

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *randomized control group post test design* untuk mengetahui pengaruh pemberian Genistein terhadap proses vaskulo-angiogenesis embrio ayam umur 48 jam. Pada manusia, kehamilan usia 24 hari adalah saat sistem pembuluh darah sudah terbentuk dan jantung mulai memompa darah sebagai tanda awal berfungsinya sistem kardiovaskuler, oleh karena itu, embrio ayam diberi perlakuan dan diinkubasi selama 48 jam, sebanding dengan umur kehamilan manusia 24 hari (O'Rahilly, 1979; O'Rahilly and Muller, 1987).

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa embrio ayam baik digunakan sebagai model pembelajaran perkembangan hematopoiesis dan morfogenesis serta abnormalitasnya ( Stern, 2004; Sheng, 2010 ), dari segi harga, embrio ayam lebih murah dibandingkan dengan beberapa hewan coba lainnya. Dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah dosis 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, dan 40 $\mu$ M. Hal ini disebabkan karena beberapa penelitian sebelumnya, misalnya pada sel kanker payudara *in vitro*, Genistein mengganggu pembentukan morfologi sel dengan *dose-dependent manner* pada dosis 0.1-50 $\mu$ M (Farina *et al.*, 2006), mulai menyebabkan malformasi embrio *zebra fish* pada dosis 25 $\mu$ M (Kim *et al.*, 2009), pada embrio tikus *in vitro*, Genistein mulai menghambat perkembangan embrio pada dosis 37 $\mu$ M (Xing *et al.*, 2010). Penggunaan dosis 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, dan 40 $\mu$ M pada penelitian ini disebabkan karena dosis tersebut berada dalam rentangan dosis dari penelitian-penelitian sebelumnya dengan model coba lain.

## 4.2 Populasi dan Sampel

### 4.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan sebagai hewan coba adalah embrio ayam. Spesies ayam adalah *Gallus gallus* strain Cobb. Tahap perkembangan embrio ayam mengikuti tabel Hamburger dan Hamilton.

### 4.2.2 Sampel

Besar sampel penelitian ditentukan berdasarkan rumus Steell dan Torrie (1991).

$$N = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

- n = Besar sampel
- Z $\alpha$  = Harga standar  $\alpha$  0,05 (satu arah) = 1,65
- Z $\beta$  = Harga standar  $\beta$  = 0,84
- $\sigma$  = Standar deviasi
- d = Beda mean kelompok kontrol dan perlakuan

Dengan menganggap bahwa populasi berdistribusi normal dan perbedaan rata-rata antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mempunyai perbedaan (d) sebesar  $\sigma$  (1 standar deviasi) sehingga  $\sigma^2 / d^2 = 1$ , maka  $n = (Z\alpha + Z\beta)^2$ . Berdasarkan perhitungan rumus tersebut maka  $n = 6,2$  sehingga besar sampel minimal yang digunakan adalah 7 butir telur tetas untuk setiap kelompok.

## 4.3 Variabel Penelitian

### 4.3.1 Variabel Bebas

Paparan Genistein dosis 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, 40 $\mu$ M, dan injeksi NaCl 0.9% sebagai variabel kontrol.

### 4.3.2 Variabel Terikat

- *Survival rate* embrio ayam umur 48 jam
- Jantung embrio ayam umur 48 jam

- Jumlah somit embrio ayam umur 48 jam
- Ekspresi VEGFR-2 embrio ayam umur 48 jam

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Anatomi histologi, Laboratorium Biokimia, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Farmasi Universitas Brawijaya Malang, dilaksanakan dalam waktu 1 tahun ; terhitung Januari 2014.

#### 4.5 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian untuk perlakuan:

- Mesin penetas
- *Disposable syringe* 1 cc
- *Disposable syringe* 5cc
- *Falcon*
- Jarum suntik 1,5 inchi, 20G.
- Plester bulat kecil (Plesterin)
- handuk kering
- *Vinyltape*
- Spidol
- *Lancing device*

Instrumen penelitian untuk pengambilan bahan coba

- *Dissecting set*
- *Alcohol Swab*
- Tisu
- *Petri dish*
- *Ice tray* untuk fiksasi organ
- Bingkai kertas saring ukuran 1,4 X 1,4 cm



Instrumen penelitian untuk fiksasi bahan coba

- Formalin 10 %

Instrumen penelitian untuk Pengecatan Imunohistokimia

- Pipet tetes
- Objek glass
- PBS steril
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 %
- Methanol
- 0,25% triton-x100
- Buffer BSA
- Antibodi VEGF
- Anti- Rabbit
- SAHRP Kit
- Akuades steril
- DAB
- Buffer DAB
- Mayer
- Tap water
- Entellan



#### 4.6 Definisi Operasional

- Embrio ayam adalah embrio dalam telur ayam yang telah dibuahi pada stadium HH 10-12, yaitu 48 jam inkubasi.
- Paparan Genistein adalah pemberian Genistein *bioworld* secara *in ovo* melalui injeksi Genistein ke dalam kuning telur ayam tetas.

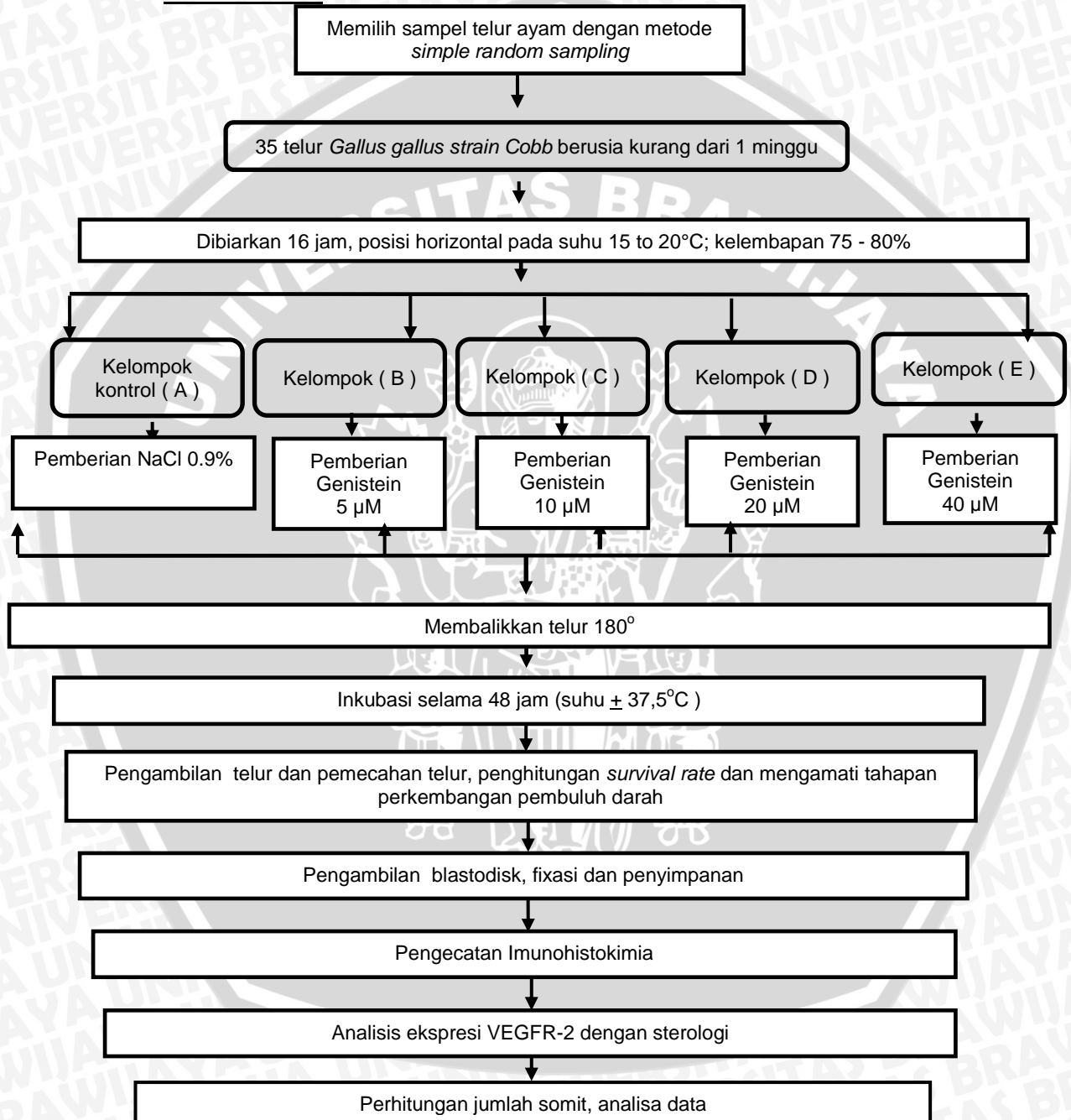
- c. Waktu pemaparan adalah waktu saat injeksi Genistein ke dalam telur ayam yang berusia kurang dari satu minggu dari waktu ditelurkan, dan dilanjutkan dengan penginkubasian telur selama 48 jam.
- d. *Survival rate* adalah persentase jumlah embrio yang hidup. Embrio yang hidup minimal ditandai dengan adanya sinus terminalis.
- e. Tahapan perembangan pembuluh darah adalah *blood islands*, kapiler, dan jantung, pada inkubasi 48 jam, embrio pada tahap jantung. *Blood islands* adalah pulau-pulau pembuluh darah yang terbentuk dari angioblas pada awal morfogenesis dan menjadi cikal bakal terbentuknya sistem vaskuler. Kapiler adalah kumpulan *blood islands* yang membentuk tabung dan terdapat sinus terminalis. Jantung adalah organ yang memompa darah mengalir kapiler. Tahapan perkembangan pembuluh darah dilihat secara langsung saat pemecahan cangkang telur, bisa dengan bantuan lup, tanpa menggunakan mikroskop.
- f. Somit adalah kumpulan segmen berbentuk seperti balok yang tersusun secara longitudinal, dilihat dan dihitung menggunakan mikroskop.
- g. Persentase area VEGFR-2 adalah jumlah reaksi (+) pada area embrio ayam yang mengekspresikan VEGFR-2 dibandingkan jumlah reaksi (+) pada total area embrio ayam, dikalikan 100%. Persentase area diamati setelah pengecatan imunohistokimia, dihitung dengan metode Stereologi (Howard, 1998).



Gambar 4.1 Kertas Mika untuk Stereologi. Kertas mika stereologi ditempelkan pada foto embrio ukuran 5R yang sudah diberi garis di sekeliling embrio

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian



#### 4.7.2 Pembagian Kelompok

Telur ayam yang telah dibuahi dibagi menjadi 1 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan, dengan distribusi sebagai berikut:

Kelompok A : Dengan NaCl 0.9% 200  $\mu$ L Sebagai kontrol negatif.

Kelompok B : Dengan perlakuan Genistein 5  $\mu$ M dalam NaCl 0.9%, 200 $\mu$ l

Kelompok C : Dengan perlakuan Genistein 10  $\mu$ M dalam NaCl 0.9%, 200 $\mu$ l

Kelompok D : Dengan perlakuan Genistein 20  $\mu$ M dalam NaCl 0.9%, 200 $\mu$ l

Kelompok E: Dengan perlakuan Genistein 40 $\mu$ M dalam NaCl 0.9%, 200 $\mu$ l

#### 4.7.3 Pra-perlakuan

Telur harus berusia kurang dari 1 minggu (dihitung dari hari saat ditelurkan). Semua telur disimpan dalam suhu ruang, diposisikan horizontal selama setidaknya 16 jam pada suhu 15 hingga 20°C; kelembapan 75 - 80% untuk memastikan posisi yolk berada di tengah. Inkubator juga disiapkan stabil pada suhu 37,5° – 38,5° C. (Fasenko, 2007).

#### 4.7.4 Perlakuan

Semua perlakuan dilakukan *in ovo* secara injeksi dengan menggunakan *disposable syringe* 1 cc hingga bagian tengah telur. Injeksi dilakukan pada ujung tumpul telur, dengan tidak merubah posisi sebelumnya. Sebelum injeksi, area injeksi diusap dengan tissue beralkohol sekali pakai (*alcohol swab disposable*). Setelah selesai injeksi, ditutup dengan *vinyltape*. Kemudian posisi telur dibalik 180° sesuai axisnya. Kemudian diinkubasi pada suhu 37,5° – 38,5° C selama 48 jam (Fasenko, 2007).

#### 4.7.5 Perlakuan dengan Genistein

Genistein dengan kisaran dosis 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M, dan 40 $\mu$ M. Genistein dilarutkan pada DMSO 1 mg/ml. Selanjutnya masing - masing dosis dilarutkan pada NaCl 0.9% 200  $\mu$ l dan larutan dimasukkan pada spuit 1 cc pada ruang kultur.

Dalam berbagai dosis tersebut. Genistein injeksikan pada yolc telur ayam. Sebagai kontrolnya diinjeksikan NaCl 0.9% 200  $\mu$ L.

#### 4.7.6 Inkubasi

Inkubasi telur ditempatkan pada inkubator suhu  $\pm 37,5^{\circ}\text{C}$  dengan kelembaban 60-70% selama 48 jam. Telur diletakkan pada posisi horizontal sesuai posisi setelah injeksi.

#### 4.7.7 Pengambilan Bahan Coba

Memecahkan cangkang telur dengan mengetukkan dasar telur pada bidang yang agak tajam, dengan tidak merubah posisi telur. Tuang telur dalam *dish* yang telah setengahnya diisi dengan Larutan *Natrium Clorida (NaCl)* 0,9%. Ambil gambar, letakkan bingkai kertas saring di atas blastodisk (embrio) sehingga nampak perlahan-lahan menjadi basah. Kemudian gunting *vitelline membrane* di sisi luar bingkai kertas. Angkat bingkai kertas saring, sehingga embrio ikut menempel pada lubang di bingkai kertas saring. Masukkan dalam larutan NaCl 0.9% yang lain dan goyang-goyangkan beberapa kali. Kemudian pindahkan lagi dalam larutan NaCl 0.9% yang lain dan goyang-goyangkan beberapa kali.

#### 4.7.8 Pengambilan Gambar

Pengambilan dilakukan dengan kamera digital sesaat setelah cangkang telur dibuka untuk memberikan gambaran terbaik dari embrio.

#### 4.7.9 Penyimpanan Bahan Coba

Embrio dimasukkan dalam formalin 10%. Embrio dapat disimpan selama satu bulan, dan siap untuk dicat. Pada penelitian ini fiksasi dilakukan selama satu minggu, kemudian dicat dalam hal ini dengan pengecatan Imunohistokimia.

#### 4.7.10 Pengecatan Imunohistokimia

Setelah proses fiksasi yang optimal, Slide preparat embrio ayam siap dicat dengan metode imunohistokimia. Pertama, Slide dicuci PBS steril 3x5 menit



dan dikeringkan dengan tisu. Menambahkan  $H_2O_2$  3 % dalam methanol inkubasi 15 sampai dengan 20 menit dilanjutkan dicuci dengan PBS steril 3 x 5 menit. Tahap *blocking unspesific protein*, diawali dengan penambahan 0,25% triton-x100 dalam *blocking buffer* BSA selama 1 jam pada suhu ruang serta dicuci PBS steril 3x5 menit. Tahap selanjutnya adalah menambahkan antibodi primer pada slide yaitu anti-VEGF dalam *blocking buffer* BSA. Kemudian Slide diinkubasi 2 jam dilanjutkan dengan dicuci PBS steril 3 x 5 menit.

Tahap selanjutnya adalah penambahan antibodi sekunder kit pada slide, kemudian inkubasi selama 60 menit pada suhu kamar. Setelah itu dicuci PBS steril 3 x 5 menit. Menambahkan SAHRP Kit pada slide embrio. Kemudian diinkubasi 40 menit pada suhu kamar dan dicuci dengan PBS steril 3x 5 menit lalu dicuci akuades steril 3 x 5 menit. Tahap selanjutnya adalah slide ditambahkan dengan ( DAB: Buffer DAB = 1:50 ) lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar. Kemudian slide dicuci dengan PBS steril 3 x5 menit. Slide embrio ditambahkan dengan ( Mayer : Tap water = 1 : 10 ), lalu diinkubasi 5 - 10 menit pada suhu kamar. Kemudian slide dicuci tap water steril 3 x 5 menit dan dikering anginkan. Tahap selanjutnya adalah proses *Mounting* dengan entellan. Terakhir, slide siap diamati di bawah mikroskop.

#### 4.7.11 Pengamatan Mikroskop

Sediaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran mikroskop 400x hingga 1000x.

#### 4.7.12 Pengamatan Morfologis Embrio

Setelah dilakukan pengambilan gambar secara digital, hasil foto kemudian dicetak dalam ukuran 5R, dan digunakan untuk pengamatan lebih lanjut. Untuk indikator pertumbuhan dan perkembangan embrio dalam penelitian ini dilakukan berdasarkan jumlah somit.

#### 4.7.13 Penghitungan Luas Area Embrio Total dan Luas Area VEGFR-2

Luas area pada embrio dihitung dengan kertas sterologi. Kertas sterologi ditempelkan pada foto yang sudah dicetak, lalu memulai penghitungan dengan menghitung tanda “*plus (+)*” dan harus melewati titik tengah tanda “*plus (+)*”.

Penghitungan persentase area didapatkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Luas area} = \Sigma \text{titik dengan reaksi (+)} \times a/p$$

$$\frac{a}{p} = \frac{(\text{jarak}^2 \text{ titik dalam grid})^2}{\text{perbesaran}^2}$$

$$\text{Luas embrio} = \Sigma \text{titik dalam embrio} \times (a/p)$$

$$\text{Persentase area} = \frac{\Sigma \text{titik dengan reaksi (+)}}{\Sigma \text{titik dalam embrio}} \times 100\%$$

#### 4.8 **Analisa Data**

Persentase area ekspresi VEGFR-2 dianalisis dengan perhitungan sterologi, lalu data dilihat signifikansinya dengan Uji Anova-One-Way (Dahlan, 2001). Jumlah somit diuji dengan Uji Anova-One-Way. *Survival rate* dan tahapan pembentukan pembuluh darah dianalisis dengan Uji Chi Square pada *software* analisis statistik.