

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4. 1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) laboratorik dengan menggunakan desain *post test only controlled group design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan mencit strain BALB/c sebagai subjek penelitian yang sebelumnya diinjeksikan pristane untuk induksi LES dan kemudian diinjeksikan *self-antigen dsDNA* dalam berbagai dosis secara berurutan dan bertahap.

#### 4. 2 Objek dan Sampel

Sampel dari penelitian ini adalah mencit lupus induksi *pristane* yakni mencit strain BALB/c yang diinduksi oleh *pristane* untuk menjadi mencit LES . Kemudian mencit diinjeksikan *self antigen dsDNA* lalu dibedah pada akhir perlakuan untuk dinilai beberapa variabel. Penelitian dilakukan setelah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Berikut ini merupakan kriteria inklusi mencit subjek penelitian ini :

1. Mencit strain BALB/c betina dengan tanda klinis Lupus
2. Umur 6-8 minggu, karena pada usia tersebut mencit strain BALB/c sesuai usia dewasa pada manusia sehingga diharapkan kadar hormon dalam tubuhnya telah stabil (Gunawan, 2007).
3. Berat badan rata-rata 25-30 gram

Berikut ini adalah kriteria eksklusi subjek penelitian

1. Mencit yang mati selain LES *selama* penelitian berlangsung.

Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian dengan menggunakan rumus Federer, 1977. Untuk penelitian eksperimen dengan rancangan acak lengkap, acak kelompok atau faktorial, secara sederhana dapat dirumuskan (Supranto, 2000) :

$$(t-1) (r-1) > 15$$

dimana :  $t$  = banyaknya kelompok perlakuan

$r$  = jumlah sampel (mencit yang telah menunjukkan tanda lupus karena induksi *pristane*)

Penelitian ini terdapat lima perlakuan sebagaimana yang telah disebutkan sebelumnya. Oleh karena itu didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

$$(5-1) (r-1) > 15$$

$$4 (r-1) > 15$$

$$r > 4,75 \text{ dibulatkan menjadi } 5 \text{ ekor}$$

Untuk lima perlakuan, diperlukan pengulangan paling sedikit sebanyak 5 ekor untuk tiap perlakuan sehingga sampel (mencit yang telah menunjukkan tanda lupus karena induksi *pristane*) total yang diperlukan dalam penelitian ini adalah minimal 25 ekor mencit strain BALB/c betina yang lupus diinduksi *pristane*.

#### 4. 3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian *self antigen* dsDNA secara bertahap sebagai berikut:

- a. Kelompok K(-) : kelompok kontrol negatif (mencit yang tanpa injeksi *pristane* dan ds DNA).

- b. Kelompok K (+) : Kelompok kontrol positif (mencit yang diinjeksi *pristane*, tanpa ds DNA).
- c. Kelompok A : Mencit yang diinjeksi *pristane* dan dsDNA konsentrasi I (0. 01 µg/ml, 0. 1 µg/ml, 1 µg/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan.
- d. Kelompok B : mencit yang diinjeksi *pristane* dan dsDNA konsentrasi II (0. 1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan.
- e. Kelompok C : mencit yang diinjeksi *pristane* dan dsDNA konsentrasi III (1µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah:

1. Jumlah sel Th1 dengan marker CD4-FITC dan IFN $\gamma$ -PE dari sampel jaringan *spleen* menggunakan metode *flowcytometry*
2. Kadar sitokin IFN- $\gamma$  pada serum mencit menggunakan metode ELISA

#### **4.4 Definisi Operasional**

- a. Mencit strain BALB/c adalah salah satu strain mencit yang sering digunakan dalam penelitian laboratorium untuk menguji zat pengobatan dan mempelajari patogenesis satu penyakit pada manusia, karena mencit ini memiliki onset yang cepat memunculkan LES seperti pada manusia (Sato *et al.*, 2000). Mencit strain BALB/c pada penelitian ini didapatkan dari Universitas Islam Negeri Malang (UIN) dengan surat keterangan sehat
- b. Mencit lupus induksi *pristane* adalah Mencit strain BALB/c betina yang diinjeksi *pristan* sebanyak 0.5 ml (782 µg/ml) secara intraperitoneal kemudian ditunggu selama 12 minggu. Mencit lupus induksi *pristane* ditandai dengan klinis lupus yang diukur diantaranya klinis bulu rontok, malar rash, dan peningkatan kadar anti-dsDNA (Leiss *et al.*, 2013).

- c. *Pristane* atau tetramethylpentadecane (TMPD) merupakan alkalin isoprenoid yang terdapat pada tumbuhan dan organisme laut (alga, plankton). Pada penelitian ini berperan sebagai zat cair untuk menginduksi LES pada hewan coba. Injeksi *pristane* sebesar 0,5 ml per mencit (Calvani, 2005) secara intraperitoneal. *Pristane* yang dipakai di penelitian ini didapatkan dari Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Singapore, katalog 1921-70-6).
- d. *Self antigen* dsDNA adalah antigen yang digunakan dengan metode EDI dengan optimasi pada penentuan dosis. Antigen ini diisolasi dari darah mencit. Isolasi DNA dilakukan dengan metode isolasi sesuai dengan protokol dari NucleoSpin® Blood MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG Germany.
- e. Polyethylenimine (PEI) adalah polimer kationik yang telah digunakan bertahun-tahun sebagai reagen yang dapat sebagai *adjuvant* untuk pengantar nukleotida. dsDNA dicampur dengan reagen *invivo-jetPEI* dilarutkan dalam setengah volume injeksi pada glukosa 10%. Volume injeksi pada penelitian ini sebesar 500µl dengan pelarut *sterile water*, sesuai dengan protocol (in vivo jetPEI: DNA & siRNA Delivery Protocol, 2009).
- f. Aktivitas mencit diukur dari banyaknya putaran yang dihabiskan mencit untuk berpindah dari ujung kandang ke ujung kandang sisi lainnya secara manual selama kurun waktu 30 menit. Normalnya mencit sehat dapat melakukan sebanyak 150-300 putaran dalam waktu 15 menit (Suwendar, at al., 2004).
- g. Jumlah sel Th1 adalah jumlah sel T-helper 1 dalam *spleen* yang diukur dengan metode *flowcytometry*. dengan pewarnaan antibodi PE anti-mouse IFN $\gamma$  Antibody (Biolegend, USA, Katalog 506903) dan FITC anti-mouse CD4 Antibody ( Biolegend, USA, Katalog 100405) Hasil yang diperoleh berupa persentase (%) sel yang mengekspresikan CD<sup>4+</sup>IFN $\gamma$  + yang diukur di dalam 10.000 sel limfosit.

- h. IFN- $\gamma$  adalah sitokin terpenting yang dihasilkan sel Th1 pada fase efektor adalah sebagai mediator inflamasi mengalami peningkatan (Guiducci *et al.*, 2010). Kadar sitokin IFN- $\gamma$  yang diukur dalam serum menggunakan metode ELISA (Mybiosource, USA, katalog MBS9302408).

#### **4.5 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **4.5.1 Persiapan Hewan Coba**

Alat : Kandang mencit, timbangan, handscoon, kain steril

Bahan : Hewan coba mencit Balb/c, pakan mencit standar (PAR-S) dan tepung, air mineral

##### **4.5.2 Pemberian Pristane**

Alat : *Handscoon, spuit 1cc*, kain steril

Bahan : Pristane, alkohol 70%, kapas, spuit

##### **4.5.3 Isolasi dsDNA**

Alat : Sentrifugator, Micropipet, Incubator, alat vortex

Bahan : Darah mencit, NucleoSpin® Blood MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG Germany

##### **4.5.4 Preparasi dan Injeksi dsDNA**

Alat : Micropipet, ependorf, alat vortex, NanoDrop 2000 Spectrophotometer *handscoon, spuit 1cc*, kain steril

Bahan : dsDNA, Invivo Jet-PEI, Aquades steril

##### **4.5.5 Pengukuran Jumlah Sel Th1 pada Spleen Mencit**

Alat : Tip biru, kuning, dan putih, pipet mikro, vortex, sentrifus, flowsitometer, tabung ependorf, kapas, kertas penyerap, cawan, kuvet fcm

Bahan : PBS, *cell staining buffer (CSB)* (Biolegend, USA, katalog 420201), *permeabilization wash buffer (10x)* (Biolegend, USA, katalog 421002), *fixation buffer* (Biolegend, USA, katalog 420801, FITC anti mouse CD4 (Biolegend, USA), PerCP anti mouse IFN-  $\gamma$  (Biolegend, USA, Katalog

505822), *phobol myrisate acetate* (PMA) (Sigma-Aldrich, katalog P-8139), *ionomycin* (BD Bioscience, katalog I-0634), golgiplug (BD Bioscience, katalog 555029).

#### **4. 5.6 Pengukuran kadar Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ )**

Alat : Tip biru, kuning, dan putih, pipet mikro, vortex, sentrifus, plate, ELISA reader.

Bahan : *Anti-mouse IFN- $\gamma$  ELISA Kit* (eBioscience, USA), *Biotin-conjugated, wash buffer, Streptavidin-HRP, TMB Substrate Solution, Stop Solution*

### **4. 6 Prosedur Penelitian**

#### **4. 6. 1 Persiapan Hewan Coba**

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit strain BALB/c yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Mencit strain BALB/c dipilih karena penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa mencit strain BALB/c dapat memberikan gambaran imunologis seperti yang terjadi pada manusia (Rottman dan Willis, 2010). Sebelum dilakukan perlakuan, mencit diadaptasikan terlebih dahulu di laboratorium selama tujuh hari supaya terbiasa dengan kondisi tempat yang baru dan mencit tidak mengalami stres. Mencit diberikan makanan standar dan ditempatkan di dalam kandang yang dibersihkan setiap harinya. Selama proses aklimatisasi mencit diberikan pakan, minum, dan penggantian sekam secara rutin sesuai standar laboratorium Farmakologi FKUB. Pemberian minum mencit juga diberikan tiap hari dengan menggunakan air matang yang ditempatkan pada botol minum hewan. Setiap kandang minimal diberikan 2 botol minum. Air minum dilakukan penggantian setiap hari. Sekam yang terdapat dalam kandang mencit dilakukan penggantian setiap 3 hari sekali. Sekam yang digunakan merupakan sekam dari lab Farmakologi FK UB. Selama proses penggantian sekam dipindahkan ke satu kandang dengan hati-hati terlebih dahulu untuk mencegah timbulnya stress selama perlakuan.

#### 4. 6. 2 Isolasi dsDNA

ds-DNA diisolasi dari serum mencit yang sehat. Serum yang diambil dimasukkan pada larutan sel lisis untuk melisis sel darah merah (Khosravinia *et al.*, 2007). Sentrifugasi dilakukan selama 2 menit dan supernatan dibuang lalu divortex. Setelah itu ditambahkan 300 $\mu$ L larutan nuklei lisis. Larutan "*protein precipitation*" ditambahkan dan divortex lalu sentrifugasi selama 3 menit dan terlihat pellet berwarna coklat tua. Setelah proses ekstraksi, DNA yang didapat dapat dipisahkan melalui presipitasi. Pada tahapan presipitasi ini, DNA yang terpresipitasi akan terpisah dari residu-residu RNA dan protein yang masih tersisa. Residu tersebut juga mengalami koagulasi namun tidak membentuk struktur fiber dan berada dalam bentuk presipitat granular. Pada umumnya digunakan etanol atau isopropanol dalam tahapan presipitasi, pada penelitian ini ditambahkan isopropanol 300 $\mu$ L. Tabung dibalikkan untuk mencampur lalu disentrifugasi selama 1 menit dan supernatan dibuang kemudian ditambahkan 300 $\mu$ L etanol 70%. Etanol diambil perlahan tanpa mengganggu pellet dan tabung dibalik untuk dikeringkan lalu ditambahkan larutan rehidrasi DNA. Pada saat isopropanol dibuang dan pellet dikeringanginkan dalam tabung, maka pellet yang tersisa dalam tabung adalah DNA pekat. Oleh sebab itu proses presipitasi kembali dengan etanol sebelum pellet dikeringanginkan dapat meningkatkan derajat kemurnian DNA yang diisolasi (Bettelheim dan Landesberg, 2007).

#### 4. 6. 3 Prosedur Nanodrop

Untuk mengetahui kemurnian DNA yang telah diisolasi bisa menggunakan alat nanodrop yang dimana rasio nilai absorbansi DNA A260 dengan nilai absorbansi protein (kontaminan) A280. Pada penelitian ini dengan alat nanodrop 2000 Spectrophotometer [Thermo Scientific] karena dapat digunakan untuk mengetahui nilai absorbansi larutan. Selain itu alat tersebut didapatkan hasil yang sangat sensitif, untuk melakukan pengukuran dengan alat

tersebut hanya memerlukan sampel yang sangat minimal yaitu 2  $\mu\text{l}$  untuk tiap kali pengukuran. Tingkat rasio kemurnian DNA yang relatif baik diperoleh pada metode konvensional yang menunjukkan kecenderungan mendekati nilai kemurnian ideal 1.8-2.0, seperti yang dilaporkan Fitzgerald dan Burden (2014), dimana jika hasil kemurniannya diatas 2 dimungkinkan karena terkontaminasi oleh RNA dan jika kontentrasinya di bawah 1.8 dimungkinkan karena terkontaminasi oleh protein lain dan atau larutan fenol yang digunakan (Neil *et al.*, 2011).

Sampel yang dapat digunakan dalam pengukuran, antara lain: asam nukleat (DNA/RNA), microarray, protein A280, protein & labels, BCA, modified Lowry, Bradford, dan Pierce 660 nm. Isolasi asam nukleat dengan metode kit menggunakan bahan-bahan tertentu dan kolom yang dapat menghasilkan asam nukleat dengan tingkat kemurnian yang tinggi (Capote *et al.*, 2012).

**Tabel 4.1 Konsentrasi DNA dengan Pengukuran Nanodrop**

Kode Stok DNA	ng/ $\mu\text{l}$
Stok DNA 1	73.7
Stok DNA 2	141.0
Stok DNA 3	238.2
Stok DNA 4	270.3

Dari table diatas menunjukkan konsentrasi DNA yang didapatkan dari hasil isolasi DNA dengan metode yang telah dijelaskan, dimana persamaan konsentrasi DNA dihitung dengan absorbansi larutan standar yang sudah diketahui kadarnya, dihitung dari persamaan berikut:

$$1 \text{ OD}_{260} \text{ unit} = 50 \mu\text{g/ml}$$

1 absorbansi pada panjang gelombang 260 setara dengan kadar DNA sebesar 50  $\mu\text{g/ml}$ . alat nanodrop akan mengukur absorbansi cahaya pada panjang gelombang 260 dan menghitung kadar DNA sesuai dengan jumlah absorbansi cahaya.

#### 4. 6. 4 Pemberian *Pristane*

*Pristane* yang didapatkan dari *sigma Aldrich* (no.catalog p2870-100ML) diinjeksikan ke mencit sesuai dengan prosedur yang telah dideskripsikan pada penelitian-penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Calvani *et al.*, (2005). Mencit dibagi menjadi beberapa kelompok, yaitu mencit yang tidak diinjeksi *pristane* sebagai control negatif, mencit yang diinjeksikan *pristane* saja tanpa perlakuan sebagai control positif dan mencit yang diinjeksikan *pristane* kemudian diberikan perlakuan.

Sebanyak 60 mencit strain BALB/c diberikan injeksi pristan secara intraperitoneal sebanyak 0,5 ml dengan konsentrasi 782 µg/ml. Injeksi hanya dilakukan satu kali setelah itu dilakukan pengamatan berkala pada mencit. Mencit yang digunakan sebagai kontrol diinjeksikan *phosphate buffer saline* (PBS) (Chowdhary *et al.*, 2007). 12 minggu paska injeksi mencit dinilai tanda-tanda klinis lupus. Tanda-tanda klinis lupus diantaranya bulu rontok, malar rash, dan peningkatan ANA dan antibodi anti-dsDNA. Mencit yang menunjukkan tanda klinis lupus yang sama merupakan mencit yang digunakan pada penelitian

#### 4. 6. 5 Preparasi dan injeksi dsDNA

Untuk tahap awal, kadar terapi maksimal EDI menggunakan self antigen dsDNA berdasarkan kadar yang dapat menyebabkan manifestasi klinis lupus. Kadar dsDNA yang dibutuhkan agar mencit strain BALB/c dapat terinduksi lupus adalah sebesar 50 µg per mencit (Qiao *et al.*, 2005). Dengan konsep terapi desensitisasi, pengambilan kadar dibawah kadar tersebut sesuai penentuan yang dianjurkan pada terapi EDI *self antigen* yang telah dilakukan oleh Burton *et al* pada penyakit autoimun *Multiple Sclerosis* (Burton *et al.*, 2014).

PEI adalah polimer kationik yang telah digunakan bertahun-tahun sebagai reagen yang dapat sebagai *adjuvant* untuk pengantar nukleotida. Dengan cara dsDNA dicampur dengan reagen *invivo-jetPEI* dilarutkan dalam setengah volume

injeksi pada glukosa 10%. Volume injeksi pada penelitian ini sebesar 500 $\mu$ l. dengan pelarut *sterile water*. *Vortex* perlahan dan lakukan *spin down*. Ditambahkan larutan tersebut seluruhnya ke dalam larutan ds-DNA. *Vortex* perlahan dan lakukan *spin down*. Dilakukan Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang hingga larutan menjadi stabil. dsDNA diinjeksikan secara intraperitoneal sesuai konsentrasi masing–masing kelompok perlakuan sebagai berikut 0.01  $\mu$ g/ml, 0.1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml dan 100  $\mu$ g/ml (in vivo jetPEI: DNA & siRNA Delivery Protocol, 2009). Pada tabel 4.2 dibawah ini dijelaskan rincian kebutuhan dsDNA, PEI, glukosa 10%, dan aquades steril untuk mencapai masing-masing konsentrasi dsDNA yang dibutuhkan. Konsentrasi glukosa diakhir volume pengenceran sebesar 5%.

**Tabel 4.2 Pengenceran DNA dengan Larutan PEI**

Kadar dsDNA ( $\mu$ g)	dsDNA			PEI		Glukosa 10% ( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ L)	Total Volume	Konsentrasi ( $\mu$ g/ml)
	Stok dsDNA	Ds DNA ( $\mu$ l)	PEI ( $\mu$ l), N/P = 6	Stok	Volume PEI ( $\mu$ l)				
0.005	Stok DNA 1 (1:10)	0.68	0.0006	Stok PEI (1:1000)	0.6	249.4	249.32	500	0.01
0.05	Stok DNA 1	0.68	0.006	Stok PEI (1:1000)	6	244	249.32	500	0.1
0.5	Stok DNA 2	3.55	0.06	Stok PEI (1:1000)	60	190	246.45	500	1
5	Stok DNA 3	21	0.6	Stok PEI	0.6	250	228.4	500	10
50	Stok DNA 4	185	6	Stok PEI	6	250	59	500	100

#### 4. 6. 6 Pengukuran Jumlah Sel Th1

Hasil homogenisasi jaringan *spleen* disentrifugasi untuk mendapatkan pellet cell. Pellet cell yang didapatkan disuspensikan ulang pada 1 ml Cell Staining Buffer. Sel disentrifus, lalu disuspensikan ulang dengan 0,5 ml Cell Staining Buffer yang sesuai sehingga konsentrasinya sesuai dengan yang

dibutuhkan. Dilanjutkan dengan prosedur pewarnaan permukaan sel. Antibodi ditambahkan pada tabung berisi pellet cell dari prosedur sebelumnya sebagai berikut: FITC Anti-Mouse CD4 Antibody. Diinkubasi pada temperatur ruangan selama 15-20 menit dalam gelap. Dicuci dengan 1,5 ml Cell Staining Buffer dengan sentrifus pada 350 X g selama 5 menit. Diulangi langkah tersebut. Sel disuspensikan ulang dalam 0,5 ml Cell Staining Buffer. Dilanjutkan segera ke proses pewarnaan intraseluler. Ditambahkan 1 ml 1X Fix/Perm Solution pada tabung, di-vortex dan diinkubasi pada temperatur ruangan dalam gelap selama 20 menit, lalu disentrifus pada 350 X g selama 5 menit sampai mengendap dan supernatant dibuang. Di cuci dengan 1,5 ml Cell Staining Buffer dengan sentrifus pada 350 X g selama 5 menit dan supernatant dibuang. Ditambahkan 20 ul PerCP Anti-Mouse IFN $\gamma$  Antibody (sel Th1) dan diinkubasikan pada temperatur ruangan dalam gelap selama 30 menit. Dicuci dengan 1,5 ml Cell Staining Buffer dengan pada 350 X g selama 5 menit sampai mengendap dan supernatant dibuang. Diulangi langkah tersebut. Disuspensikan ulang dalam 0,5 ml cell Staining Buffer lalu analisis dengan flowcytometer (Kalim *et al.*, 2017).

#### **4. 6. 7 Pengukuran kadar IFN- $\gamma$**

Prosedur pengukuran dengan meng-*coating* antigen 1:20 dalam tabung ELISA, inkubasi *overnight* suhu 4<sup>0</sup> C, kemudian dicuci dengan PBS-T. Kemudian *blocking* dengan BSA 1%. Dicuci kembali dengan PBS-T. Antibodi primer (serum) diencerkan 1:500 dalam PBS, ditambahkan 100 ul dalam tabung di inkubasi selama 1 jam. Tabung dicuci kembali dengan 300 ul PBS-T 0,2 % selama 3 kali. Antibodi sekunder berlabel enzim(anti mouse IgG)1:1000 ditambahkan pada tabung dengan inkubasi 1 jam. Cuci dengan PBS-T 0,2 %. Ditambahkan SA-HRP 1:1000 diinkubasi selama 1 jam. Sel dicuci dengan PBS-T 0,2 %. Kemudian dilakukan penambahan substrat (*sureblue*) TMB dan diinkubasi 30 menit. Tanpa membuang Sureblue TMB, reaksi distop dengan HCl 1N,

inkubasi 15 menit. Kemudian dibaca ELISA reader ( $\lambda=450\text{nm}$ ). Kadar Anti-Mouse IFN $\gamma$  Antibody ditunjukkan dalam ul/mL. (Mouse IFN- $\gamma$  Coated ELISA Kit User Guide, 2017).

#### 4. 7 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran berat badan mencit secara berkala. Dilakukan uji beda antara berat badan mencit normal dengan berat badan mencit PIL. Produksi autoantibodi anti-dsDNA juga dievaluasi sebelum pemberian terapi EDI dsDNA. Dilakukan uji beda antara mencit normal dengan mencit PIL. Pengumpulan data juga dilakukan setelah pembedahan. Saat pembedahan dikumpulkan darah dari jantung mencit dan spleen untuk dilakukan pengukuran variabel. Hasil pengukuran variabel akan dibandingkan antar kelompok perlakuan. Pengumpulan data akan diubah kedalam bentuk tabel-tabel, kemudian data diolah menggunakan program pengolahan data statistik. Proses pengolahan data menggunakan program komputer ini terdiri beberapa langkah :

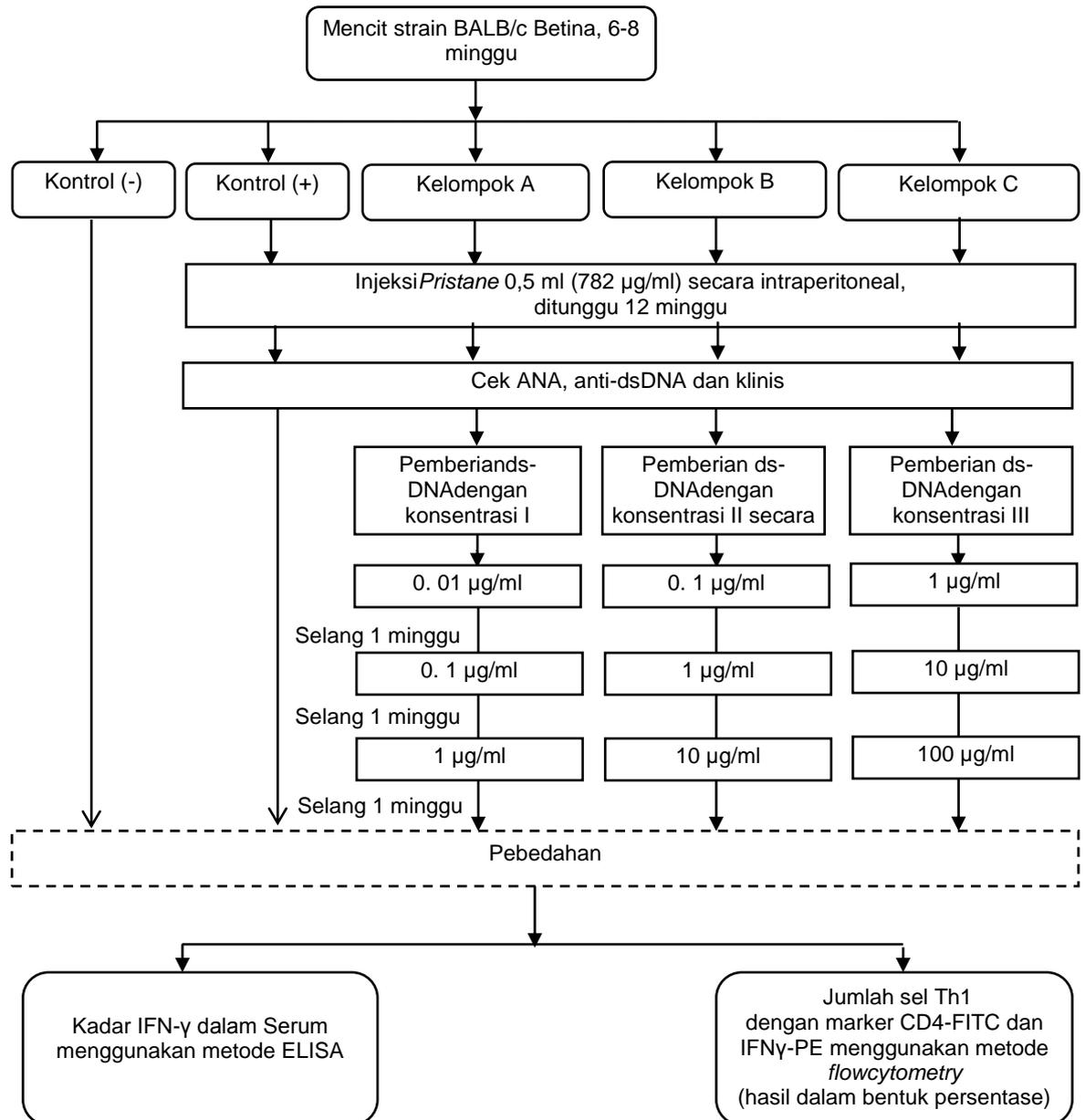
- 1 Editing, kegiatan pengecekan dan perbaikan .
- 2 Coding, untuk mengkonversikan (menerjemahkan) data yang dikumpulkan selama penelitian kedalam simbol yang sesuai untuk keperluan analisis.
- 3 Data entry, memasukkan data ke dalam program komputer.
- 4 Cleaning, pengecekan ulang data dari setiap sumber data untuk melihat kemungkinan adanya kesalahan kode, ketidaklengkapan, dan kemudian dilakukan koreksi (Notoatmodjo, 2010).

Data akan dibandingkan hasilnya pada setiap kelompok untuk menentukan efek pemberian EDI dengan *self antigen* dsDNA pada mencit LES. Variabel yang diukur adalah jumlah sel Th1 dan kada IFN- $\gamma$ . Jumlah sel Th1 dan kada IFN- $\gamma$  merupakan data numerik rasio. Dalam penelitian ini akan

dibandingkan jumlah jumlah sel Th1 dan kada IFN- $\gamma$  setiap kelompok dengan jumlah sel Th1 dan kada IFN- $\gamma$  kelompok kontrol positif dan negatif.

Uji normalitas dan homogenitas untuk mengetahui apakah sebaran data normal dan homogen. Uji normalitas digunakan dengan metode statistik uji *Shapiro-wilk* dengan  $\alpha=0,05$ . Jika didapatkan data p value  $> 0,05$ , maka data terdistribusi normal. Kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas/ keragaman data menggunakan uji Test *Homogeneity of Variance* bertujuan untuk memperlihatkan bahwa sebaran data memiliki varian yang sama atau homogen. Data disebut homogen apabila didapatkan nilai signifikansi  $\alpha > 0,05$ . Jika data terdistribusi normal dan homogen, dapat dilakukan uji parametrik. One Way ANOVA untuk uji beda. Jika dari hasil uji ANOVA didapatkan nilai P signifikan ( $p < 0,05$ ) maka dapat dilanjutkan uji Pos Hoc LSD/Tukey. Jika data tidak terdistribusi normal dan atau tidak homogen maka dilakukan uji non parametrik *Kruskall-Walis* untuk uji beda. Data ditampilkan dalam bentuk diagram batang dalam rerata  $\pm$  standar deviasi (SD). Perbedaan yang bermakna antar tiap kelompok ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Nilai  $p < 0,05$  menunjukkan perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Analisis data pada penelitian ini dibantu dengan program SPSS 17 for Windows.

## 4.8 Skema Alur Penelitian



Bagan 4.1 Kerangka Penelitian