

BAB 4

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 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* dan tikus yang diinduksi STZ (kelompok kontrol positif) namun tidak diberi susu sapi bubuk

Perlakuan III : Pemberian *high fat diet* dan tikus yang diinduksi STZ dan diberikan 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* dan tikus yang diinduksi STZ dan diberikan 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* dan tikus yang diinduksi STZ dan diberikan susu sapi bubuk dengan kandungan vitamin D 27 IU dan kalsium 82,4 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 esterogen.

2. Usia 2 – 3 bulan
3. Berat badan 150-250 gram
4. Sehat, tingkah laku dan aktifitas normal
5. Bulu putih, halus, dan mengkilat
6. Kadar gula darah acak <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. Kadar gula darah acak >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 susu sapi bubuk sebagai sumber vitamin D

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah kadar adiponektin dari jaringan adiposa

4.3.3 Variabel Terkendali

Variabel kendali adalah variabel yang dapat dikendalikan oleh peneliti agar objek penelitian selalu terkontrol dan dalam keadaan homogen. Variabel kendali dalam penelitian ini, yaitu : jenis tikus, umur tikus, jenis kelamin tikus, berat badan awal, pemberian diet, kondisi lingkungan kandang, dan pemberian per oral susu.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

1. Perawatan tikus dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya
2. Pengukuran kadar adiponektin 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 pemeliharaan binatang coba

bak plastic kaca bening berukuran 30 cm x 15 cm x 15 cm, dengan tutup kandang serupa yang disertai dengan besi stainless steel sebagai tempat meletakkan pakan tikus, botol air untuk minum binatang coba, sekam, dan timbangan torbal (torsion balance) dengan ketelitian 1 angka di belakang koma untuk menimbang berat badan tikus dengan satuan gram.

2. Alat pembuat pakan tikus

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, serbet, dan alat pengukur glukosa digital
6. Alat pengambilan sampel
Gunting dan pisau bedah (*mirror set*), alat bedah minor, spuit 5 ml, seperangkat tabung reaksi, kapas, dan stoples untuk pembiusan,
7. Alat pemeriksaan kadar adiponektin
ELISA kit, *vortex*, pipet, microplate, ELISA READER

4.5.2 Bahan Penelitian

4.5.2.1 Bahan Pakan Tikus

1. 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 sapi bubuk

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

4. Larutan STZ

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

4.5.2.2 Bahan Pemeriksaan Kadar Adiponektin

Bahan yang digunakan untuk pemeriksaan kadar adiponektin dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- | | |
|-------------------|---------------------------|
| 1) Coating buffer | 4) BSA |
| 2) PBS Tween | 5) Anti adiponektin |
| 3) PBS | 6) Anti Rabbit IgG Biotin |

- 7) Substrat TMP (Tetra Methyl Benzidine)
- 8) SA HRP (Streptavidin Horseradish)
- 9) HCl 1 N

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Tikus Model Diabetes Mellitus Tipe 2

Pada tikus percobaan dilakukan prosedur pemberian SLD-STZ dosis 40 mg/kgBB. Indikasi keberhasilan induksi diabetes pada tikus galur wistar dengan penyuntikan STZ adalah kadar glukosa darah yang mencapai ≥ 200 mg/dL setelah 2-4 hari induksi STZ (Amirshahrokhi, 2008).

4.6.2 Susu Sapi Bubuk

Susu sapi bubuk merupakan bentuk olahan dari susu segar yang dibuat dengan cara memanaskan susu pada suhu 80° C selama 30 detik, kemudian dilakukan proses pengolahan dengan beberapa tahapan yaitu ecaporasi, homogenisasi, dan pengeringan yang dilakuakn dengan menggunakan *spray dryer* atau *roiler dryer*. Produk ini mengandung 2-4% air (Nasution, 2009). Berikut merupakan kandungan zat gizi susu sapi bubuk yang digunakan dalam penelitian

Tabel 4.2 Kandungan Gizi Susu Sapi Bubuk Komersial per 40 gram

Kandungan	Jumlah
Energi total	160 kkal
Lemak total	2,5 gr
Protein	6 gr
Karbohidrat total	28 gr
Natrium	115 mg
Kalium	230 mg
Vitamin A	1250 IU
Vitamin B1	0,4 mg
Vitamin B2	0,5 mg
Vitamin B3	6 mg
Vitamin B6	0,5 mg
Vitamin B12	1,5 mcg
Asam Folat	100 mcg
Vitamin C	15 mg
Vitamin D	400 IU
Vitamin E	15 mg
Kalsium	500 mg
Fosfor	110 mg
Seng	2,5 mg
Magnesium	16 mg
Besi	2,5 mg

4.6.3 Kadar Adiponektin

Protein plasma pada jaringan adiposa omentum yang diukur setelah melakukan puasa 8 jam. Pengukuran menggunakan ELISA KIT dan hasil pembacaan dalam piktoqram per mililiter (pg/ml).

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 7 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+Pakan normal
2. Kelompok kontrol positif yang diinduksi oleh STZ+*High fat diet* namun tidak diberikan terapi susu sapi bubuk
3. Kelompok perlakuan 1 yang diinduksi oleh STZ+*high fat diet* dan diberikan 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+*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+*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 adiponektin setelah diberi induksi STZ

6. 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*. Pemberian susu sapi bubuk akan dicampurkan ke dalam pakan tikus.

7. 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.
8. Pada akhir percobaan dilakukan pengukuran kadar adiponektin 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 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) dilarutkan dalam aquabidest buffer sitrat 0,1 M, pH 4,5
2. Larutan STZ selalu disiapkan dalam kondisi *fresh* untuk penggunaan dalam waktu 5 menit
3. Perhitungan kebutuhan STZ dan larutan STZ per tikus terdapat di lampiran

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 kearah frontal hingga terlihat bagian abdomennya
4. Pada bagian atas abdomen tikus disemprotkan alkohol 70%, kulit dicubit hingga terasa bagian otaknya

5. Spuit dimasukkan pada bagian abdomen dan dicoba digerakkan, apabila terasa berat maka sudah masuk pada daerah intraperitoneal.
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 > 200 mg/dL setelah 2-4 hari induksi STZ

4.7.4 Pemeriksaan Glukosa Darah Tikus

1. Tikus dipegang dengan kain
2. 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 Pengambilan Sel Lemak Tikus

Pada akhir penelitian hewan coba dieuthanasi menggunakan eter absolute (eter ditaruh pada kapas), kemudian ditunggu hingga tikus dalam keadaan tidak sadar (pingsan). Tikus yang telah tidak sadar ditaruh pada kotak lilin. Tikus dalam posisi terlentang dengan kondisi kaki dan tangan dijepit jarum pentul. Dilakukan pembedahan dengan cara dibedah pada bagian bawah perut sampai daerah dada. Kemudian jaringan lemak diambil dari omentum dan dicuci dengan PBS. Jaringan lemak tersebut kemudian ditimbang beratnya dengan menggunakan timbangan chyo. Hancurkan jaringan lemak hingga kadar halus tambahkan lisis buffer untuk mengisolasi protein jaringan lemak, kemudian inkubasi selama 30 menit dengan suhu 4⁰ C. Sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000

RPm. Ambil bagian supernatan, kemudian lanjutkan dengan metode ELISA.

4.7.6 Pengukuran Kadar Adiponektin

Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan tehnik imunohistokimia dengan metode ELISA (*Enzym Linked Immunosorbent Assay*). Antigen yang mula-mula diikatkan pada benda padat kemudian ditambahkan dengan antibodi yang bertanda enzim, akhirnya ditambahkan substrat kromogenik sehingga menimbulkan perubahan warna.

Rangkaian kerja dengan metode ELISA sebagai berikut :

1. Coating sel lemak dengan penambahan Coating antigen pada piring mikrotubes dengan mencampur sel lemak dengan Coating buffer 50 μ L dengan perbandingan 1:20
2. Inkubasi pada suhu 4^o C semalam
3. Cuci dengan PBS Tween 0,2% 50 μ L sebanyak 3 kali, masing-masing 3 menit
4. Blok dengan bloking buffer (BSA 1% dalam PBS) 50 μ L/well
5. Inkubasi selama 1 jam dalam suhu ruang
6. Cuci dengan PBS Tween 0,2% 50 μ L sebanyak 3 kali, masing – masing 3 menit
7. Tambahkan antibodi primer (Antibodi Adiponektin Mouse) dengan perbandingan 1:500 dalam PBS
8. Inkubasi selama 1 jam dalam suhu ruang
9. Cuci dengan PBS Tween 0,2% 50 μ L sebanyak 3 kali, masing – masing 3 menit

10. Tambahkan antibodi sekunder (Anti Rabbit IgG Biotin) 1:1000 dalam PBS
11. Inkubasi selama 1 jam dalam suhu ruang
12. Cuci dengan PBS Tween 0,2% 50 μ L sebanyak 3 kali, masing – masing 3 menit
13. Tambahkan SA HRP (Streptatidin Horseradish) (enzim) 1:1000
14. Inkubasi selama 1 jam dalam suhu ruang
15. Cuci dengan PBS Tween 0,2% 50 μ L sebanyak 3 kali, masing – masing 3 menit
16. Tambahkan substrat TMB (Tetra Methyl Benzidine)
17. Inkubasi 30 menit dalam suhu ruang (dark room)
18. Stop reaksi dengan HCl 1 N
19. Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang
20. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450 nm ($\lambda = 450$ nm) dengan ELISA READER

4.8 Perhitungan Dosis Susu Sapi Bubuk

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, 2008), maka diperoleh dosis untuk tikus:

Kebutuhan vitamin D optimal tikus = 1000 IU/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 sapi bubuk mengandung 400 IU vitamin D dan 500 mg Ca, sehingga perhitungan susu sapi bubuk yang akan diberikan adalah:

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

Pemberian susu sapi bubuk yang optimal (dengan kandungan vitamin D dan kalsium yang optimal) adalah sebesar 1,8 gram. Dengan begitu maka pemberian susu sapi bubuk berturut-turut dari perlakuan (P)1 hingga perlakuan (P)3 adalah 0,9 gram; 1,8 gram; dan 2,7 gram. Pada manusia

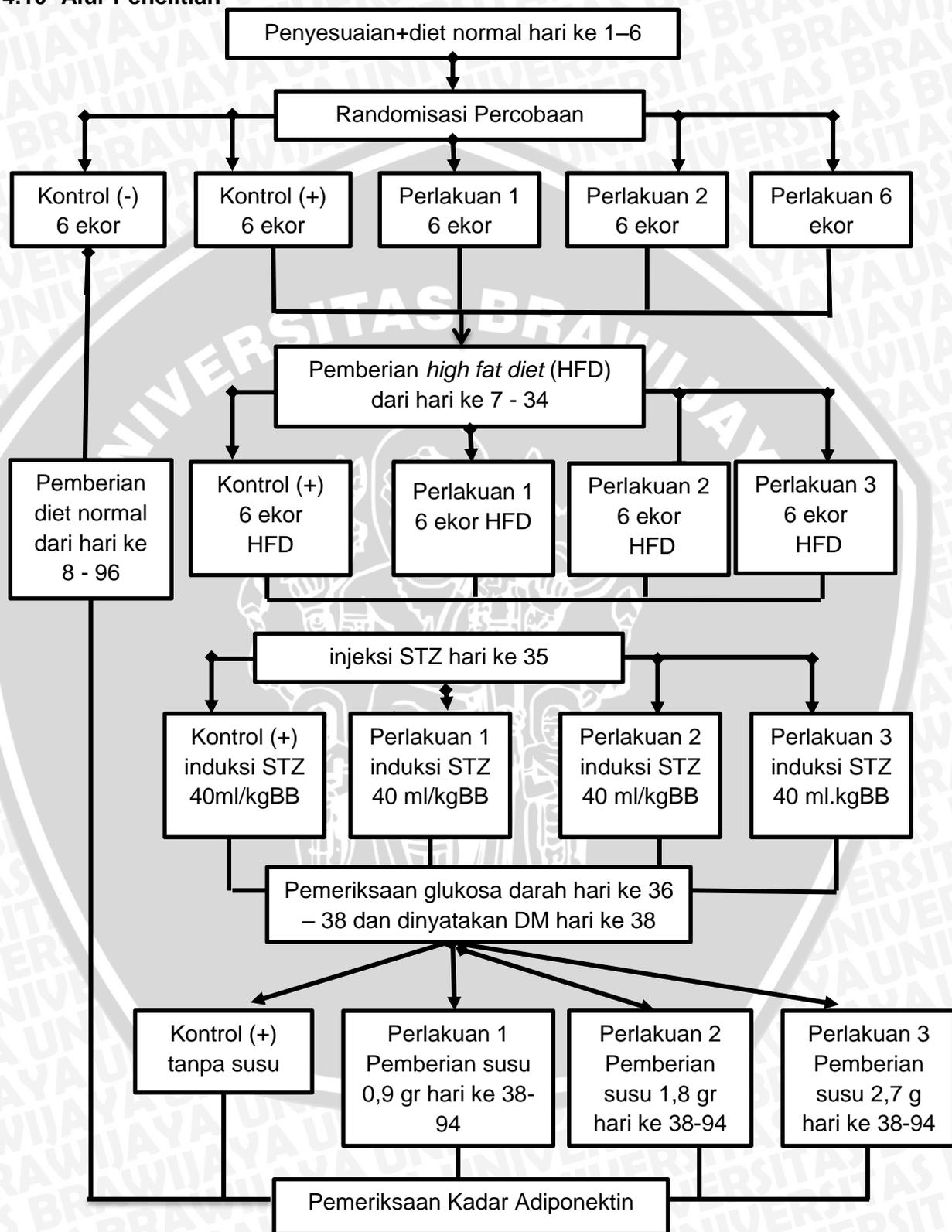
Upper Level (UL) vitamin D adalah 2000 IU dan kalsium 2500 mg. sehingga bila dikonversi ke tikus UL vitamin D 36 IU dan kalsium 45 gram.

4.9 Analisa Data

Data yang didapat dianalisis dengan program SPSS 16. Data yang didapatkan pertama kali dilakuakn uji normalitas untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal atau tidak akrena 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. Diketahui data kadar adiponektin 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 ($p < 0,05$).

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

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Diagram Alur Penelitian

