

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang akan dipakai adalah studi eksperimental laboratorium yang menggunakan kelompok tikus yang diberi bubuk kayu manis dan kelompok tikus yang tidak diberi bubuk kayu manis. Metode penelitian yang dipakai adalah Post Test Only Control Group Design.

Pemilihan obyek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap). Hal ini disebabkan jenis hewan coba, tempat percobaan, dan bahan penelitian lainnya yang bersifat homogen.

4.2 Populasi dan Sample Penelitian

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah tikus putih jenis *Rattus norvegicus strain wistar* yang mengalami diabetes melitus tipe 2.

4.2.2 Besar Sampel

Dalam penelitian ini terdapat lima perlakuan, yaitu kontrol positif, kontrol negatif, P1, P2, dan P3. Jumlah binatang coba untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan :

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 5$$

Keterangan :

r = replikasi

t = *treatment*/perlakuan (Arkermen dan David, 2006 dalam Fadlia, 2011).

Untuk perlakuan sejumlah lima macam diperlukan jumlah sampel dengan ulangan paling sedikit lima kali untuk masing-masing perlakuan. Sehingga total jumlah sampel yang dibutuhkan sejumlah 25 ekor tikus, dengan rincian lima ekor tikus untuk masing-masing perlakuan. Jumlah subyek penelitian minimal adalah 25 ekor tikus + 5 ekor tikus cadangan. Jadi jumlah tikus yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah 30 ekor tikus.

4.2.3 Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Sampel penelitian ini adalah tikus putih jenis *Rattus novergicus strain wistar* berjenis kelamin jantan. Dipilih tikus jantan sebagai bahan percobaan adalah karena pada tikus jantan tidak mengalami adanya perubahan hormon setiap bulannya akibat adanya siklus menstruasi, seperti yang dialami oleh tikus betina. Adanya fluktuasi hormon pada tikus dikhawatirkan dapat mempengaruhi hasil penelitian. Pemilihan hewan coba tikus karena tikus adalah hewan coba yang paling sering digunakan dan memiliki kedekatan dengan manusia, diantaranya merupakan mamalia, pemakan segala (omnivora) dan mudah berkembang biak (Ramarao, 2007).

Agar setiap sampel mempunyai peluang yang sama untuk mendapat perlakuan maka dalam pengambilan sampel digunakan pengacakan dengan langkah-langkah sebagai berikut :

- a. Memberi nomor urut 1 - 30 pada subyek penelitian.
- b. Mengambil bilangan random sebanyak jumlah sampel dengan menggunakan tabel acak.
- c. Memberi rangking pada bilangan random yang diperoleh. Tabel randomisasi dapat dilihat pada lampiran 1. Dengan demikian hasil randomisasi menunjukkan kelompok kontrol negatif (P0) terdiri dari peringkat 3, 10, 27, 5, 9, 26. Kelompok kontrol positif (P1) terdiri dari peringkat 21, 23, 7, 14, 13, 30. Kelompok perlakuan (P2) terdiri dari peringkat 15, 8, 4, 6, 2, 24. Kelompok perlakuan (P3) terdiri dari peringkat 18, 11, 29, 1, 12, 19. Dan kelompok perlakuan (P4) terdiri dari peringkat 22, 20, 28, 16, 17, 25.
- d. Kemudian masukkan jenis perlakuan dalam sampel pada rancangan penelitian.

Tabel 4.1 Randomisasi Penelitian

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
P3	P 2	P0	P 2	P0	P2	P1	P2	P0	P0
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
P3	P 3	P1	P 1	P2	P4	P4	P3	P3	P4
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
P1	P 4	P1	P 2	P4	P0	P0	P4	P3	P1

4.2.4 Kriteria Inklusi

- a. Jenis tikus adalah tikus putih jenis *Rattus novergicus strain wistar*.
- b. Jenis kelamin tikus adalah jantan.
- c. Berumur 2-3 bulan.

- d. Berat badan 200 gram.
- e. Warna bulu putih dan bersih.
- f. Aktif dan mau makan.
- g. Sehat, ditandai dengan bulu baik dan mata jernih.
- h. Tidak pernah mengalami perlakuan sebelumnya.

4.2.5 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus tidak mau makan selama penelitian berlangsung.
- b. Tikus yang mati selama proses penelitian.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Tergantung (*Dependent Variabel*)

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar kolestrol total dalam serum darah tikus putih jenis *Rattus novergicus strain wistar*.

4.3.2 Variabel Bebas (*Independent Variabel*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah bubuk kayu manis (*Cinnamomum burmanii*) dosis 1, 2, dan 3.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba selama penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Untuk pemeriksaan serum kolesterol dilakukan di Laboratorium Kawi 31 Malang. Penelitian dilakukan selama 45 hari.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

4.5.1.1 Alat Pemeliharaan Binatang Coba

Alat yang dibutuhkan untuk memelihara tikus putih jenis *Rattus novergicus strain wistar* adalah :

- a. Kandang dari bak plastik.
- b. Tutup kandang yang terbuat dari anyaman kawat.
- c. Botol air untuk minum buatan sendiri.
- d. Timbangan analitik merek *Mettler Teledo* tipe Al 201.
- e. Alat untuk memantau keadaan tikus, misalnya form pemantauan harian.

4.5.1.2 Alat Pengambilan Sampel Darah Hewan Coba

Alat yang dibutuhkan untuk mengambil sampel darah tikus putih jenis *Rattus novergicus strain wistar* adalah :

- a. Jarum suntik dan spuit *disposable* merek *Terumo* ukuran 23G x 1 1/4" (0.65 x 32 mm).
- b. Tabung untuk penyimpanan serum (tabung eppendorf) ukuran 1500 µL.
- c. Mikropipet.
- d. Sentrifuge merek *Hettich*.

4.5.1.3 Alat Pengukuran Serum Kolesterol

Alat yang dibutuhkan untuk mengukur serum kolesterol tikus putih jenis *Rattus novergicus strain wistar* adalah :

- a. Mesin Cobas Mira merek *Roche*.
- b. Cuvet disposable.
- c. Rak reagen.
- d. Rak sampel.
- e. Mikro pipet 100 µl.
- f. Mikro pipet 500 µl.

- g. Mikro pipet 1000 µl.
- h. Yellow tip dan blue tip.

4.5.1.4 Alat Pembuatan Ransum Makanan Tikus

Alat yang dibutuhkan untuk mengambil sampel darah tikus putih jenis *Rattus novergicus strain wistar* adalah :

- a. Sendok.
- b. Timbangan analitik.
- c. Baskom.
- d. Pengaduk.
- e. Sarung tangan.

4.7.1.5 Alat Pemberian Bubuk Kayu Manis

Bubuk kayu manis diberikan pada tikus melalui spuit yang ujungnya dipasang suatu sonde yang bisa melewati mulut, esophagus, hingga lambung.

4.5.2 Bahan Penelitian

4.5.2.1 Bahan Pakan Tikus

Menurut Syamsuddin (2007), kebutuhan pakan kering bagi seekor tikus setiap harinya kurang lebih 10% dari bobot tubuhnya, sehingga apabila berat tikus yang diinginkan adalah sebesar 200 gram, maka perkiraan berat pakan tikus sebanyak 20 gram. Dalam penelitian ini pakan diberikan sebanyak 31 gram untuk setiap tikus guna mengompensasi terjadinya polifagi akibat diabetes melitus.

Diet normal dibuat dengan komposisi PARS : tepung terigu = 2 : 1. Per 100 gram PARS mengandung energi 344 kkal, protein 19 gram, lemak 4 gram,

dan karbohidrat 58 gram (Farmako, 2012). Per 100 gram tepung terigu mengandung energi 333 kkal, protein 19 gram, lemak 1 gram, dan karbohidrat 77,2 gram (DKBM, 2009).

Tabel 4.2 Perhitungan Bahan Penyusun Diet Normal

	PARS (80 gram)	Tepung Terigu (40 gram)	Total
Energi	80% x 344 = 275,2 gram	40% x 333 = 133,2 gram	408 kkal
Protein	80% x 19 = 15,2 gram	40% x 19 = 7,6 gram	23 gram
Lemak	80% x 4 = 3,2 gram	40% x 1 = 0,4 gram	4 gram
Karbohidrat	80% x 58 = 46,4 gram	40% x 77,2 = 30,88 gram	77 gram

Berat pakan = 120 gram

Jumlah energi dalam 1 gram pakan = 3,4 kkal

Kebutuhan energi tikus perhari = 104,6 kkal, maka jumlah pakan yang diberikan setiap hari sebanyak 31 gram.

4.5.2.2 Streptozotosin

Streptozotosin (STZ) atau 2-deoksi-2-[3-(metil-3-nitrosoureido)-*D*-glukopiranoose] diperoleh dari *Streptomyces achromogenes* dapat digunakan untuk menginduksi baik diabetes melitus tipe 1 maupun tipe 2 pada hewan uji. Streptozotosin mengakibatkan tikus mengalami gangguan respon terhadap glukosa dan sensitivitas sel β terhadap glukosa. Di lain pihak, sel α dan δ tidak dipengaruhi secara signifikan oleh pemberian streptozotosin pada tikus yang baru lahir, sehingga tidak membawa dampak pada perubahan glukagon dan somatostatin. Patofisiologis tersebut identik pada diabetes melitus tipe 2 (Nugroho, 2006).

Streptozotosin menembus sel β Langerhans melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi streptozotosin intraseluler menghasikan perubahan DNA sel β pankreas. Alkilasi DNA oleh streptozotosin melalui gugus nitrosourea mengakibatkan kerusakan pada sel β pankreas. Streptozotosin merupakan donor NO (*nitric oxide*) yang mempunyai kontribusi terhadap kerusakan sel tersebut melalui peningkatan aktivitas guanilil siklase dan pembentukan cGMP. NO dihasilkan sewaktu streptozotosin mengalami metabolisme dalam sel. Selain itu, streptozotosin juga mampu membangkitkan oksigen reaktif yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel β pankreas. Pembentukan anion superoksida karena aksi streptozotosin dalam mitokondria dan peningkatan aktivitas xantin oksidase. Dalam hal ini, streptozotosin menghambat siklus Krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria. Produksi ATP mitokondria yang terbatas selanjutnya mengakibatkan pengurangan secara drastis nukleotida sel β pankreas (Abeleeh, 2009).

Peningkatan defosforilasi ATP akan memacu peningkatan substrat untuk enzim xantin oksidase (sel β pankreas mempunyai aktivitas tinggi terhadap enzim ini), lebih lanjut meningkatkan produksi asam urat. Xantin oksidase mengkatalisis reaksi pembentukan anion superoksida aktif. Dari pembangkitan anion superoksida, terbentuk hidrogen peroksida dan radikal superoksida. NO dan oksigen reaktif tersebut adalah penyebab utama kerusakan sel β pankreas. Kerusakan DNA akibat streptozotosin dapat mengaktifasi poli ADP-ribosilasi yang kemudian mengakibatkan penekanan NAD⁺ seluler, selanjutnya penurunan jumlah ATP, dan akhirnya terjadi penghambatan sekresi dan sintesis insulin (Ordonez, 2007).

Secara singkat, pemberian streptozotosin pada tikus mempengaruhi kerja sel β pankreas. Pada tikus yang disuntik streptozotosin mengakibatkan penurunan respon sel β pankreas dan mengakibatkan penurunan sensitifitas insulin, sehingga mengakibatkan timbulnya diabetes melitus tipe 2. Untuk menginduksi diabetes melitus tipe 2, streptozotocin diberikan intravena atau intraperitoneal dengan dosis 35-65 mg/kg BB (Ramarao, 2007). Dalam waktu 3 hari, streptozotocin akan merusak sel β pankreas (Abeleeh, 2009). Dalam penelitian ini, dosis yang akan digunakan adalah sebesar 55 mg/kg BB. Hal ini mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Akbarzadeh (2007) dan Abeleeh (2009) yang melakukan percobaan menggunakan permodelan tikus diabetik dengan menggunakan streptozotocin.

4.5.2.3 Bubuk Kayu Manis

Bubuk kayu manis yang digunakan dalam penelitian adalah kulit kayu manis yang telah mengalami proses pengolahan sehingga berbentuk bubuk. Bubuk kayu manis yang akan digunakan adalah bubuk kayu manis dengan merek "Cassiavera Kayu Manis" yang diproduksi oleh PT. Pawon Gemilang Rasa dan dibeli di Hypermart Malang Town Square. Kayu manis yang digunakan sudah dikemas dengan bobot 40 gram.

4.6 Definisi Operasional Variabel

4.6.1 Kadar Kolesterol Darah

Kadar kolesterol total adalah besarnya kadar kolesterol total serum dengan satuan mg/dl, yang diuji dengan menggunakan metode enzimatik dengan alat Cobas Mira. Darah didapatkan dari organ jantung tikus.

4.6.2 Bubuk Kayu Manis

Bubuk kayu manis adalah bubuk yang dibuat dari kulit kayu manis yang telah mengalami proses pengolahan dengan merek "Cassiavera Kayu Manis" yang diproduksi oleh PT. Pawon Gemilang Rasa dan dibeli di Hypermart Malang Town Square, kemudian diberikan kepada tikus melalui sonde berdasarkan 3 dosis yang telah diterapkan.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Pra Penelitian

Pada awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi dengan sistem rancangan acak lengkap agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan. Sebelum perlakuan tikus diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama 7 hari dengan tujuan menyesuaikan dengan lingkungan. Pada masa adaptasi berat badan tikus ditimbang yaitu pada saat awal adaptasi dan sesudah adaptasi agar dapat dipantau bahwa berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi baik.

4.7.2 Prosedur Penelitian Utama

Pembagian perlakuan menjadi lima jenis :

1. Kontrol negatif : kelompok tikus normal tanpa perlakuan.
2. Kontrol positif : kelompok tikus dengan diabetes melitus tipe 2 tanpa pemberian kayu manis.
3. Perlakuan 1 : kelompok tikus dengan diabetes melitus tipe 2 dengan pemberian kayu manis dengan dosis 1.
4. Perlakuan 2 : kelompok tikus dengan diabetes melitus tipe 2 dengan pemberian kayu manis dengan dosis 2.

5. Perlakuan 3 : kelompok tikus dengan diabetes melitus tipe 2 dengan pemberian kayu manis dengan dosis 3.

4.7.3 Prosedur Perhitungan Dosis Kayu Manis

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Khan tahun 2003, diuji cobakan pemberian bubuk kayu manis kepada manusia sebesar 1, 3, dan 6 gram. Walaupun penelitian tentang pengaruh kayu manis telah beberapa kali dilakukan, namun dalam penelitian tersebut bahan yang digunakan adalah ekstrak salah satu komponen yang terdapat dalam kayu manis. Sebagai contoh, dalam penelitian yang dilakukan oleh Baker pada tahun 2008 dan Blevins pada tahun 2007, zat yang digunakan adalah ekstrak *methyl hydroxy chalcone polymer* (MHCP) bukan bubuk kayu manis yang umum dijual.

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Blevins tahun 2007, memberikan kesimpulan bahwa efek dari penggunaan kayu manis dapat memberikan hasil yang berbeda pada populasi yang berbeda. Penelitian yang dilakukan oleh Khan tidak memberikan data kebiasaan makan, BMI, dan data-data lebih rinci tentang subyek yang dilakukan. Oleh karena itu, kayu manis tidak disarankan secara resmi untuk pengobatan diabetes tipe 2 di Amerika (Blevins, 2007). Menurut penelitian Baker tahun 2008, penelitian menggunakan kayu manis kurang memberikan hasil yang signifikan, karena penelitian terdahulu hanya menggunakan jumlah sampel yang sedikit. Sehingga memberikan kesimpulan bahwa pemberian kayu manis tidak berpengaruh pada glukosa darah dan profil lipid. Selain itu, kemampuan kayu manis dalam mencegah terjadinya komplikasi diabetes tidak diketahui.

Karena penggunaan kayu manis kepada manusia masih diragukan, maka peneliti melakukan penelitian dengan menggunakan sampel tikus. Oleh karena

itu dalam penelitian ini, peneliti menggunakan dosis konversi dari manusia ke tikus.

Tabel 4.3 Konversi Dosis Antar Spesies

Konversi Dosis antar Spesies (berdasarkan luas permukaan tubuh)						
	Mencit (20 gram)	Tikus (200 gram)	Marmot (400 gram)	Kelinci (1,5 kg)	Anjing (12 kg)	Manusia (70 kg)
Mencit (20 gram)	1,0	7,0	12,25	27,8	124,2	387,9
Tikus (200 gram)	0,14	1,0	1,74	3,9	17,8	60,0
Marmot (400 gram)	0,08	0,57	1,0	2,25	10,2	31,6
Kelinci (1,5 kg)	0,04	0,25	0,44	1,0	4,5	14,2
Anjing (12 kg)	0,008	0,06	0,10	0,22	1,0	3,1
Manusia (70 kg)	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,32	1,0

Sumber : Sjabana, 2006

- Berdasarkan penelitian Khan, disebutkan bahwa dosis pemberian bubuk kayu manis sebesar 3 gram paling mampu menurunkan kadar gula darah secara signifikan (Khan. 2003). Sehingga peneliti mengambil patokan dosis 3 gram sebagai patokan pemberian bubuk kayu manis kepada tikus. Besar dosis yang diberikan kepada tikus adalah :

$$3 \text{ gram} \times 0,018 = 0,054 \text{ gram} = 54 \text{ mg}$$

- Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

$$\text{Dosis 1} = \frac{1}{2} \times \text{dosis} = 27 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis 2} = 1 \times \text{dosis} = 54 \text{ mg}$$

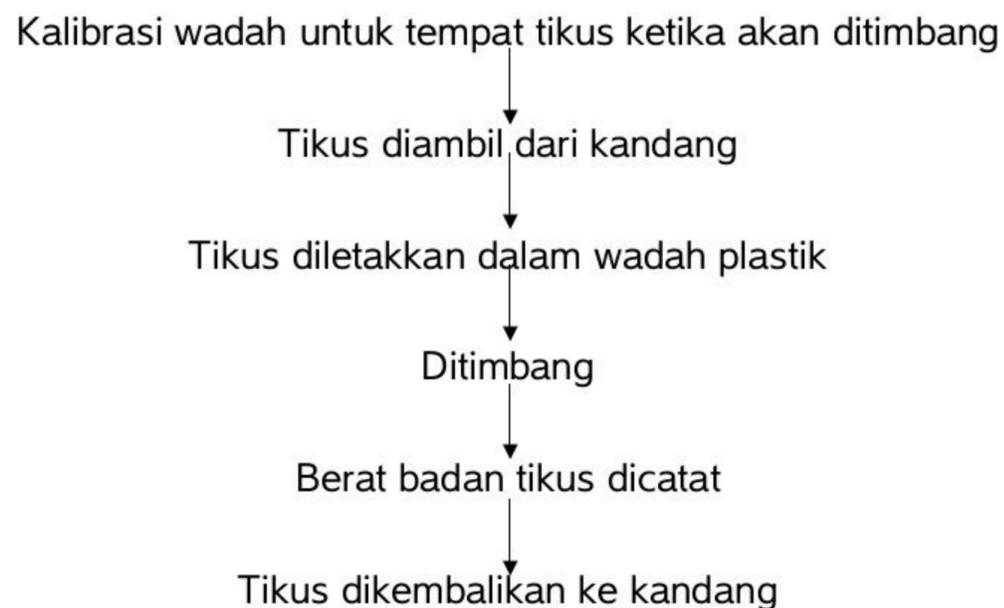
$$\text{Dosis 3} = 2 \times \text{dosis} = 108 \text{ mg}$$

Pemberian dosis tersebut didasarkan pada penelitian Ziegenfuss tahun 2006, yang memberikan suplementasi cinnulin yang mengandung 500 mg ekstrak kayu manis, atau setara dengan 10 gram bubuk kayu manis.

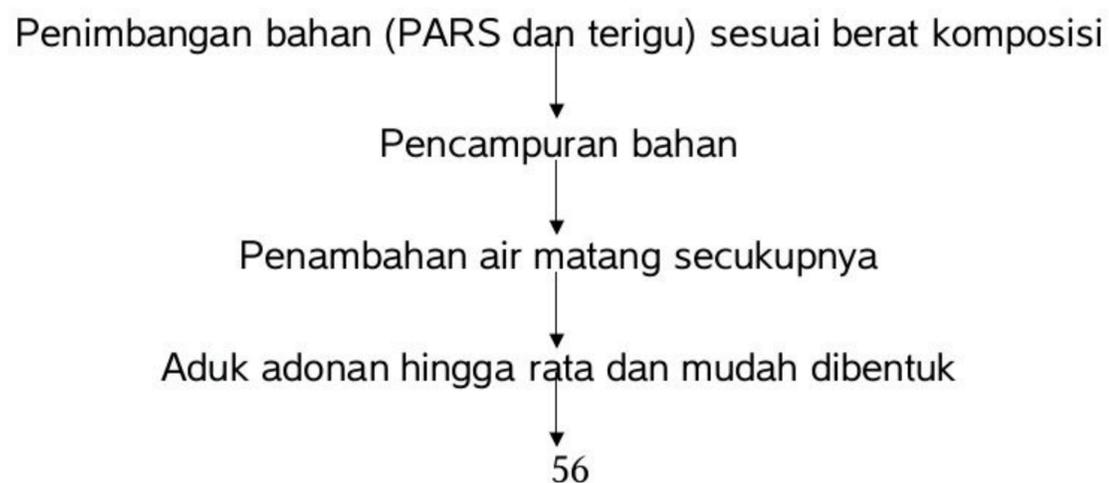
4.7.4 Prosedur Pemberian Bubuk Kayu Manis

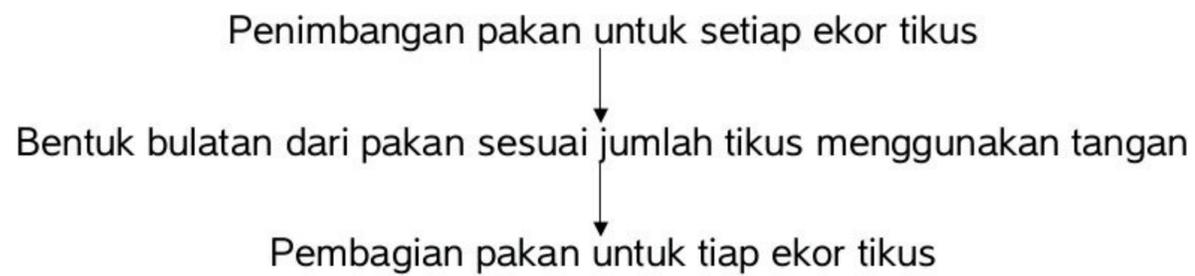
Bubuk kayu manis yang telah diukur sesuai perlakuan dilarutkan kedalam 2 ml air hangat, kemudian diberikan kepada tikus dengan menggunakan sonde yang diberikan sekali sehari. Penambahan air sebanyak 2 ml didasarkan kemampuan maksimal lambung tikus adalah 4 ml (Wilanti, 2008). Bubuk kayu manis diberikan kepada kelompok tikus P1, P2, dan P3 setiap hari selama 30 hari.

4.7.5 Prosedur Penimbangan Berat Badan Tikus

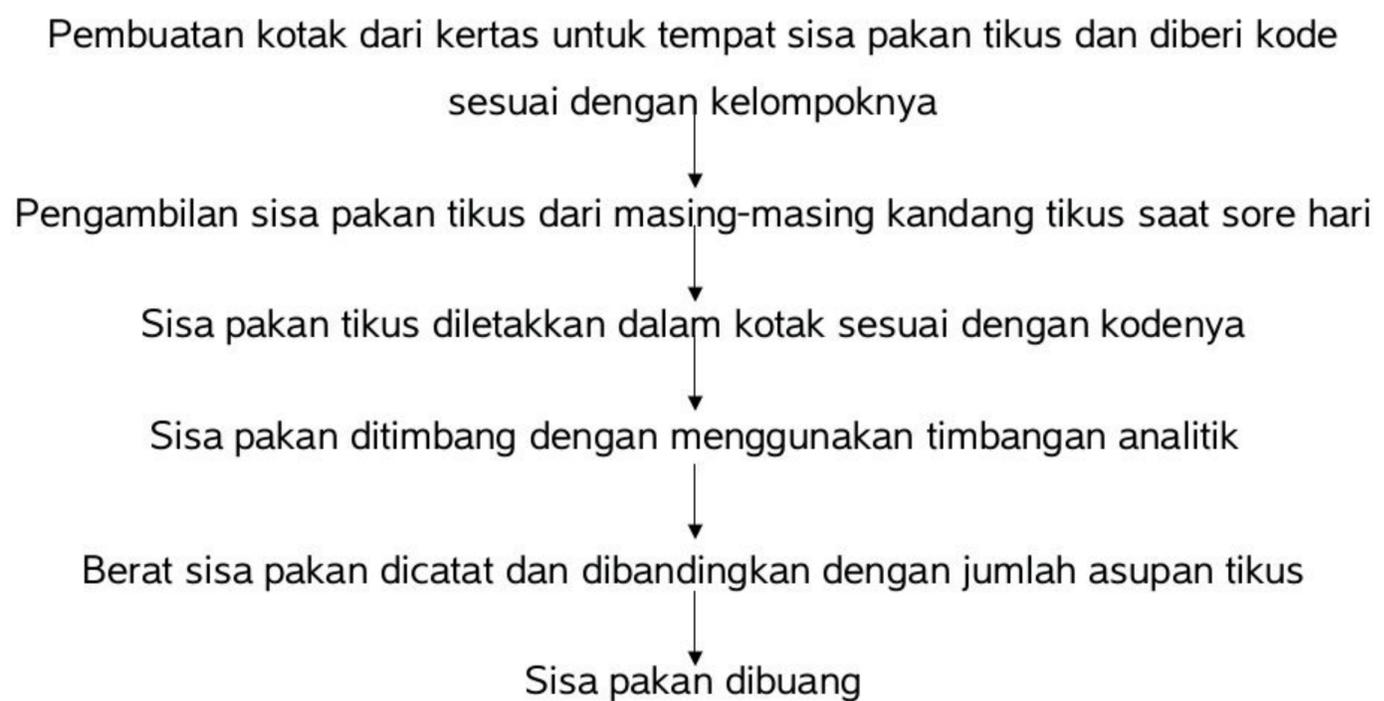


4.7.6 Prosedur Pembuatan Pakan





4.7.7 Prosedur Penimbangan Sisa Pakan Tikus

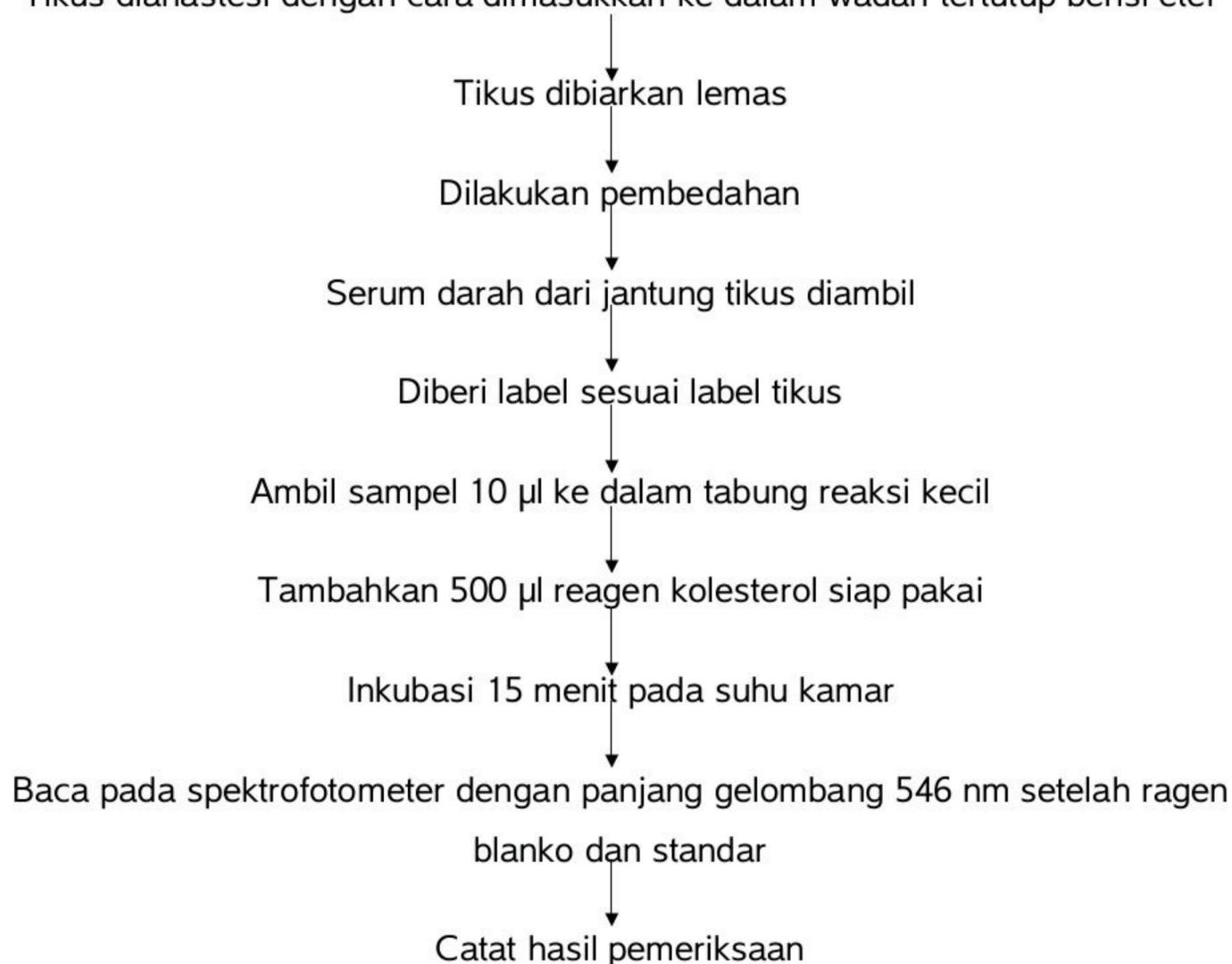


4.7.8 Prosedur Permodelan Tikus Diabetik

Pertama-tama tikus yang telah dipersiapkan diukur berat badannya dan diukur kadar glukosa darah sewaktu apakah normal atau tidak. Kemudian tikus diinjeksi dengan streptozotocin secara intravena atau intraperitoneal dengan dosis 55 mg/kg BB. Dilakukan perawatan tikus dan pemberian makan seperti biasa. Kandang dan air minum diganti setiap hari. 3 x 24 jam setelah diinjeksi streptozotocin, tikus diukur kadar glukosa darah sewaktu. Tikus dinyatakan positif diabetes melitus jika kadar glukosa darah ≥ 300 mg/dl.

4.7.9 Prosedur Pemeriksaan Kadar Kolesterol Darah Tikus

Tikus dianastesi dengan cara dimasukkan ke dalam wadah tertutup berisi eter



Sumber : Laboratorium Kawi 31. 2009. Diagram Alir Pemeriksaan Kolesterol darah Tikus.

4.7.10. Prosedur Perlakuan Hewan Coba Pasca Penelitian

Tikus dianastesi dengan cara dimasukkan ke dalam wadah tertutup berisi eter. Kemudian dibiarkan lemas dan setelah itu dilakukan pembedahan guna

mengambil serum darah tikus melalui jantung. Tikus yang telah selesai mengalami proses pembedahan kemudian dikuburkan.

4.7.11 Prosedur Penggunaan Alat Cobas Mira

- a. Hidupkan alat dengan menghubungkan alat dengan *stop kontak*.
- b. Tunggu ± 15 menit hingga suhu di dalam alat mencapai 37°C .
- c. Siapkan alat dan bahan yang dibutuhkan.
- d. Lakukan pencucian alat dengan cara tekan tombol INFO - tombol numerik 6 (*wash*) - tombol numerik 1 (*down*) dan tombol F1 (*start*).
- e. Tunggu ± 2 menit hingga dilakukan pencucian oleh alat sebanyak 3x.
- f. Tekan F1 (*stop*) untuk menghentikan proses pencucian, tekan tombol STATUS untuk kembali ke menu awal.
- g. Masukkan reagen yang akan digunakan ke dalam *cup* reagen dan tempatkan di rak reagen yang sudah disediakan.
- h. Masukkan sampel (serum) ke dalam *cup* sampel dan letakkan di rak sampel sesuai nomor urut.
- i. Letakkan masing-masing rak ke tempat Cobas Mira yang telah tersedia.
- j. Untuk pemeriksa sampel, tekan tombol ROUTINE - NO SAMPEL - ENTER.
- k. Masukkan KODE - ENTER.
- l. Tekan tombol TEST/PARAMETER yang akan diperiksa (contoh : chol untuk pemeriksaan kolesterol), tekan ENTER - START.
- m. Tunggu hingga alat selesai memproses.
- n. Lihat hasil dengan cara menekan tombol INFO, numerik 2 (interm report).

4.8 Analisis Data

Analisa data hasil penelitian menggunakan metode *One Way ANOVA* dengan menggunakan *software SPSS 17 for windows* dengan tingkat kepercayaan 0.05. Dalam melakukan analisa dengan menggunakan SPSS, terlebih dahulu harus diketahui apakah data tersebut memiliki distribusi normal atau tidak. Hal ini disebabkan pemilihan penyajian data dan uji hipotesis yang akan dipakai bergantung dari normal atau tidaknya suatu data. Untuk penyajian data, bila distribusi normal dianjurkan untuk menggunakan mean dan standar deviasi. Sedangkan bila distribusi data tidak normal, dianjurkan untuk menggunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika distribusi data normal, dapat menggunakan uji parametrik. Bila distribusi data tidak normal dapat menggunakan uji non parametrik (Dahlan, 2008).

Ada beberapa metode dalam menentukan apakah suatu data memiliki distribusi normal atau tidak, diantaranya adalah dengan menggunakan metode deskriptif dan analitik. Metode deskriptif menggunakan parameter koefisien varian, rasio skewness, rasio kurtosis, histogram, box plot, normal Q-Q plots, dan detrended Q-Q plots. Metode analitis menggunakan parameter Kolmogrov-Smirnov dan Shapiro-Wilk. Dalam penelitian ini, metode yang digunakan untuk menguji kenormalan distribusi data adalah metode analitis. Hal ini disebabkan dibandingkan dengan menghitung nilai koefisien varian, rasio skewness, maupun rasio kurtosis, uji Kolmogrov-Smirnov dan Shapiro-Wilk adalah uji yang lebih sensitif. Selain itu, dibandingkan dengan metode melihat histogram, box plot, normal Q-Q plots, maupun detrended Q-Q plots, metode analitis lebih obyektif. Jika menggunakan plots atau histogram, ada kemungkinan terjadinya perbedaan

intepretasi dalam pembacaan data antara satu orang dengan yang lainnya, sehingga dapat menghasilkan kesimpulan yang berbeda-beda (Dahlan, 2008).

Dari dua metode analitis yang ada, yaitu Kolmogrov-Smirnov dan Shapiro-Wilk, peneliti menggunakan uji Shapiro-Wilk. Hal ini disebabkan uji Kolmogrov-Smirnov lebih cocok digunakan untuk sampel dengan jumlah besar, yaitu > 50 . Karena dalam penelitian ini, jumlah sampel hanya 31, maka lebih cocok menggunakan metode Shapiro-Wilk yang memang lebih cocok untuk sampel dengan jumlah kecil, yaitu ≤ 50 (Dahlan, 2008).

Syarat dalam melakukan uji *One Way ANOVA* adalah data yang digunakan harus memiliki distribusi normal dan varians data harus sama. Karena data kolesterol memiliki distribusi data normal, sehingga langkah selanjutnya yang harus dilakukan adalah melihat kesamaan varians data. Apabila hasil kesamaan varians data ($p < 0.05$), dapat ditarik kesimpulan bahwa paling tidak terdapat dua kelompok yang mempunyai varians data yang berbeda secara bermakna. Atau dengan kata lain, karena varians data tidak sama, maka hasil uji ANOVA tidak valid. Maka selanjutnya harus dilakukan transformasi data agar varians data sama. Kriteria distribusi suatu data dikatakan normal menurut uji Shapiro-Wilk adalah apabila memiliki nilai kemaknaan ($p/\text{sig.}$) > 0.05 (Dahlan, 2008).

Apabila hasil uji kesamaan varians data memiliki $p < 0.05$, maka dikatakan varians data tidak sama sehingga hasil uji *One Way ANOVA* tidak valid. Karena varians kelompok data yang dibandingkan tidak sama, maka harus dilakukan transformasi data. Dalam menentukan jenis transformasi, dapat dilakukan dengan panduan nilai slope and power. Ada beberapa jenis transformasi yang dapat dipilih, misalnya *square* (kuadrat), *square root* (akar), logaritma, *1/square*

root, ataupun menggunakan *reciprocal* ($1/n$). Tidak ada panduan baku dalam memilih bentuk transformasi yang akan digunakan, sehingga harus dilakukan beberapa kali percobaan dalam melakukan transformasi data (Dahlan, 2008).

Setelah dilakukan transformasi data, dilanjutkan dengan melakukan uji kesamaan varians data untuk mengetahui apakah data tersebut sudah memiliki kesamaan varians atau belum. Bila nilai $p > 0.05$ maka dapat diambil kesimpulan bahwa tidak ada perbedaan varians antara kelompok data yang dibandingkan. Atau dengan kata lain, varians data adalah sama. Karena varians data sama, maka uji ANOVA dikatakan valid (Dahlan, 2008).

Untuk melihat kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna, dilakukan analisis Post Hoc. Ada beberapa alternatif yang dapat dipilih dalam melakukan Post Hoc Test, diantaranya adalah LSD, Bonferroni, Sidak, Scheffe, R-E-G-W-F, R-E-G-W-Q, S-N-K, Tukey, Tukey's-b, Duncan, Hochberg's GT2, dan Gabriel. Tidak ada ketentuan pasti mana alternatif yang harus dipilih, karena hasilnya relatif sama antara satu dengan yang lainnya. Hasil Post Hoc Test bila < 0.05 dikatakan memiliki perbedaan, sementara bila hasilnya > 0.05 dikatakan tidak memiliki perbedaan. Selanjutnya untuk mengetahui kekuatan hubungan antara peningkatan pemberian bubuk kayu manis dengan kadar kolesterol tikus dilakukan uji Pearson (Dahlan, 2008).