010). *Statistik parametrik*. Elex Media Komputindo.

Sari, N. K., Listyorini, D., & Gofur, A. (2016). Proses regenerasi sirip ekor pada ikan zebra. *Edubiotik: Jurnal Pendidikan, Biologi dan Terapan*, *1*(01), 25-29.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 671-675.

Sfakianakis, D. G., Leris, I., Laggis, A., & Kentouri, M. (2011). The effect of rearing temperature on body shape and meristic characters in zebrafish (Danio rerio) juveniles. *Environmental Biology of Fishes*, *92*(2), 197.

Spinello, C., Yang, Y., Macrì, S., Porfiri, M., 2019. Zebrafish Adjust Their Behavior in Response to an Interactive Robotic Predator. Front. Robot. AI 6, 38. https://doi.org/10.3389/frobt.2019.00038

Stewart, S., Tsun, Z.Y., Izpisua Belmonte, J.C., 2009. " A Histone demethylase is necessary for regeneration in zebrafish". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106(47): 19889-94. Bibcode:2009PNAS..10619889S. doi:10,1073/pnas.0904132106. JSTOR25593294. PMC 2785262. PMID 19897725

Sun, L., Gu, L., Tan, H., Liu, P., Gao, G., Tian, L., Chen, H., Lu, T., Qian, H., Fu, Z., Pan, X., 2019. Effects of 17α-ethinylestradiol on caudal fin regeneration in zebrafish larvae. *Sci. Total Environ*. 653, 10–22. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.275

Tarasco, M., Cordelières, F. P., Cancela, M. L., & Laizé, V. (2020). ZFBONE: An ImageJ toolset for semi-automatic analysis of zebrafish bone structures. *Bone*, 115480.

Tu, S., & Johnson, S. L. (2011). Fate restriction in the growing and regenerating zebrafish fin. *Developmental cell*, *20*(5), 725–732. doi:10.1016/j.devcel.2011.04.013

Utami, N. (2018). Zebrafish (Danio rerio) Sebagai Hewan Model Diabetes Mellitus. *Biotrends*, *9*(1), 15-19.

Vishwanath, W. (2010). "Danio rerio". *The IUCN Red List of Threatened Species*. **2010**:e.T166487A6219667. doi:10.2305/IUCN.UK.2010-4.RLTS.T166487A6219667.en. Retrieved 15 January 2018

Wilson JM, Bunte RM, Carty AJ. 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafi sh (Danio rerio). JAALAS 48:785-789.

Yoshinari, N., Kawakami, A., 2011. Mature and juvenile tissue models of regeneration in small fish species. *Biol. Bull*. 221, 62–78

LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Identifikasi Ikan Zebra (Danio rerio)

LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)
Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911
Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612
Website : www.biologi.lipi.go.id

Cibinong, 09 November 2017

Nomor : B-3853/IPH.1./KS.02.03/XI/2017
Lamp. :
Hal : Hasil identifikasi fauna

Kepada Yth.
Dr. Farida Hayati, M.Si, Apt
Universitas Islam Indonesia
Fakultas MIPA
Kampus UII Terpadu Jl. Kaliurangn
Yogyakarta 55584 Kotak Pos 75

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil verifikasi fauna yang telah dilaksanakan oleh Sdr. Gema Wahyu Dewantoro, M.Si, staf peneliti Laboratorium Ichtiologi Bidang Zoologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, dengan hasil terlampir.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

An. Kepala Pusat Penelitian Biologi - LIPI
Kepala Bidang Zoologi,

Dr. Hari Sutrisno
NIP. 196606051994031009

HASIL IDENTIFIKASI IKAN

Nama ilmiah : *Danio rerio* (Hamilton, 1822)
Lokasi : -
Jumlah : 5 ekor

Klasifikasi berdasar Nelson (2006):

Ordo : Cypriniformes
Familia : Cyprinidae
Genus : *Danio*
Species : *Danio rerio*
Destribusi : Pakistan, India, Bangladesh, Nepal, Myanmar, Bhutan

Deskripsi:

- Tubuh ikan relatif ramping memanjang dengan panjang standar 23,5 – 25,7 mm.
- Mata besar, muhut menghadap ke atas dan terdapat tonjolan kecil di ujung rahang bawah (Gambar 1).



(Gambar 1. X menunjukkan tonjolan kecil)

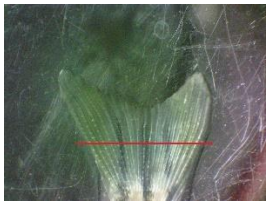
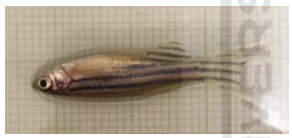
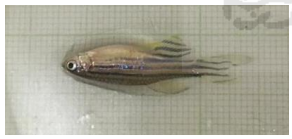
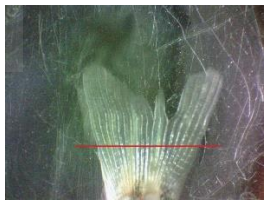
- Mempunyai 2 pasang sungut, dimana sungut rahang atas mencapai operkulum (tutup insang).
- Pada sisi tubuhnya terdapat 5 buah garis horisontal yang mengarah ke sirip ekor.
- Sirip analnya berceratk garis-garis.
- Jumlah jari-jari sirip punggung 8 buah jari-jari.
- Jumlah jari-jari sirip anal yaitu 13-14 buah jari-jari lemah bercabang.
- Sisik sebelum sirip punggung 13-14 buah sisik.
- Sisik pada linea lateralis 32-34 buah sisik.

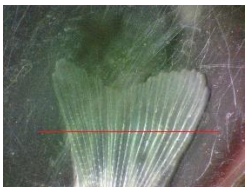
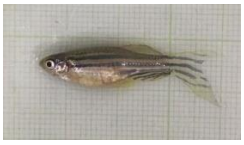
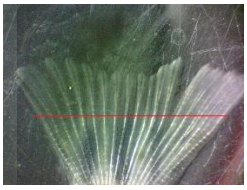
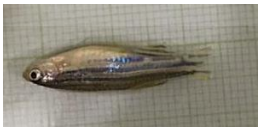
Sumber :

Fishbase. 2017. Danio rerio. http://fishbase.org. Diakses tanggal 1 November 2017.

Nelson, J.S. 2006. Fishes of The World. John Wiley and Sons, Inc. 601p.

Lampiran 2 Dokumentasi Perubahan Sirip Kaudal

Subjek	Sebelum	Sesudah	Setelah 14 hari
1			
2			
3			
4			
5			Mati dihari ke-7

6			
7			Mati di hari ke-7
8			
9			Mati dihari ke-3
10			

Lampiran 3 Hasil Pengujian Waktu Anestesi

Subjek	Anestesi (detik)	Perlakuan (detik)	**Pemulihan (detik)**		
			Sadar	Pulih	Total
1	56	180	60	99	159
2	55	174	18	72	90
3	45	90	34	94	128
4	52	120,9	53	100	93
5	34	133	34	100	134
6	48	148	36	91	127
7	53	316	38	107	145
8	42	91	22	46	68
9	45	238	41	53	94
10	47	103	27	99	66
rata-rata	47,7	159,39	36,3	86,1	110,4
SD	6,70	71,74	12,92	21,46	32,42

Lampiran 4 Hasil Pengukuran Luas Area Sirip Kaudal

Subjek	Sebelum amputasi (cm^2)	Setelah amputasi (cm^2)		Daerah yang hilang (cm^2)	Daerah regenerasi (cm^2)	% regenerasi
		0 jam	14 hari			
1	0,31	0,15	0,22	0,15	0,07	43,51
2	0,38	0,17	0,24	0,21	0,03	15,71
3	0,28	0,13	0,19	0,15	0,03	22,08
4	0,30	0,17	0,20	0,14	0,06	43,89
5	0,35	0,15	0,25	0,20	0,05	25,25
6	0,45	0,17	0,30	0,28	0,02	8,33
7	0,28	0,15	0,17	0,14	0,04	27,41
rata-rata	0,34	0,16	0,23	0,18	0,04	26,60
sd	0,06	0,02	0,04	0,05	0,02	13,29

Lampiran 5 Hasil Pengamatan Sirip

Hari ke-	Hasil Pengamatan
1,2,3	Ditemukan adanya perubahan warna di bagian distal.
4-13	Perubahan warna masih ada namun semakin mengikuti warna dari sirip asli. Terjadi pemanjangan sirip terus menerus, ruas-ruas ikut memanjang.
14	Percabangan dan ruas-ruas terlihat jelas dan hampir sempurna seperti awal. Namun, ditemukan ruas yang terlihat tidak rata mengikuti ruas semula pada semua subjek uji.

Lampiran 6 Hasil Pengujian Statistik Normalitas Luas Area Regenerasi sirip kaudal Ikan Zebra Menggunakan uji Saphiro-Wilk

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
0 jam pasca amputasi	.184	7	.200*	.945	7	.684
14 hari pasca amputasi	.147	7	.200*	.965	7	.860

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Descriptives

			Statistic	Std. Error
0 jam pasca amputasi	Mean		.15486	.005548
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.14128	
		Upper Bound	.16843	
	5% Trimmed Mean		.15529	
	Median		.15300	
	Variance		.000	
	Std. Deviation		.014679	
	Minimum		.130	
	Maximum		.172	
	Range		.042	
	Interquartile Range		.022	
	Skewness		-.577	.794
	Kurtosis		-.221	1.587
14 hari pasca amputasi	Mean		.22514	.016477
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.18482	
		Upper Bound	.26546	
	5% Trimmed Mean		.22399	
	Median		.22100	
	Variance		.002	
	Std. Deviation		.043594	
	Minimum		.172	
	Maximum		.299	
	Range		.127	
	Interquartile Range		.065	
	Skewness		.600	.794
	Kurtosis		-.136	1.587

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
0 jam pasca amputasi	7	87.5%	1	12.5%	8	100.0%
14 hari pasca amputasi	7	87.5%	1	12.5%	8	100.0%

Lampiran 7 Hasil Pengujian Statistik Homogenitas Luas Area Regenerasi sirip kaudal Ikan Zebra

Test of Homogeneity of Variances

Hasil regenerasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.979	1	12	.031

Hasil analisis statistik menggunakan *Saphiro-Wilk Test* menunjukkan nilai **P > 0,05** ini menunjukkan bahwa data **terdiistribusi secara normal** dan hasil uji homogenitas menunjukkan **P < 0,05** yang berarti data **tidak homogen.** Sehingga pengujian dilanjutkan menggunakan uji non parametrik.

Lampiran 8 Hasil Pengujian Statistik Wilcoxon Test antara luas area sesudah amputasi dan luas area 14 hari setelah amputasi

Wilcoxon Signed Ranks

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
14 hari pasca amputasi - 0 jam pasca amputasi	Negative Ranks	0[a]	.00	.00
	Positive Ranks	7[b]	4.00	28.00
	Ties	0[c]		
	Total	7		

a. 14 hari pasca amputasi < 0 jam pasca amputasi

b. 14 hari pasca amputasi > 0 jam pasca amputasi

c. 14 hari pasca amputasi = 0 jam pasca amputasi

Test Statistics[b]

	14 hari pasca amputasi - 0 jam pasca amputasi
Z	-2.366[a]
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018

a. Based on negative ranks.

b. Wilcoxon Signed Ranks Test

H0 : Terdapat perbedaan yang signifikan antara rata-rata luas area sirip 0 jam setelah amputasi dengan 14 hari setelah amputasi

H1 : Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara rata-rata luas area sirip 0 jam setelah amputasi dengan 14 hari setelah amputasi

Pengambilan Keputusan :

Jika signifikansi (P) < 0,05 maka H0 diterima

Jika signifikansi (P) > 0,05 maka H0 ditolak

Keputusan :

Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan *Wilcoxon Test* dapat diambil kesimpulan **P < 0,05** maka **H_0 diterima**, sehingga **antara luas area 0 jam setelah amputasi dan luas area 14 hari setelah amputasi terdapat perbedaan yang signifikan.**