

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ialah *True Eksperimental* dengan desain *The Randomize Posttest-Only Control Group Design*, secara sederhananya desain penelitian ini adalah sebagai berikut :

NE-control : X ————— O₁

NE-Madu : X₁ ————— O₁

Ex-control : X₂ ————— O₁

Ex-Madu : X₃ ————— O₁

Keterangan :

NE-control : Kelompok yang tidak di berikan apa-apa.

NE-Madu : Kelompok eksperimen yang diberikan madu

Ex-control : Kelompok eksperimen yang diberi perlakuan *endurance training*

Ex-Madu : Kelompok eksperimen yang diberi perlakuan diberikan madu *Stingless Bee Honey* dan *endurance training*.

X : Diberikan diet normal tanpa madu dan *exercise*.

X₁ : Proses perlakuan yang diberikan madu *Stingless Bee Honey*.

- X₂ : Proses perlakuan yang diberikan *endurance training*.
- X₃ : Proses perlakuan yang diberikan *endurance training* dan Madu stingless bee honey
- O₁ : *Post-Test* yang telah diberikan perlakuan oleh peneliti.

The Randomize Posttest Only Control Group Design. Pada desain ini, akan membandingkan antara kelompok eksperimental dengan kelompok kontrol, meskipun kelompok tersebut dipilih dan ditentukan dengan cara random sebagaimana metode true eksperimen. Kelompok-kelompok tersebut langsung berikan post-test di akhir (setelah treatment) selain untuk mengevaluasi ialah untuk meninjau dampak treatment yang telah diberikan. Perbedaan yang didapat dari setiap kelompok akan di bandingkan.

3.2 Populasi Penelitian

Populasi merupakan kelompok yang lebih besar untuk mendapatkan hasil dalam sebuah penelitian (Fraenkel et al,2013 hlm.91). “*The population is all individuals of interest to the researcher*” (Marcyk et al., 2015). Berdasarkan pengertian diatas bisa disimpulkan bahwa populasai adalah keseluruhan individu yang dibutuhkan oleh peneliti untuk mendapatkan hasil yang diinginkan dalam sebuah penelitian. Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas obyek atau subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya.

Penelitian ini dilakukan di Laboraturium Bionano Teknologi LPPM Universitas Pendidikan Indonesia dan penelitian ini menggunakan tikus putih sebanyak 20 ekor.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel adalah tempat dimana informasi yang diinginkan dalam penelitian diperoleh. “A sample in a research study is the group on which information is obtained” (Fraenkel, Wallen, & Hyun, 2013). Bisa diartikan pula bahwa sampel merupakan bagian dari populasi yang dipilih oleh peneliti. Sampel adalah bagian atau jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut. Pemilihan sampel pun tidak boleh asal-asalan memahami karakteristik sampel dan cara pengambilan sampel. Dengan pengambilan teknik sampling yang benar maka akan mempermudah peneliti dalam menarik kesimpulan nanti.

Teknik sampling yang akan digunakan dalam rencana penelitian ini adalah Total Sampling. Dalam penelitian ini peneliti menggunakan sampel berjumlah 20 ekor tikus putih.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Tahap penelitian hewan coba

- Pemeliharaan hewan coba sebelum intervensi:
 - Kondisi kandang bersih dengan ukuran panjang= 70cm x lebar= 50 cm x tinggi= 55 cm dan kapasitas kandang dapat digunakan max 5 ekor per kandang.

- Pemeliharaan kandang setiap 3x seminggu dilakukan penggantian sekam pengalas kandang tikus, tikus diberi pakan standar dan diberi minum ad libitum.
 - Penerangan diatur bergantian setiap 12 jam, kelembaban dan suhu diatur sedemikian rupa sehingga hewan coba merasa nyaman. Adaptasi kandang dilakukan 1 minggu, sedangkan adaptasi latihan fisik (swimming exercise) dilakukan selama 2 minggu dengan peningkatan bertahap lama dari olahraga renang yang diberikan.
- Pemeliharaan hewan coba selama intervensi:
- 20 hewan coba di bagi menjadi 4 kelompok yaitu NE-control, NE-Madu, Ex-Control dan Ex-Madu. Untuk kelompok NE-Madu diberikan madu dengan dosis 9,3g/kg/bw satu kali satu hari diberikan pada pagi hari
 - Pada kelompok ex-control di lakukan latihan fisik endurance exercise training (swimming exercise) pada kolam sebesar 1m x 1m x 80cm. Suhu air dipertahankan pada suhu 35° C. Latihan dilakukan selama selama 2 jam/hari yang terbagi menjadi 4 set latihan (30 menit/set) dengan istirahat selama 5 menit pada setiap setnya. Latihan swimming exercise

diberikan selama 6 hari / minggunya dan total pemberian latihan adalah 28 hari.

- Pada kelompok ex-madu diberi madu sebanyak 9,3g/kg/bw pagi hari, satu jam sebelum latihan (*swimming exercise*) (Ranneh et al., 2019).
- Pemberian madu maupun latihan di lakukan selama 28 hari.
- Berat badan di ukur dua hari sekali pada pagi hari sebelum dilakukan intervensi.

- Pemeliharaan hewan coba setelah intervensi:

- Setelah di berikan perlakuan selama 28 hari, hewan akan dianestesi dengan isoflurane kemudian didislokasi servikal, setelah itu diambil darah melalui jantung kemudian otot gastrocnemius dari kaki kanan diambil dan di simpan dalam larutan nitrogen untuk kemudian di bekukan dalam freezer -80°. Setelah darah dan otot gastrocnemius diambil dilakukan ternisasi dengan pengangkatan organ jantungnya.

Test Akhir

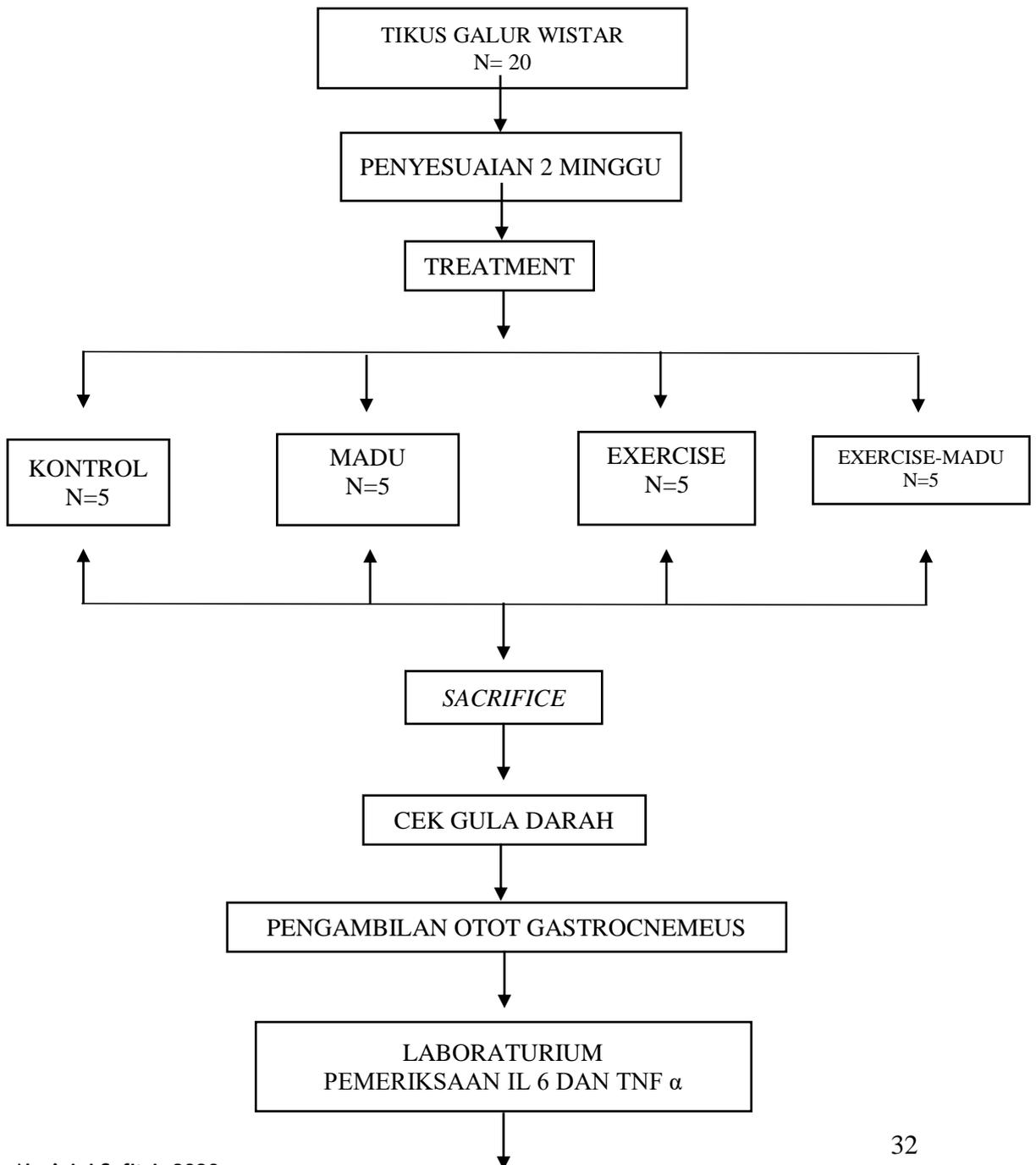
Post-test bertujuan untuk mengetahui kadar gula darah dan proses inflamasi yang terdapat dalam hewan coba tikus galur wistar.

a. Gula darah

Darah Sampel di cek menggunakan *Autocheck* sebelum di *Sacrifice*.

b. Pro-inflamasi interleukin 6 dan TNF α

Otot *gastrocnemeus* yang sudah di bekukan dikirim ke lab central UNPAD untuk dilakukan pemeriksaan interleukin 6 dan TNF α .



DATA

Gambar 3.1 alur penelitian.

3.5 Instrumen Penelitian

Instrumen berperan dalam memperoleh data untuk sebuah penelitian, yang selanjutnya diteliti dan ditarik kesimpulannya sebagai hasil penelitian, itulah alasannya instrument memiliki peran penting dalam sebuah penelitian.

1. *Blood Sampling*

Pengambilan sampel darah (*Blood Sampling*) di gunakan untuk melihat glukosa darah. Adapun metode yang digunakan adalah dengan mengambnl sampel darah melalui pembuluh darah kapiler yang berada di ujung jari/ *finger tip* (Phillips, 2016).



Autocheck

2. Pengambilan Data ekspresi protein pro-inflamasi IL6 dan TNF alpha

Pengambilan data inflamasi dilakukan di Laboratorium Biochemistry and physiology Exercise Universitas Pendidikan Indonesia dengan menggunakan Western Blot.

Western Blot (WB) merupakan suatu teknik untuk menandai suatu protein pada membran nitroselulosa, nilon, atau membran transfer lain setelah protein tersebut terpisahkan melalui elektroforesis. Protein tersebut kemudian dapat dideteksi melalui metode autoradiografi, pelabelan dengan senyawa-senyawa fluoresen, pelabelan dengan antibodi terikat protein, lektin atau gen pengikat spesifik lainnya (Attwood *et al.*, 2006)

Berdasarkan pengertian tersebut, WB dilakukan melalui beberapa tahap. Tahap pertama, elektroforesis. Tahap kedua, elektrotransfer. Tahap ketiga, deteksi (Kindt *et al.*, 2007)

1. Tahap pertama, persiapan pembuatan sampel otot.

Larutan yang diperlukan:

1. Solution A :
250 mM sucrose, 5 mM NaN₃, 2 mM EGTA, 20 mM HEPES-Na, pH 7.4
2. Solution C: 1mM EDTA , 10 mM Tris , pH 7.4
3. 100uM PMSF
4. 10uM Leupeptin
5. 1 uM Pepstatin A

Langkah2 pembuatan sampel preparation:

1. Siapkan larutan Buffer yang berisi: Solution A + 10 ul/ml PMSF + 1 ul/ml leupeptin + 1 ul/ml pepstatin A.

2. Siapkan refrigerant (Block es) sebagai alas
3. Tempelkan kertas paraffin diatas refrigerant.
4. Potong otot dari hasil harvest otot (di simpan pada suhu -800C.) sebesar 100mg-250 mg.
5. Potong menjadi potongan kecil dengan gunting.
6. Masukkan dalam potter dan tambahkan solution yang sudah disiapkan (point 1) dengan pengenceran 20x.
Contoh: otot 100 mg maka buffer yg diperlukan = $100 \text{ mg} \times 19 = 1900 \text{ ul}$.
7. Homogenate sampel otot dengan alat homogenate pada kecepatan 1000 rpm dan sampel otot harus dalam keadaan suhu 4°C . (Dalam es). Homegenate dilakukan dalam waktu 3 menit.
8. Kumpulkan supernatant hasil homogenate dalam tube.
9. Beli informasi pada tutup tube.

2. Tahap kedua, membuat gel

Langkah selanjutnya adalah membuat gel yang akan digunakan dalam electrophoresis. Berikut langkah- demi langkah membuat gel yang baik;

1. Menyiapkan tempat yang akan digunakan untuk bekerja.
Semprotkan alkohol 70% dan seka dengan tisu pada semua permukaan area tempat kerja yang akan digunakan. Tempatkan selembat palstik wrap dan lekatkan dengan isolasi. Kemudian tempatkan kertas coklat/ brown towel diatasnya.
2. Menyiapkan semua peralatan yang butuhkan seperti; casting stand, glass plate sandwich, plastic comb, pipet, pipette tips. Jangan lupa untuk menyekanya dengan alkohol 70%.
3. Siapkan semua larutan yang suah dibuat sebelumnya seperti;
 - 1M Tris HCl (pH 8,6)
 - 10% SDS
 - 30% Acrylamide
 - 10% APS
 - Milli-Q (dw)

4. Pasangkan glass plate sandwich pada casting frame. Pastikan untuk mengatur bagian permukaannya dengan rata. Kemudian kunci casting frame secara hati-hati.

Tempatkan spoon abu-abu di bagian bawah casting stand, dan tempatkan plastik parafilm di atasnya. Kemudian pasang casting frame pada casting stand yang sudah disiapkan.

Pastikan casting frame yang dipasangkan tidak bocor, dengan mengisinya dengan Milli-Q dan biarkan beberapa saat. Jika tidak ada kebocoran, buang Milli-Q lalu keringkan dengan kertas filter, dan casting frame siap digunakan untuk pembuatan gel.

5. Menyiapkan lower/ running gel sesuai dengan konsentrasi gel yang diinginkan yang

15		%Running gel, lower (for 2 gel)		10,5		mL		×2	
final conc.									
100	%	Dw	11,1	%	1,162	mL	2,32	4	mL
1	M	Tris-HCl (pH 8.6 at R.T.)	0,37	M	3,937	mL	7,87	5	mL
10	%	SDS	0,1	%	105	μL	210		μL
30	%	Acrylamide	15	%	5,25	mL	10,5		mL
10	%	APS	0,03	%	35	μL	70		μL
100	%	TEMED	0,1	%	10,5	μL	21		μL
final conc.									
12,5		%Running gel, lower (for 2 gel)		10,5		mL		×2	
100	%	Dw	19,4	%	2,037	mL	4,07	4	mL

1	M	Tris-HCl(pH8.6 at R.T.)	0,37 5	M	3,937 5	m L	7,87 5	mL
10	%	SDS	0,1	%	105	μL	210	μL
30	%	Acrylamide	12,5	%	4,375	m L	8,75	mL
10	%	APS	0,03	%	35	μL	70	μL
10	%	TEMED	0,1	%	10,5	μL	21	μL
10 %Running gel,lower(for2gel)					10,5	m L	×	2
final conc.								
100	%	Dw	27,7	%	2,912	m L	5,82 4	mL
1	M	Tris-HCl(pH8.6 at R.T.)	0,37 5	M	3,937 5	m L	7,87 5	mL
10	%	SDS	0,1	%	105	μL	210	μL
30	%	Acrylamide	10	%	3,5	m L	7	mL
10	%	APS	0,03	%	35	μL	70	μL
100	%	TEMED	0,1	%	10,5	μL	21	μL
7,5 %Running gel,lower(for2gel)					10,5	m L	×	2
final conc.								
100	%	Dw	36,1	%	3,787	m L	7,57 4	mL
1	M	Tris-HCl(pH8.6 at R.T.)	0,37 5	M	3,937 5	m L	7,87 5	mL
10	%	SDS	0,1	%	105	μL	210	μL
30	%	Acrylamide	7,5	%	2,625	m L	5,25	mL
10	%	APS	0,03	%	35	μL	70	μL
100	%	TEMED	0,1	%	10,5	μL	21	μL
6 %Running gel,lower(for2gel)					10,5	m L	×	2
final conc.								
100	%	Dw	41,1	%	4,312	m L	8,62 4	mL
1	M	Tris-HCl(pH8.6 at R.T.)	0,37 5	M	3,937 5	m L	7,87 5	mL

10	%	SDS	0,1	%	105	μ L	210	μ L
30	%	Acrylamide	6	%	2,1	mL	4,2	mL
10	%	APS	0,03	%	35	μ L	70	μ L
100	%	TEMED	0,1	%	10,5	μ L	21	μ L
4,7 5	%Stacking gel,lower(for2gel)				9	mL	$\times 2$	
			final conc.					
100	%	Dw	57,8 3	%	5,205	mL	10,4 1	mL
0,5	M	Tris-HCl(pH6.8 at R.T.)	0,13	M	2,25	mL	4,5	mL
10	%	SDS	0,1	%	90	μ L	180	μ L
30	%	Acrylamide	4,75	%	1,425	mL	2,85	mL
10	%	APS	0,03	%	30	μ L	60	μ L
100	%	TEMED	0,2	%	18	μ L	36	μ L

6. disesuaikan dengan berat molekul protein yang ingin dideteksi.

Misalnya; 12,5% running gel, maka siapkan larutan sesuai dengan resep berikut;

100% Milli-Q	2,037	mL
1M Tris HCl (pH 8,6 at RT)	3,9375	mL
10% SDS	105	μ L
30% Acrylamide	4,375	mL
10% APS	35	μ L
100% TEMED	10	μ L

Campurkan semua reagent di atas secara berurutan, dalam tube 15 mL yang ditarus di atas es. Campur dengan pipet bagi reagent yang volumenya kecil untuk menjamin homogenitas.

Sekali larutan telah dicampur dengan 100% TEMED, maka larutan lower/running gel segera dimasukkan ke dalam cassette/ glass plate sandwich menggunakan pipet. Hati-hati agar tidak ada gelembung udara di dalam gel. Masukkan larutan gel hingga batas yang telah ditentukan (lihat indikatornya).

Tambahkan Buthanol (direkomendasikan) atau bisa juga Milli-Q di atas larutan

running gel untuk menghindari adanya gelembung udara. Lalu biarkan beberapa saat ($\pm 30 - 60$ menit).

Berikut beberapa resep untuk pembuatan running gel dengan konsentrasi yang berbeda:

7. Gel berhasil terbentuk jika terlihat 3 garis sejajar pada bagian atas atas larutan running gel. Jika gel telah terbentuk, maka buang larutan Buthanol di atasnya dan blas dengan Milli-Q (dw) sebanyak 3 kali. Kemudian keringkan dengan kertas saring/ putih.

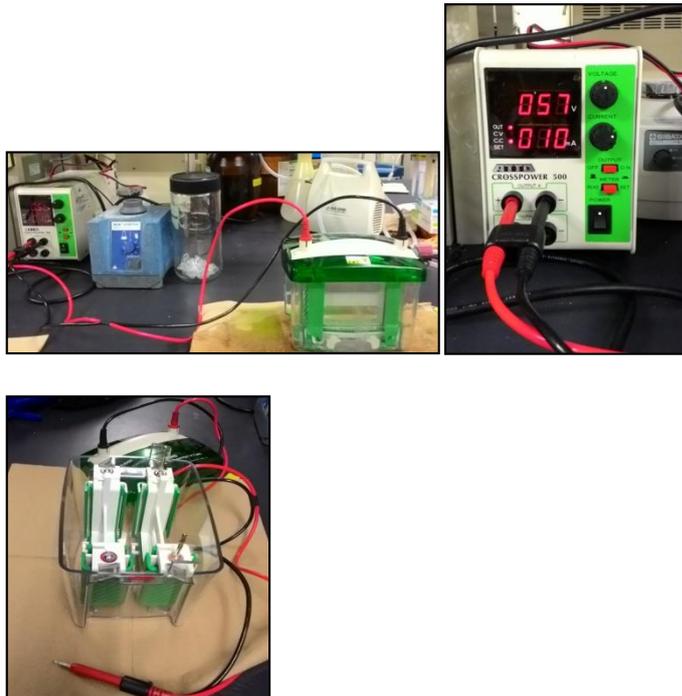
8. Siapkan larutan upper/ stacking gel 12,5% dengan resep sebagai berikut (untuk 1 gel):

0,5 M Tris HCL pH 6,8	1,125mL
10% SDS	45 μ L
30% Acrylamide	0,7125 mL
10% APS	15 μ L
100% mili-Q	2,6025 mL
100% TEMED	9 μ L (diberikan terakhir)

9. Setelah menambahkan larutan upper/ stacking gel di atas running gel, maka segera tempatkan plastic comb pada stacking gel. Lalu biarkan beberapa waktu ($\pm 30 - 60$ menit).

Setelah gel terbentuk, dapat dilanjutkan dengan melakukan electrophoresis. Jika waktu tidak memungkinkan, maka gel dapat disimpan pada suhu 4⁰C dengan dibungkung dengan brown towel yang dibasahi milli-Q dan disemprot sedikit alkohol 70%, dan bungkus lagi dengan plastik wrap.

3. Pada tahap ketiga, protein yang diinginkan dipisahkan dari sampel secara elektroforesis. Elektroforesis merupakan pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul dalam suatu tegangan listrik tertentu.



Langkah selanjutnya adalah melakukan electrophoresis. Berikut langkah demi langkah melakukan electrophoresis yang perlu diperhatikan;

1. Menyiapkan tempat yang akan digunakan untuk bekerja.
Semprotkan alkohol 70% dan seka dengan tisu pada semua permukaan area tempat kerja yang akan digunakan. Tempatkan selambar plastik wrap dan lekatkan dengan isolasi. Kemudian tempatkan kertas coklat/ brown towel di atasnya.
2. Siapkan alat untuk elektroforesis (alat hijau dengan elektroda) bila hanya 1 gel pilih yang ada besi ke atas
3. Tuangkan washing buffer sampai tanda = 2 gel =, kemudian isi larutan di tengah gel dengan larutan washing buffer.
 - Washing buffer = 60mL + 540mL mili-Q
4. Ambil sampel + protein marker (Multi Code Dyna III). (APS α Y)
5. Mulai masukan marker terlebih dahulu ke dalam gel line sebanyak 5 μ L.
6. Kemudian diikuti dengan memasukan 5 μ L atau sejumlah sampel yang diinginkan (d disesuaikan dengan hasil protein assay) ke dalam line.

7. Setelah semua sampel dimasukkan, tutup mesin electrophoresisnya dan sambungkan socket (merah ► merah, dan hitam ► hitam).
 8. Atur arus listrik = 10mA (untuk 1 gel), tegangan listrik max untuk selama di stacking gel ($\pm 20 - 30$ menit).
 9. Jika sampel sudah mencapai running gel, naikan arus listrik menjadi dua kali lipat menjadi 20 mA ($\pm 30 - 45$ menit).
 10. Matikan mesin electrophoresisnya jika band terlihat sudah mencapai bagian bawah dari running gel.
-
4. Tahap ke empat dalam WB yaitu pemindahan protein dari gel poliakrilamid menuju gel transfer. Tahap pemindahan tersebut menggunakan arus listrik sebagai faktor pendorong transfer protein. Oleh karena itu, proses pemindahan tersebut disebut juga elektrotransfer. Elektrotransfer dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu blocking semi kering dan blocking basah (Bollag *et al.*, 1996)



Transfer protein dari gel poliakrilamid menuju gel transfer merupakan tahap yang sangat penting dalam WB. Oleh karena itu, ada beberapa faktor yang harus diperhatikan dalam proses transfer protein tersebut.

- a. Arus listrik yang digunakan harus diperhatikan karena arus yang terlalu tinggi dapat menghasilkan panas selama transfer yang dapat menimbulkan masalah.
- b. Kekuatan ion yang rendah buffer transfer yang rendah dapat digunakan pada tegangan listrik yang tinggi tanpa perlu dikhawatirkan menghasilkan panas yang tinggi.
 - a. Salah satu arus listrik yang dapat digunakan adalah 200 mA selama 2 jam.
 - b. Untuk transfer protein dengan ukuran molekul besar, penggunaan gel dengan konsentrasi poliakrilamid yang rendah.

Langkah selanjutnya adalah melakukan transfer gel ke membran. Berikut langkah demi langkah melakukan transfer yang perlu diperhatikan;

1. Sementara menunggu jalannya electrophoresis, siapkan larutan transfer (A, B, dan C simpan pada suhu ruangan);

Larutan A:

Tris	3,63 g
Methanol	5 mL
<u>Milli-Q</u>	
Total	100 mL

Larutan B:

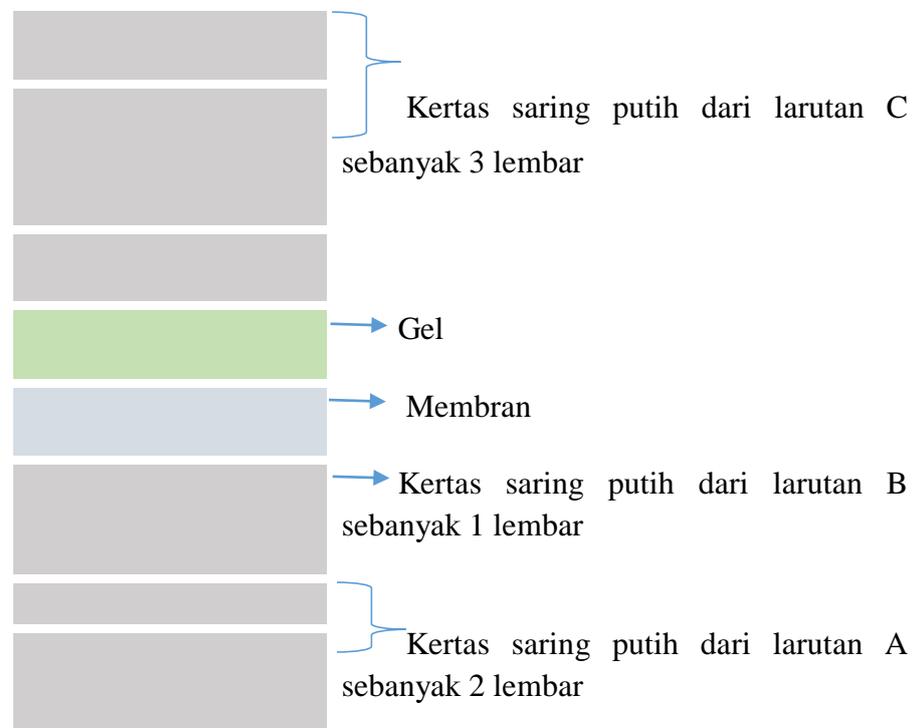
Tris	0,3 g
Methanol	5 mL
<u>Milli-Q</u>	
Total	100 mL

Larutan C: 25mM Tris, 40mM 6-aminohexanoic acid, 5% methanol

Tris	0,3 g
6-aminohexanoic acid	0,525 g
Methanol	5 mL
<u>Milli-Q</u>	
Total	100 mL

2. Menyiapkan PVDF membrane dan kertas saring.

- Ambil membrane dengan pinset, masukan membrane ke methanol (5 menit) kemudian pindahkan ke solution B, shake 30 menit sambil di goyang.
- Ambil kertas putih = 3 lembar masukan ke larutan C (rendam selama 5 menit)
- Ambil kertas putih = 1 lembar masukan ke larutan B (rendam selama 5 menit)
- Ambil kertas putih = 2 lembar masukan ke larutan A (rendam selama 5 menit)
- Buat sandwich dengan susunan:



3. Jika electrophoresis telah selesai, maka akan dilanjutkan dengan proses transfer dengan menggunakan mesin blotting. Atur sandwich paper seperti pada gambar di atas. Hindari membuat gelembung udara pada sandwich yang dibuat.
 4. Lakukan proses transfer (western blotting) dengan mengatur tegangan listrik pada tegangan maksimum, dan arus listrik pada 77 mA/gel selama 45 menit.
 5. Setelah melakukan transfer, potong dengan menggunakan gunting untuk memisahkan bend protein sampel dan loading control. Pemisahan ini dilakukan berdasarkan berat molekul dari masing-masing protein yang ingin dideteksi. Sesuaikan letaknya dengan melihat indikator marker yang digunakan.
 6. Cuci membran dengan TBS-T sebanyak 3 X 5 menit sambil digoyang.
 7. Blok membran dengan blocking buffer (skim milk) selama 60 menit pada suhu ruangan sambil digoyang.
5% skim milk (Skim milk = 5 g larutkan ke dalam 100 mL TBS-T)
 8. Kemudian cuci membran dengan TBS-T sebanyak 3 X 10 menit.
 9. Lanjutkan dengan, menginkubasi membran dengan antibodi primer selama \pm 12 jam (semalaman). Inkubasi dilakukan pada suhu 4⁰C sambil digoyang. (Tingkat pengenceran antibody primer : x 500~10000).
5. Tahap kelima merupakan deteksi protein yang telah dipindahkan ke membran transfer. Deteksi protein tersebut memanfaatkan interaksi antara antigen dan antibodi yang bersifat spesifik. Variasi metode-metode tersebut terutama terletak pada penggunaan antibodi primer dan sekunder, serta penggunaan molekul penanda. Berdasarkan penggunaan antibodi primer dan antibodi sekunder, ada dua metode deteksi, yaitu: metode langsung dan metode tidak langsung

Langkah selanjutnya adalah melakukan deteksi sinyal protein. Berikut langkah demi langkah melakukan deteksi yang perlu diperhatikan;

1. Setelah membran diinkubasi semalaman dengan antibodi primer, cuci membran tersebut dengan TBS-T sebanyak 3 X 10 menit.

Catatan: larutan antibodi primer masih dapat dipakai berulang-ulang sehingga kita dapat menyimpannya kembali.

2. Siapkan antibodi sekunder.

Tingkat pengenceran secondary antibody: x 20000

Dilution buffer: 5% BSA or 5% skim milk in TBST.

Dalam menyiapkan antibodi sekunder, kita harus hati-hati dalam menentukan antibodi sekunder mana yang harus digunakan. Apakah anti-rabbit atau anti-mouse. Pastikan kita mengetahuinya dengan melihat pada informasi produk antibody yang kita beli untuk digunakan.

Contoh:

- Menyiapkan secondary antibody untuk COX-IV;

5% Skim Milk	10 mL
<u>Anti-Rabbit</u>	<u>10 μL</u>
Total	10,010 mL

- Menyiapkan secondary antibody untuk All Myosin Heavy Chain;

5% Skim Milk	10 mL
<u>Anti-Mouse</u>	<u>10 μL</u>
Total	10,010 mL

- Menyiapkan secondary antibody untuk α -tubulin;

5% Skim Milk	10 mL
<u>Anti-Mouse</u>	<u>10 μL</u>
Total	10,010 mL

3. Setelah pencucian dengan TBS-T 3x10 menit selesai, tambahkan antibodi sekunder untuk setiap membran sesuai dengan spesifikasi antibodi sekundernya. Lalu inkubasi sambil digoyang selama 1 jam pada suhu ruangan.
4. Setelah 1 jam, cuci lagi membran tersebut dengan TBS-T 3 x 10 menit.
5. Sambil dicuci, siapkan larutan pewarna yaitu Amersham ECL series

(GE Healthcare) atau Ez WestLumi plus (ATTO), etc... (1:1) ;

Brown bottle (solution A) 200 μ L

White bottle (solution B) 200 μ L

Total 400 μ L per membran

Jumlah total larutan disesuaikan dengan ukuran membran. Sebagai rekomendasi, jika ukuran membran besar maka total larutan sebaiknya berkisar 500 – 600 μ L, jika ukuran membran lebih kecil maka 300 – 400 μ L sudah cukup untuk pewarnaan.

6. Ambil larutan pewarna (ECL atau ATTO) dengan pipet dan tempatkan pada plastik (telah dilap dengan alkohol) yang telah disiapkan di atas meja, kemudian ambil membran dengan pinset dan taruh pada larutan tersebut dan diamkan selama 1 menit (ATTO) atau 5 menit (ECL).
7. Setelah waktunya, dengan pinset ambil membran tersebut dan taruh pada plastik yang telah disiapkan sesuai ukuran membran. Roll atau lap permukaan plastik tersebut untuk menghindari gelembung udara dan larutan yang berlebihan.
8. Hidupkan Microchemi dengan menekan tombol ON yang berada dibelakang alat, kemudian tekan tombol ON yang ada di depan. Lalu hidupkan komputernya.
9. Double klik pad “Gel Capture” untuk membuka programnya, kemudian tunggu selama 15 hingga 30 menit sampai siap untuk digunakan.
NOTE: langkah 8 dan 9 sebaiknya telah dilakukan terlebih dahulu ketika selesai menginkubasi membran dengan antibodi sekunder.
10. Tarik tempat sampel pada microchemi untuk membukanya, lalu tempatkan membran pada bagian tengah tempat sampel pada microchemi, dan tutup kembali dengan mendorongnya kembali pada tempat semula.
11. Klik “Auto”, kemudian klik “Start”. Dan tunggu hingga mesinnya bekerja....
12. Setelah itu, pilih “quantity” pada jendela yang muncul segera setelah mesin bekerja untuk mendeteksi signal pada membran, kemudian klik “OK”. Lalu tunggu....

13. Sinyal protein yang dibaca akan muncul. Untuk menyimpannya, klik “File”, lalu klik “save Image” simpan dengan penamaan sesuai tanggal dan nama protein.
14. Kemudian klik lagi “File”, lalu klik “Save with reference”, lalu hidupkan lampu dengan menekan tombol “light” pada microchemi, lalu klik “OK”. Atur pencahayaannya sehingga dapat mendeteksi band-nya marker, setelah marker terlihat baik, maka klik “Copy Invert”, dan jika sudah puas dengan hasil gambarnya, klik “Done”.
15. Matikan lampunya, kemudian klik “OK”.
16. Keluarkan sampel membrannya dari dalam Microchemi, dan tutup kembali.
17. Matikan Microchemi dan komputernya. Jangan lupa untuk mengopi file hasil protein detection tadi pada flachdisc untuk selanjutnya dianalisis dengan “imageJ”.



3.6 Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh di lapangan kemudian dianalisis menggunakan uji-t dengan taraf signifikansi 5 %. Program *Statistical Package for Social Science* (SPSS) seri 24 yang digunakan untuk menganalisis data pada penelitian ini. Adapun pada pengujian hipotesis menggunakan analisis statistic uji two-ways ANOVA (Analysis of Variance)

1. Uji Normalitas dengan *Kolmogrov-Smirov*

Uji normalitas dilakukan sebelum uji-uji lainnya dilakukan, untuk melihat status data apakah normal atau tidak. Uji normalitas ini menggunakan *Kolmogorov-Smirnov Test* ($p > 0,05$) dan hasilnya data distribusi normal. Uji *Kolmogorov-Smirnov* adalah satu uji lain untuk mengganti uji kuadrat Chi untuk 2 sampel yang independen (M. Nazir, 2014: 369).

2. Uji Homogenitas

Setelah dilihat normalitas data, maka dilakukan uji homogenitas untuk meyakinkan kelompok-kelompok yang membentuk subjek penelitian berasal dari populasi yang homogen. Uji homogenitas dicari dengan uji *Levene test* ($p > 0,05$) dan hasilnya varian data homogen.

3. Uji Hipotesis

Adapun uji yang pamungkas ialah uji hipotesis. Sebelum dilakukan uji Anova maka dilakukan uji *paired t test* untuk mengetahui efektifitas masing-masing variabel independen terhadap variabel dependen. Uji two ways ANOVA akan dilakukan ketika telah diketahui efektifitas masing-masing *treatment*. Uji two way Anova dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan keefektifan dari berbagai macam *treatment* yang diberikan ke sampel untuk menangani cedera. Apabila terdapat perbedaan *mean* atau perbedaan pengaruh dari jenis *treatment* (variabel independen) maka dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui efektifitas *treatment* yang paling efektif dari ketiga *treatment* yang ada.