

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental murni dengan menggunakan rancangan *randomized control group post test design* untuk mengetahui pengaruh genistein terhadap proses perkembangan sistem saraf embrio ayam umur 48 jam.

Perkembangan awal pada embrio ayam memiliki banyak kemiripan dengan embrio manusia sehingga model ini banyak digunakan untuk mempelajari perkembangan embrio (Colas, 2001).

### 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 menggunakan 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 dengan berbagai dosis.

#### 4.3.2 Variabel Terikat

- *Neural tube*
- *Neuropore anterior*
- *Neuropore posterior*
- *Somit*

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Anatomi histologi dan laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya Malang, dilaksanakan dalam waktu 3 bulan terhitung September 2014.

### 4.5 Instrumen Penelitian

Untuk perlakuan

- *Mesin penetas*
- *Disposable syringe 1 cc*
- *Disposable syringe 5cc*
- *Falcon*

- Jarum suntik 1,5 inchi, 20G.
- Plester bulat kecil (Plesterin)
- *Vinyltape*
- Spidol
- *Lancing device*
- Alkohol swab 70%
- Alkohol 90 %

Untuk pengambilan bahan coba

- *Dissecting set*
- Tisu
- *Petri dish*
- *Ice tray* untuk fiksasi embrio
- Bingkai kertas saring ukuran 1,4 X 1,4 cm
- NaCl 0,9%

Untuk fiksasi bahan coba

- Formaline 10 %

Untuk Pewarnaan

- Cover glass dan obyek glass
- Pipet tetes
- Kotak preparat

#### 4.6 Definisi Operasional

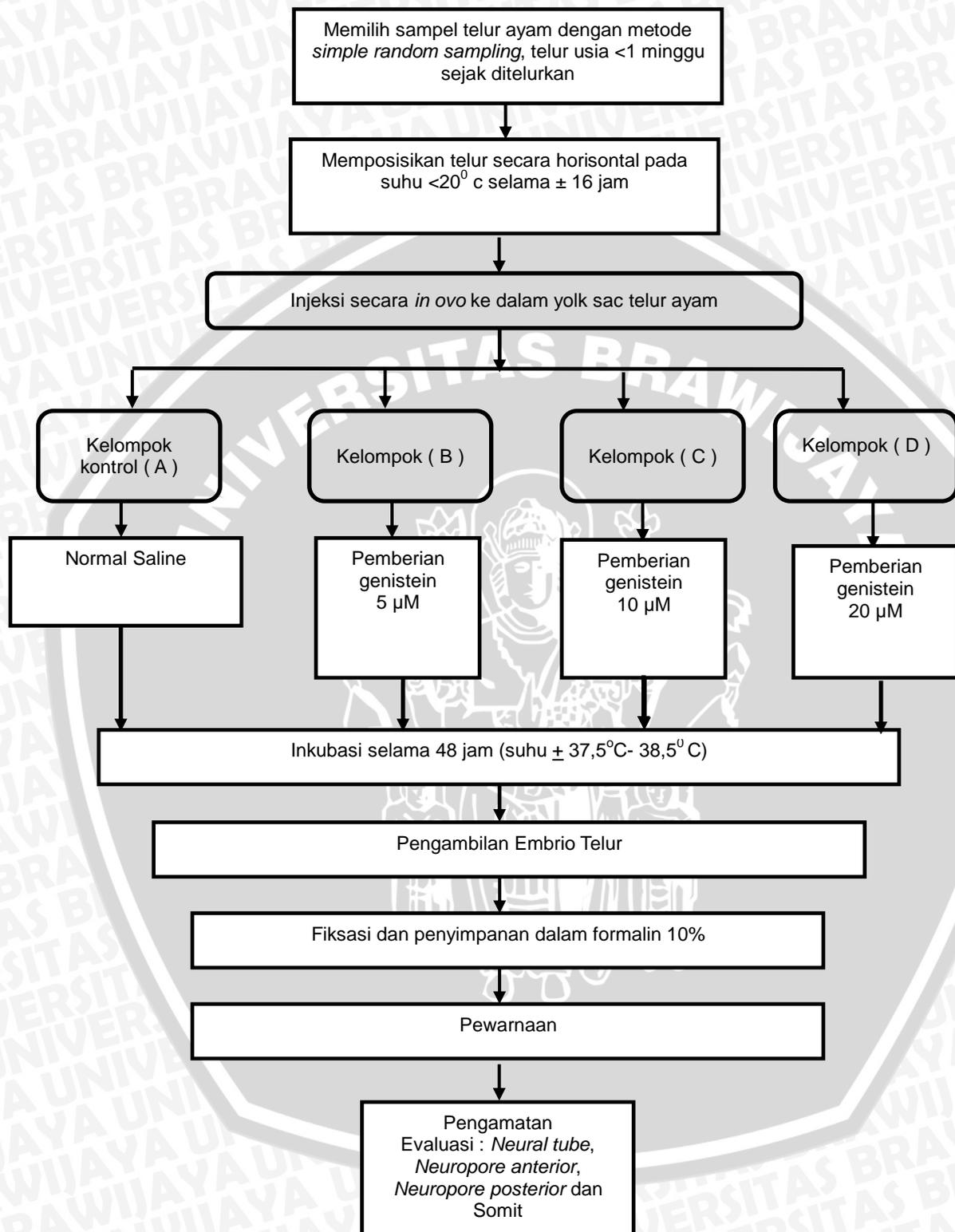
- a. Embrio ayam adalah embrio dalam telur ayam yang telah dibuahi pada stadium HH 11-12.
- b. Paparan genistein adalah pemberian genistein secara *in ovo* melalui injeksi genistein ke dalam yolk telur ayam.

- 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. Morfologi *neural tube* adalah *neural tube* yang diamati setelah telur diinkubasi selama 48 jam dan kemudian dilakukan pewarnaan dan dilihat morfologinya (panjang dan abnormalitas yang mungkin terjadi).
- e. *Neuropore anterior* adalah bagian cranial *neural tube* yang masih terbuka.
- f. *Neuropore posterior* adalah bagian caudal *neural tube* yang masih terbuka.

#### 4.7 Prosedur Penelitian



## 4.7.1 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian

#### 4.7.2 Pembagian Kelompok

Telur ayam yang telah dibuahi dibagi menjadi 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan.

Distribusinya sebagai berikut:

Kelompok A : Hanya *NS (Normal Saline)* 200  $\mu$ L sebagai kontrol negatif.

Kelompok B : Dengan perlakuan genistein 5  $\mu$ M dalam *NS*, 200  $\mu$ L

Kelompok C : Dengan perlakuan genistein 10  $\mu$ M dalam *NS*, 200  $\mu$ L

Kelompok D : Dengan perlakuan genistein 20  $\mu$ M dalam *NS*, 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; 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.

#### 4.7.5 Perlakuan dengan Genistein

Genistein 10 mg dilarutkan dalam 1 mL DMSO kemudian dilarutkan dalam *NS* untuk memperoleh konsentrasi 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M dan 20  $\mu$ M. Masing-

masing dosis dimasukkan dalam spuit 1 cc. Dalam berbagai dosis tersebut, genistein diinjeksikan pada *yolk* telur ayam. Sebagai kontrolnya diinjeksikan NS 200 uL.

#### 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.

#### 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.

#### 4.7.9 Penyimpanan Bahan Coba

Embrio dimasukkan dalam formalin 10%. Embrio dapat disimpan selama satu bulan, dan siap untuk dicat.

#### 4.7.10 Pewarnaan

Pewarnaan menggunakan Toluidine Blue.

#### 4.7.11 Pengamatan Mikroskop

Sediaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran mikroskop 40x hingga 100x kemudian difoto untuk kemudian di evaluasi.

#### 4.7.12 Pengukuran Embrio

Untuk pengukuran embrio digunakan mikrometer untuk mikroskop yang terdiri dari mikrometer okuler dan mikrometer objektif.

#### **4.8 Analisa Data**

Apabila hasil pengukuran panjang *neural tube*, dan jumlah somit berdistribusi normal serta memiliki varian yang sama, analisis yang digunakan adalah analisis varian ANOVA. Apabila data tersebut tidak memenuhi syarat untuk dilakukan analisis varian ANOVA, analisis yang digunakan adalah analisis non-parametrik alternatif untuk ANOVA yaitu analisis *Kruskal-Wallis* (Dahlan, 2013).

