

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan penelitian studi eksperimental in ovo menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* pada hewan coba embrio ayam. Di antara berbagai sistem hewan model yang dirancang untuk mempelajari mekanisme yang mendasari angiogenesis, model embrio ayam adalah alat yang berguna dalam menganalisis potensi angiogenik (Deryugina, 2008).

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.

4.2.2 Sampel

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

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

Keterangan :

n = Besar sampel

Z_α = Harga standar 0,05 (satu arah) = 1,65

Z_β = Harga standar = 0,84

= Standar deviasi

d = Beda mean kelompok kontrol dan perlakuan

Dengan menganggap bahwa populasi berdistribusi normal dan perbedaan mean antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mempunyai perbedaan (d) sebesar (1 standar deviasi) sehingga $\sigma^2 / d^2 = 1$, maka $n = (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2$.

ngan rumus tersebut maka $n = 6,2$ sehingga besar

sampel minimal yang digunakan adalah 7 butir telur tetas untuk setiap kelompok.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Anatomi Histologi, Laboratorium Biomedik, dan Laboratorium Farmasi Universitas Brawijaya Malang, dilaksanakan dalam waktu 3 bulan sejak Januari 2014.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Pemberian quercetin (Biorbyt) dengan berbagai dosis (0.025 L, 0.0375 L, dan 0.05 L / embrio)

4.4.2 Variabel Terikat

Survival rate, ekspresi VEGFR-2 dan morfologi embrio dalam jumlah somit

4.5 Definisi Operasional

- Embrio ayam* adalah embrio dalam telur ayam yang telah dibuahi pada stadium HH 11-12.
- Vaskulogenesis* adalah proses pembentukan pembuluh darah baru secara de novo, dari diferensiasi sel-sel endotel; dengan maupun tanpa migrasi angioblas.
- Angiogenesis* adalah pembentukan pembuluh darah mikro (*microvessel*) pada jaringan yang sebelumnya avaskular, dari pembuluh darah yang terbentuk atau sudah ada sebelumnya.
- Pemberian quercetin* (Biorbyt) secara *in ovo* melalui injeksi quercetin ke dalam *yolk sac* telur ayam tetas sebesar 0.025 L, 0.0375 L, dan 0.05 L / embrio.
- Waktu pemaparan* adalah waktu saat injeksi quercetin ke dalam telur ayam yang berusia kurang dari satu minggu dari waktu ditelurkan, dan dilanjutkan dengan penginkubasian telur selama 48 jam.

adalah embrio yang dapat bertahan hidup dibagi dengan

jumlah telur dalam tiap kelompok.

g. *Mati* adalah kriteria *survival rate* yang berarti tidak terbentuknya sinus terminalis / sirkulasi *yolk sac*

h. *Blood island* kriteria *survival rate* dan adalah fokus dari hemangioblas yang berdiferensiasi *in situ*, membentuk massa dalam longgar dari prekursor hematopoietik embrio dan lapisan luminal luar angioblas. Terlihat berupa bintik-bintik merah darah pada kuning telur yang belum membentuk kapiler.

i. *Hidup* adalah kriteria *survival rate* yang berarti telah terbentuk sinus terminalis dan atau sirkulasi sempurna hingga jantung

j. *Ekspresi VEGFR-2* dinyatakan dalam persentase area (area yang memberikan reaksi positif terhadap antibodi primer dengan pengecatan imunohistokimia)

k. *Morfologi* diwakilkan dengan jumlah somit pada embrio.

4.6 Instrumen Penelitian

Untuk perlakuan

- Mesin penetas
- *Disposable syringe* 1 cc dan 5 cc
- *Falcon*
- Jarum suntik 1,5 inchi, 20G.
- Plester bulat kecil (Plesterin)
- Alcohol Swab
- *Vinyltape* dan selotip kertas
- Spidol
- Lancet

- Dissecting set
- Tisu
- Petri dish
- Ice tray untuk fiksasi organ
- Bingkai kertas saring ukuran 1,8 X 1,8 cm

Untuk fiksasi bahan coba

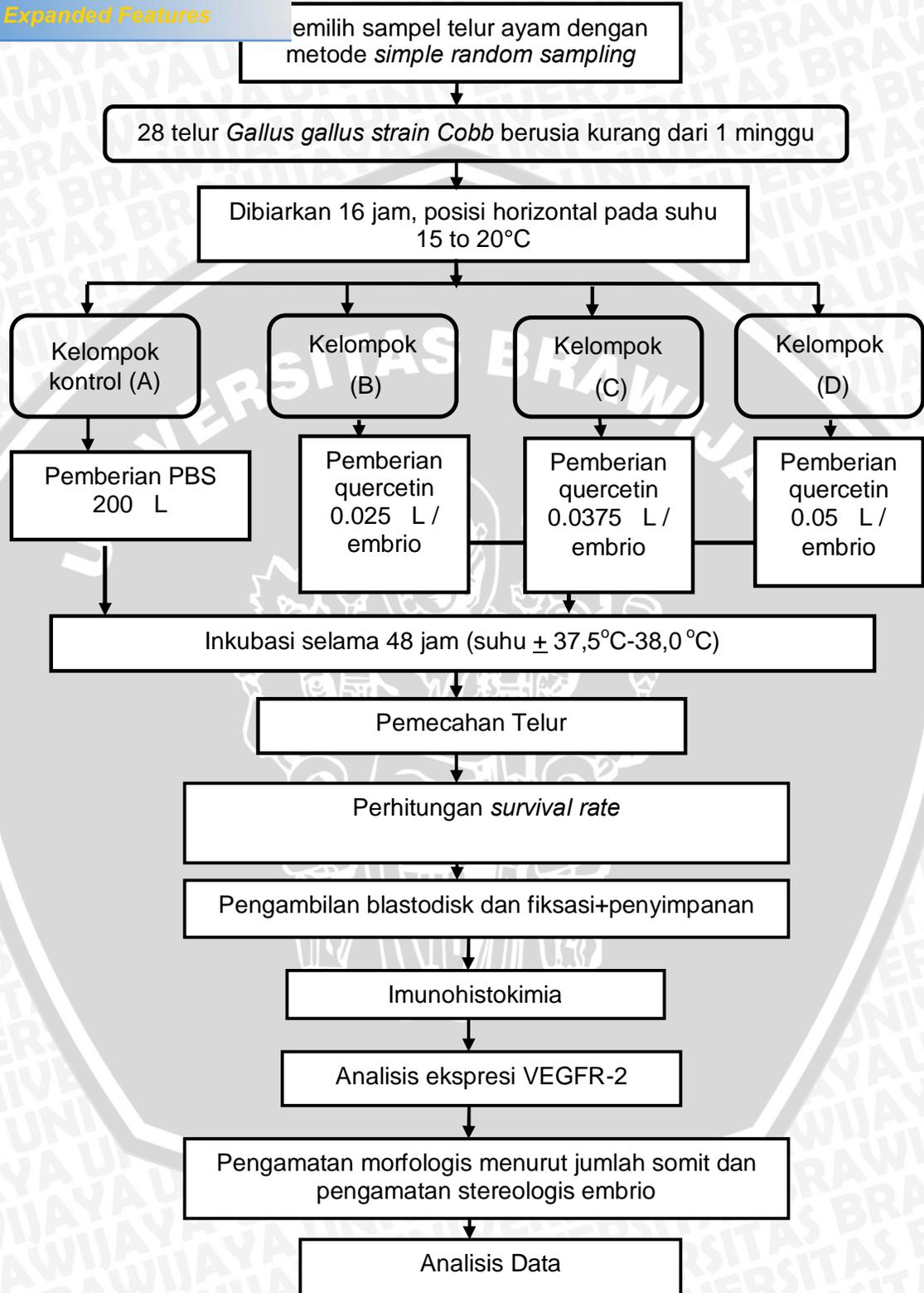
- Formalin 10 %

Untuk Pengecatan Imunohistokimia

- Pipet tetes
- Objek dan cover glass
- PBS steril
- H₂O₂ 3 % + Methanol
- 0,25% triton + 5% FBS
- Buffer BSA
- Antibodi VEGFR-2
- Anti- Rabbit
- SAHRP Kit
- Akuades steril
- DAB
- Buffer DAB
- Mayer
- Entellan

4.7 Metode Pengumpulan Data

4.7.1 Alur Penelitian



Gambar 4.1 : Bagan Alur Penelitian

Telur ayam yang telah dibuahi dibagi menjadi 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan (Kusumaningrum, 2012).

Distribusinya sebagai berikut:

Kelompok A : Hanya PBS 200 L Sebagai kontrol negatif.

Kelompok B : Dengan perlakuan quercetin 0.025 L / embrio

Kelompok C : Dengan perlakuan quercetin 0.0375 L / embrio

Kelompok D : Dengan perlakuan quercetin 0.05 L / embrio

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 untuk memastikan posisi yolk berada di tengah dan embrio berada di atas. 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 (diperkirakan dari panjang jarum dan panjang telur). Injeksi dilakukan pada ujung tumpul telur, dengan tidak merubah posisi sebelumnya. Sebelum injeksi, area injeksi ditutup dengan selotip kertas dan diusap dengan tissue beralkohol sekali pakai (*alcohol swab disposable*). Injeksi dilakukan dengan jarum mengarah $\pm 15^\circ$ ke arah bawah. Hal ini dilakukan agar jarum tidak mengenai embrio. Setelah selesai injeksi, ditutup dengan plesterin dan *vinyltape*. Sebelum dimasukkan ke inkubator, posisi telur dibalik 180° sesuai axisnya dan diinkubasi pada suhu 37,5° . 38,5° C selama 48 jam.

ercetin

Quercetin (Biorbyt) ditimbang dan dilarutkan pada 200 L DMSO. Selanjutnya masing - masing dosis dilarutkan pada PBS 4 ml dan larutan dimasukkan pada spuit 1 cc. Dengan berbagai dosis, quercetin diinjeksikan pada yolk telur ayam. Sebagai kontrolnya diinjeksikan PBS 200 L.

4.7.6 Inkubasi

Inkubasi telur ditempatkan pada inkubator suhu $\pm 37,5^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam. Telur diletakkan pada posisi horizontal sesuai posisi setelah injeksi untuk memastikan posisi embrio di atas.

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% (NS). 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 NS yang lain dan goyang-goyangkan beberapa kali. Kemudian pindahkan lagi dalam larutan NS 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.

Embrio dimasukkan dalam formalin 10%. Embrio dapat disimpan selama satu tahun, dan siap untuk dicat. Pada penelitian ini fiksasi dilakukan selama dua bulan, 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 menggunakan tisu. Menambahkan H_2O_2 3 % dalam methanol inkubasi 15 menit, dilanjutkan dicuci dengan PBS steril 3 x 5 menit. Tahap bloking unspesifik protein, diawali dengan penambahan PBS + 5% FBS + 0,25% triton selama 1 jam pada suhu ruang serta dicuci PBS steril 3x5 menit. Tahap selanjutnya adalah menambahkan antibodi primer pada slide yaitu anti-VEGFR-2 dalam blocking buffer PBS + 2% BSA (Ab = 1:100). Kemudian slide diinkubasi selama 2 jam dan 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 ruang. Setelah itu dicuci PBS steril 3 x 5 menit. Menambahkan SAHRP Kit pada slide embrio. Kemudian diinkubasi 40 menit pada suhu ruang dan dicuci dengan PBS steril 3x 5 menit lalu dibilas dengan akuades steril. Tahap selanjutnya adalah slide ditambahkan dengan (DAB: Buffer DAB = 1:50) lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Kemudian slide dicuci dengan akuades steril 3 x5 menit. Slide embrio ditambah dengan (Mayer : PBS = 1 : 10), lalu diinkubasi 1-2 menit pada suhu ruang. 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.

Sediaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran mikroskop 40x hingga 100x.

4.7.12 Pengamatan Morfologis Embrio

Setelah dilakukan pengambilan gambar secara digital, hasil foto kemudian dicetak dalam ukuran 5R, dan digunakan untuk pengamatan stereologis lebih lanjut. Dilakukan penghitungan jumlah somit pada embrio.

4.7.13 Perhitungan Stereologi Embrio

Eksresi VEGFR-2 dinyatakan dalam persentase area. Perhitungan dilakukan secara manual dengan pendekatan stereologis menggunakan *test grid*. Batas embrio ditentukan dahulu secara manual (dibatasi dengan spidol). Gambar 2D ditempatkan tumpang tindih dengan *test grid* yang tercetak di mika. Jumlah titik potong (*intersection*) dihitung pada area dalam embrio. Perhitungan dilakukan oleh 3 (tiga) orang observer. Jumlah titik potong adalah perhitungan manual jumlah titik potong (*intersection*) yang berada di area yang dimaksud (*area of interest*), pada gambar yang telah dipasang *test grid*. Hasil perhitungan titik kemudian dirata-rata untuk perhitungan lebih lanjut.

Dilakukan penghitungan persentase area dengan rumus

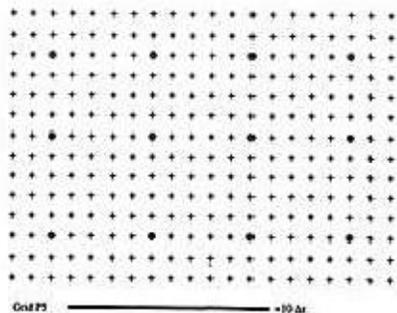
$$\text{Persentase area} = \frac{\text{n titik dengan reaksi positif} \times 100}{\text{n titik dalam embrio}}$$



PDF
Complete

Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



Gambar 4.2 Test Grid (Howard, 1998)

4.8 Pengolahan Data

Jika sebaran data normal dan varian data sama maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika tidak sama digunakan uji *Kruskal-Wallis*. Pada data somit juga dianalisis dengan *Cohen's d-type effect size*. *Survival rate* dianalisis dengan analisis *Fisher* (Dahlan, 2013). Analisis data menggunakan *software* analisis statistik.

Rumus *Cohen's d-type effect size* (Rahayu, 2011):

$$\frac{\text{Rerata kelompok kontrol} - \text{rerata kelompok perlakuan}}{\text{Standar deviasi kelompok kontrol}}$$