

## BAB IV

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorik *in vivo* terhadap tikus putih dengan 3 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol. Penelitian bersifat preventif sehingga dilaksanakan dengan *Post test Only Controlled Group Design*. Dengan metode ini peneliti dapat membandingkan kelompok eksperimental dengan kelompok kontrol. Pemilihan objek penelitian untuk pengelompokan dalam perlakuan menggunakan metode *Simple Random Sampling* karena tikus, bahan pakan tikus dan tempat penelitian dapat dikatakan homogen.

##### 4.1.1 Post Test Only Control Group Design

Rancangan penelitian menggunakan *post test* dengan kelompok kontrol dan kelompok eksperimen. Dengan randomisasi, maka kedua kelompok mempunyai sifat yang sama pada awalnya, sehingga perbedaan hasil *post test* pada kedua kelompok tersebut dapat dianggap sebagai pengaruh dari intervensi atau perlakuan yang diberikan. Rancangan ini melibatkan lebih dari 1 variabel bebas. Sehingga perlakuan dilakukan pada lebih dari 1 kelompok eksperimen, dengan perlakuan yang berbeda (Notoadmodjo, 2005). Objek penelitian yang dipakai adalah tikus jantan *Rattus Novergicus strain Wistar* dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Tiap kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor tikus.

##### 4.1.2 Penentuan Perlakuan

Pada rancangan penelitian ini, sampel dibagi kedalam 5 kelompok perlakuan, yaitu :



- Perlakuan I : Pemberian diet normal (kelompok kontrol negatif), yaitu tikus yang tidak diinduksi STZ dan tidak diberi diet tinggi lemak
- Perlakuan II : Pemberian *high fat diet*, kemudian tikus diinduksi STZ (kelompok kontrol positif) namun tidak diterapi dengan susu sapi bubuk
- Perlakuan III : Pemberian *high fat diet*, kemudian tikus diinduksi STZ dan diberikan terapi susu sapi bubuk dengan kandungan vitamin D 9 IU dan kalsium 10,8 mg (susu sapi bubuk 0,9 gram)
- Perlakuan IV : Pemberian *high fat diet*, kemudian tikus diinduksi STZ dan diberikan terapi susu sapi bubuk dengan kandungan vitamin D 18 IU dan kalsium 21,6 mg (susu sapi bubuk 1,8 gram)
- Perlakuan V : Pemberian *high fat diet*, kemudian tikus diinduksi STZ dan diberikan terapi susu sapi bubuk dengan kandungan vitamin D 27 IU dan kalsium 32,4 mg (susu sapi bubuk 2,7 gram)

## 4.2 Populasi dan Sampel

### 4.2.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah hewan coba tikus putih atau *Rattus Novergicus strain Wistar*. pemilihan hewan coba ini dikarenakan sifatnya sebagai hewan coba memiliki keterdekatan dengan manusia. Selain itu tikus putih merupakan hewan mamalia pemakan segala (omnivora) yang mudah berkembang biak dan

mudah mendapat perlakuan. Tikus putih juga memiliki struktur esophagus yang langsung bermuara ke lambung, sehingga tidak dapat memuntahkan makanannya dan tidak memiliki kandung empedu.

#### 4.2.2 Kriteria Inklusi

1. Tikus putih (*Rattus Norvegicus strain Wistar*) jantan pemilihan hanya satu jenis kelamin agar sampel bersifat homogen. pemilihan jenis kelamin jantan untuk meminimalkan faktor pengganggu metabolisme lipid misalnya adanya hormon estrogen.
2. Usia 2 – 3 bulan
3. Berat badan 150 – 250 gram
4. Sehat, tingkah laku dan aktivitas normal
5. Bulu putih, halus dan mengkilat
6. GDA <126 mg/dL

#### 4.2.3 Kriteria Eksklusi

1. Tikus cacat tidak bergerak aktif dan tampak sakit
2. Tikus yang selama penelitian tidak mau makan
3. Tikus yang sebelumnya pernah digunakan untuk eksperimen lain
4. GDA >126 mg/dL

#### 4.2.4 Perhitungan Sampel

Perhitungan jumlah sampel berdasarkan rumus Kemas (2005) adalah sebagai berikut :

$$[(t - 1)(n - 1)] \geq 15$$

Dimana :

n = jumlah pengulangan/besar sampel dalam kelompok

t = jumlah perlakuan/banyaknya kelompok (5 kelompok)

maka jumlah sampel yang dibutuhkan dalam kelompok adalah :

$$[(t - 1)(n - 1)] \geq 15$$

$$[(5 - 1)(n - 1)] \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 \text{ dibulatkan menjadi } 5$$

Jumlah sampel untuk 5 kelompok adalah  $5 \times 5 = 25$  ekor tikus. Jumlah 25 ekor tikus adalah jumlah minimal sampel. Peneliti menambahkan 1 ekor tikus sebagai cadangan untuk tiap kelompok maka total jumlah sampel adalah 30 ekor tikus dengan 6 ekor tikus tiap kelompok perlakuan.

#### 4.2.5 Randomisasi Sampel

Seluruh tikus sampel yang tersedia dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan berdasarkan *Simple Random Sampling* sehingga tiap tikus memiliki peluang yang sama untuk semua kelompok. Teknik *Simple Random Sampling* dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Memberikan bilangan acak pada tiap tikus. Umumnya menggunakan 3 angka acak.
2. Memberi ranking pada tiap tikus sesuai angka acak yang telah dibuat. Angka ranking ini menjadi kode untuk tiap tikus.
3. Mengelompokkan tikus menjadi 5 kelompok berdasarkan angka ranking.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah dosis vitamin D dan kalsium dalam susu sapi bubuk.

### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah kadar interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) yang terdapat pada organ pankreas.

### 4.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar objek penelitian selalu terkontrol dan dalam keadaan homogen. Variabel kontrol dalam penelitian ini, yaitu : jenis tikus, umur tikus, jenis kelamin tikus, berat badan awal tikus, pemberian diet atherogenik, kondisi lingkungan kandang dan pemberian susu sapi bubuk dicampurkan pada pakan hewan coba.

## 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

### 4.4.1 Lokasi Penelitian

1. Perawatan tikus dilakukan di Laboratorium Studi Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya.
2. Pengukuran kadar interleukin-1 $\beta$  dilakukan di Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan kurang lebih 90 hari mulai September–Desember 2013

## 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

### 4.5.1 Alat Penelitian

1. Alat untuk pemeliharaan binatang coba adalah bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm, tutup kandang dari anyaman kawat berukuran 36,5 cm x 28 cm x 15,5 cm, botol air, dan sekam.

2. Alat untuk pembuatan ransum adalah timbangan, neraca analitik, mangkok plastik, gelas ukur, nampan dan sarung tangan plastik.
3. Alat untuk pembuatan larutan streptozotocin adalah *vortex*.
4. Alat untuk injeksi larutan streptozotocin adalah spuit.
5. Alat untuk pengukuran glukosa darah tikus adalah jarum dan alat pengukur glukosa digital.
6. Alat untuk pembedahan adalah gunting bedah (lurus panjang, lurus pendek dan bengkok), pinset, cawan petri, pins, beker glass, kertas saring.
7. Alat untuk pemeriksaan kadar interleukin-1 $\beta$  adalah ELISA *washer*, *multichanel* mikropipet dan mikrotip, botol sprayer, timbangan analitik dan refrigerator bersuhu 4°C.
8. Alat untuk pengukuran kadar interleukin-1 $\beta$  adalah *microplate* ELISA, spektrofotometer dan ELISA *reader*.

#### 4.5.2 Bahan Penelitian

##### 4.5.2.1 Bahan Pakan Tikus

1. Diet Normal

Pakan normal yang terdiri dari comfeed PARS 53% (dengan kandungan protein 11 %, lemak 4 %) dan tepung terigu 23,5 %, dan air 23,5 %.

2. *High Fat Diet*

High Fat Diet diberikan 40 gram setiap hari per tikus. Komposisi High Fat Diet adalah sebagai berikut :

Tabel 4.1 Komposisi High Fat Diet

Bahan	Persentase (%)	Berat (Gram)
Comfeed PARS	50	20 gram
Tepung terigu	25	10 gram
Kuning telur bebek	5	2 gram
Lemak kambing	10	4 gram
Minyak kelapa	1	0.4 gram
Minyak babi	8.9	3.55 gram
Asam kolat	0.1	0.05 gram
TOTAL	100	40 gram

### 3. Susu Bubuk

Susu bubuk yang digunakan merupakan susu bubuk dengan kandungan vitamin D yang tinggi dan memiliki rasio kandungan yang mendekati anjuran optimal untuk menurunkan resiko diabetes melitus tipe 2. Susu bubuk yang digunakan adalah susu bubuk komersial buatan pabrik dengan kandungan vitamin D sebesar 400 IU dan kalsium sebesar 500 mg dalam setiap sajian 40 gram susu bubuk. Pemberian Susu sapi bubuk akan dicampurkan kedalam pakan tikus.

### 4. Larutan STZ

Streptozotocin (STZ) 100 gram dilarutkan dengan 3 ml buffer sitrat dengan pH 4,5

#### 4.5.2.2 Bahan Pemeriksaan Kadar Interleukin-1 $\beta$

Pemeriksaan kadar interleukin-1 $\beta$  pada sampel organ pankreas tikus menggunakan bahan sebagai berikut :

1. Organ pankreas
2. Coating buffer 50  $\mu$ L

3. PBS Tween 0,2% 50  $\mu$ L
4. BSA 1% 50  $\mu$ L/well
5. Human anti IL-1 $\beta$
6. IgG biotin anti human
7. Streptatidin Horseradish (SA HRP)
8. Tetra Methyl Benzidine (TMB)
9. HCl 1 N

#### **4.6 Definisi Operasional**

##### **4.6.1 Tikus Model Diabetik Induksi Streptozotocin (STZ)**

Pada tikus percobaan dilakukan prosedur pemberian MLD-STZ dosis 40mg/kgBB. Indikasi keberhasilan induksi diabetes pada tikus galur wistar dengan penyuntikan STZ adalah kadar glukosa darah yang mencapai  $\geq$  200 mg/dL selama dua hari berturut-turut (Amirshahrokhi, 2008).

##### **4.6.2 Vitamin D**

Merupakan gabungan substansi yang terdiri dari dua molekul sekodteroid ergokalsiferol (vitamin D<sub>2</sub>) dan kolekalsiferol (vitamin D<sub>3</sub>). Vitamin D didapatkan dari sumber eksogen (makanan) dan sumber endogen, khususnya paparan sinar UVB dari matahari yang akan diubah menjadi bentuk aktif (kalsitriol) melalui hidrosilasi di hepar maupun ginjal. Jika kadar vitamin D di dalam tubuh rendah, maka berpengaruh pula terhadap absorpsi kalsium di usus halus yang menyebabkan terjadinya osteoporosis dan kerapuhan tulang dan mengakibatkan terjadinya. fraktur tulang (Cangoz, 2013).

#### 4.6.3 Kalsium

Merupakan salah satu mineral terpenting dalam tubuh manusia yang berperan dalam proses pembentukan tulang dan gigi, dalam proses pembentukan darah, serta proses metabolisme tubuh. Kalsium didapatkan dari sumber eksogen (makanan). Didalam tulang kalsium berbentuk sebagai *hydroxyapatite*  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , dan dalam darah kalsium berbentuk *ionized Ca*  $[Ca^{2+}]$  (Murray *et al*, 2006).

#### 4.6.4 Kadar Interleukin-1 $\beta$

Konsentrasi interleukin-1 $\beta$  yang terdapat pada organ pankreas dari hewan coba, yang diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 450nm (Widya, 2012).

### 4.7 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data

#### 4.7.1 Perlakuan pada Tikus Percobaan

1. Awal percobaan semua tikus ditimbang berat badannya kemudian dilakukan randomisasi dengan Rancangan Acak Lengkap agar setiap tikus mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan perlakuan.
2. Tikus dilakukan masa adaptasi selama 5 hari sebelum perlakuan. Pada masa adaptasi tikus diberi pakan normal dan minuman secara *ad libitum* dan ditimbang berat badannya sebelum dan setelah adaptasi untuk memastikan berat badan tikus tidak mengalami penurunan dan berada dalam kondisi baik.
3. Tikus putih dibagi menjadi lima kelompok berdasarkan teknik randomisasi *Simple Random Sampling* yaitu :
  1. Kelompok kontrol negatif yang tidak diinduksi oleh STZ dan diberi pakan normal

2. Kelompok kontrol positif yang diinduksi oleh STZ dan diberi *high fat diet* namun tidak diberikan susu sapi bubuk
3. Kelompok perlakuan 1 yang diinduksi oleh STZ dan diberi *high fat diet* dan diberikan susu sapi bubuk dengan kandungan vitamin D sebesar 9 IU dan kalsium sebesar 10,8 mg (susu sapi bubuk 0,9 gram)
4. Kelompok perlakuan 2 yang diinduksi oleh STZ dan diberi *high fat diet* dan diberikan susu sapi bubuk dengan kandungan vitamin D sebesar 18 IU dan kalsium sebesar 21,6 mg (susu sapi bubuk 1,8 gram)
5. Kelompok perlakuan 3 yang diinduksi oleh STZ dan diberi *high fat diet* dan diberikan susu sapi bubuk dengan kandungan vitamin D sebesar 27 IU dan kalsium sebesar 32,4 mg (susu sapi bubuk 2,7 gram).

Adanya kelompok kontrol negatif untuk memastikan bahwa akan terjadi perubahan kadar interleukin-1 $\beta$  setelah diberi induksi STZ

4. Tikus diberi diet tinggi lemak terlebih dahulu selama 4 minggu, kemudian dilanjutkan diet normal selama 8 minggu dengan diberi terapi susu sapi bubuk sesuai dengan kelompok perlakuan. Semua diet dan minuman diberikan secara *ad libitum*.
5. Dilakukan penimbangan sisa makanan pada tiap tikus tiap kelompok perlakuan setiap hari dan penimbangan berat badan tikus setiap minggu. Sedangkan pergantian sekam 2 kali setiap 1 minggu.
6. Pada akhir percobaan dilakukan pengukuran kadar interleukin-1 $\beta$  pankreas pada seluruh tikus percobaan.

#### 4.7.2 Pembuatan dan Pemberian Pakan Standar

Proses pembuatan pakan diet normal tikus dengan cara sebagai berikut :

1. Menimbang bahan (PARS dan terigu).
2. Mencampur bahan, menambahkan air secukupnya dan diaduk rata.
3. Membentuk pakan bulatan dan ditimbang 40 gram untuk per tikus per hari.

Proses pembuatan diet normal dan susu dengan cara sebagai berikut :

- 1 Menimbang bahan (PARS dan terigu).
- 2 Mencampur bahan, menambahkan air secukupnya dan diaduk rata.
- 3 Membentuk pakan bulatan dan ditimbang 40 gram untuk per tikus per hari.
- 4 Susu ditimbang untuk satu per satu pakan
- 5 Kurangkan pakan normal agar isokalorik (Perlakuan 1 dikurangi 1,37 gram, perlakuan 2 dikurangi 2,74 gram, perlakuan 3 dikurangi 4,12 gram)
- 6 Campurkan susu dalam bulatan pakan yang telah dihancurkan
- 7 Bentuk bulatan kembali

#### 4.7.3 Proses Pembuatan Tikus Wistar Model Diabetes Tipe II Induksi STZ

##### 4.7.3.1 Pemberian Pakan Tinggi Lemak (*High Fat Diet*)

Proses pembuatan pakan HFD tikus dengan cara sebagai berikut :

1. Menimbang bahan (PARS, terigu, kuning telur bebek, lemak kambing, minyak kelapa, minyak babi, asam kolat).
2. Mencampur bahan, diaduk rata dan ditimbang 40 gram untuk per tikus per hari.
3. Pakan ditambahkan air hingga dapat dibentuk bulatan.

#### 4.7.3.2 Proses Pembuatan Larutan STZ

1. Streptozotocin (STZ) 100 gram dilarutkan dalam 3 ml buffer sitrat 0,1 M dengan pH 4,5
2. Larutkan divortex hingga homogen
3. Larutan STZ disimpan pada suhu 4°C

#### 4.7.3.3 Induksi Larutan STZ pada Tikus Wistar

1. Berat badan tikus ditimbang
2. Larutan STZ 40 mg/kgBB diinjeksikan secara intraperitoneal (IP) sampai tikus memiliki kadar gula darah >200 mg/dL selama 2 hari berturut-turut
3. Tikus diposisikan menghadap ke arah frontal hingga terlihat bagian abdomennya
4. Pada bagian atas abdomen tikus disemprotkan alkohol 70%, kulit dicubit hingga terasa bagian ototnya
5. Spuit dimasukkan pada bagian abdomen dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka sudah masuk pada daerah interperitoneal
6. Segera STZ diinjeksi secara perlahan, selanjutnya abdomen tikus disemprot dengan etanol 70% kembali
7. Setelah injeksi STZ, diukur kadar glukosa darah sewaktu. Tikus dinyatakan positif DM jika kadar glukosa darah  $\geq 200$  mg/dL.

#### 4.7.4 Pemeriksaan Glukosa Darah Tikus

1. Tikus dipegang
2. Ujung ekor diberi alkohol dan ditusuk jarum
3. Ekor diurut ke distal sehingga darah keluar melalui ujung luka

4. Darah ditempelkan di stik yang ditempelkan pada alat ukur digital, kemudian dilihat hasilnya.

#### 4.7.5 Pengukuran Kadar Interleukin-1 $\beta$

1. Pada akhir minggu ke-10 tikus dianastesi dengan cara dimasukkan ke dalam kotak yang telah diisi dengan eter absolute (eter ditaruh pada kapas), ditunggu hingga tikus dalam keadaan tidak sadar (pingsan)
2. Dilakukan pembedahan oleh tenaga analis yang berpengalaman dengan cara
  - a. Tikus yang telah pingsan ditaruh pada kotak lilin
  - b. Tikus dalam posisi telentang dengan kondisi kaki dan tangan dijepit dengan jarum pentul
  - c. Dilakukan pembedahan dengan cara dibedah pada bagian bawah perut sampai daerah dada
  - d. Organ yang diambil adalah organ pankreas
3. Inteleukin-1 $\beta$  diambil dari organ yakni Pankreas
4. Organ pankreas dihancurkan hingga halus
5. Ditambahkan dengan lisis buffer
6. Inkubasi selama 30 menit dengan suhu 4°C
7. Sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 RPM
8. Ambil bagian supernatan
9. Coating bagian supernatan jaringan pankreas tersebut dengan penambahan Coating antigen pada piring mikrotubes dengan mencampur serum dengan Coating buffer 50  $\mu$ L dengan perbandingan 1 : 20

10. Inkubasi pada suhu 4°C selama satu malam
11. Cuci dengan PBS Tween 0,2% 50 µL sebanyak 3 kali, masing-masing 3 menit
12. Blok dengan bloking buffer (BSA 1% dalam PBS) 50 µl/well
13. Inkubasi selama 1 jam dalam suhu ruang
14. Cuci dengan PBS Tween 0,2% 50 µL sebanyak 3 kali, masing – masing 3 menit
15. Ditambahkan antibodi primer (human anti IL-1β → cross reaction dengan rat) dengan perbandingan 1:500 dalam PBS
16. Inkubasi selama 1 jam dalam suhu ruang
17. Cuci dengan PBS Tween 0,2% 50 µL sebanyak 3 kali, masing – masing 3 menit
18. Ditambahkan antibodi sekunder (IgG biotin anti human) 1 : 1000 dalam PBS
19. Inkubasi selama 1 jam dalam suhu ruang
20. Cuci dengan PBS Tween 0,2% 50 µL sebanyak 3 kali, masing – masing 3 menit
21. Ditambahkan SA HRP (Streptatidin Horseradish) (enzim) 1:1000
22. Inkubasi selama 1 jam dalam suhu ruang
23. Cuci dengan PBS Tween 0,2% 50 µL sebanyak 3 kali, masing – masing 3 menit
24. Ditambahkan substrat TMB (Tetra Methyl Benzidine)
25. Inkubasi 30 menit dalam suhu ruang (dark room)
26. Reaksi dihentikan dengan HCl 1 N
27. Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang

28. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) dengan ELISA *READER*.

#### 4.8 Perhitungan Dosis Susu Sapi

Perhitungan dosis:

Rata-rata berat badan manusia dewasa = 70 kg = 70.000 gram

Rata-rata berat badan tikus = 0,2 kg = 200 gram

Kebutuhan vitamin D yang esensial untuk DM menurut Nikooyeh (2011) adalah sebesar 1000 IU, dimana diketahui 1 IU = 0,025 mcg dan 1 mcg = 40 IU (Mahan, 2008). Sedangkan, Kebutuhan kalsium yang esensial untuk DM menurut Pittas (2006) adalah sebesar >1200 mg.

Berdasarkan tabel konversi dosis, diketahui indeks konversi dosis dari manusia (dengan berat badan 70 kg) ke tikus (dengan berat badan 200 gram) adalah sebesar 0,018 kali dosis pada manusia (Harmita, dkk, 2008), maka diperoleh dosis untuk tikus:

Kebutuhan vitamin D optimal tikus = 1000IU/hari x 0,018 = 18 IU/hari

Kebutuhan kalsium optimal tikus = 1200 mg/hari x 0,018 = 21,6 mg/hari

Perbandingan kandungan vitamin D dan kalsium dengan menggunakan deret hitung seperti pada tabel 4.3

Tabel 4.3 Perbandingan Kandungan vitamin D dan Kalsium untuk Manusia

	P1	P2	P3
Vitamin D (IU)	500	1000	1500
Kalsium (mg)	600	1200	1800

Dari tabel di atas, kemudian dikonversikan ke dalam kebutuhan tikus seperti pada tabel 4.4 berikut

Tabel 4.4 Perbandingan Kandungan vitamin D dan Kalsium untuk Tikus

	P1	P2	P3
Vitamin D (IU)	9	18	27
Kalsium (mg)	10,8	21,6	32,4

Dalam 40 gram (satu sajian) susu bubuk buatan pabrik yang akan digunakan dalam penelitian ini mengandung 400 IU vitamin D dan 500 mg Ca, sehingga perhitungan susu bubuk yang akan diberikan adalah:

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{kebutuhan VTD tikus}}{\text{kandungan VTD dalam susu bubuk}} \times 40 \text{ g} \\
 &= \frac{18}{400} \times 40 \text{ g} \\
 &= 1,8 \text{ g}
 \end{aligned}$$

Pemberian susu bubuk yang optimal (dengan kandungan vitamin D dan kalsium yang optimal) adalah sebesar 1,8 gram. Dengan begitu maka pemberian susu bubuk berturut-turut dari perlakuan (P)1 hingga perlakuan (P)3 adalah 0,9 gram; 1,8 gram; dan 2,7 gram. Pada manusia Upper Level (UL) vitamin D adalah 2000 IU dan kalsium 2500 mg. sehingga bila dikonversi ke tikus UL vitamin D 36 IU dan kalsium 45 gram.

#### 4.9 Analisis Data

Data yang didapat dianalisis dengan program SPSS 16. Data yang didapatkan pertama kali dilakukan uji normalitas, untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak, karena pemilihan penyajian dan uji hipotesis tergantung dari hasil uji normalitas. Kemudian seluruh data diuji dengan *test of homogeneity of variances* untuk mengetahui bahwa semua data homogen. Kemudian dilanjutkan uji *one-way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan kadar interleukin-1 $\beta$  antar kelompok. Uji Anova

mensyaratkan data harus berdistribusi normal dan varian homogen. Jika terdapat perbedaan maka dapat dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tuckey* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok. Uji statistik dilakukan dilakukan pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ), perbedaan dikatakan bermakna jika  $p < 0,05$ .

Jika data tidak homogen dan atau tidak berdistribusi normal maka menggunakan uji statistik *Kruskal Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan median dengan  $\alpha = 0,05$  dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui letak perbedaan tersebut ( $p < 0,05$ ).



4.10 Alur Penelitian

Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian

