BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode penelitian *true experiment*. Penelitian eksperimen merupakan satu-satunya jenis penelitian yang secara langsung mencoba untuk mempengaruhi suatu variabel tertentu. Penelitian ini juga merupakan jenis penelitian yang terbaik dalam pengujian hipotesis hubungan sebab akibat atau kausalitas (Fraenkel et al,2013 hlm.91)., dan dalam penelitian ini menggunakan desain *The Randomized Posttest-Only Control Group Design*. Dalam penelitian ini melibatkan empat kelompok yang dibentuk secara acak. Kelompok satu diberi perlakuan tanpa exercise dan tanpa moringa, kelompok dua diberikan perlakuan tanpa exercise tapi diberikan moringa, kelompok tiga diberi perlakuan exercise tapi tanpa moringa, dan kelompok empat diberi exercise dan diberi moringa. Setelah diberi perlakuan, hasil *posttest* dari keempat kelompok tersebut akan diukur dan dibandingkan hasilnya. Berikut ini desain dalam penelitian ini:

GROUP 1	R	X_1	O
GROUP 2	R	C_1	O
GROUP 3	R	X_2	O
GROUP 4	R	C_2	O

Gambar 3.1 Desain Penelitian

Keterangan:

R = Pemilihan sampel secara acak

X_1 = Kontrol tanpa moringa

C_1 = Kontrol dengan moringa

X_2 = Eksperimen kontrol tanpa moringa

Saepul Anwar, 2022
EFEK SUPLEMENTASI EKSTRAK MORINGA DAN LATIHAN INTENSITAS SEDANG TERHADAP INFLAMASI IL-6 DAN TNF-ALPHA PADA JARINGAN ADIPOSA TIKUS GALUR WISTAR
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

C_2 = Eksperimen dengan moringa

O = Pengukuran variabel dependen/*Posttest*

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua subjek yang potensial bagi penelitian dimana sampel akan diambil (Gratton, 2010: 287). Pada penelitian ini populasi yang akan diteliti adalah tikus putih wistar jantan dengan berat 200-250gram yang berusia berusia 8-9 minggu sebanyak 24 ekor.

Sampel merupakan kumpulan unit atau kasus yang diambil dari populasi yang diteliti (Gratton, 2010: 25). Secara spesifik, unit tersebut adalah yang memiliki ciri-ciri atau keadaan tertentu sesuai dengan yang akan diteliti. Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan teknik *Total Sampling*. Teknik ini merupakan pengambilan sampel dimana jumlah sampel sama dengan jumlah populasi. Berdasarkan hal tersebut, sampel dalam penelitian ini sebanyak 24 ekor tikus putih wistar jantan.

3.3 Instrumen Penelitian

Dalam penelititan ini Jaringan adiposa akan diukur menggunakan instrumen berikut:

1) **Protokol Latihan,** Dalam penelititan ini treatment latihan yang diberikan mengunakan lari didalam lintasan treadmill dan protokol sesuai penelitian sebelumnya. Protokol latihan yang digunakan adalah tikus beraktiftas fisik dengan intensitas moderate training yaitu berlari selama 30 menit dengan kecepatan 1.2 km/jam (20 m/menit). Latihan ini dilakukan sebanyak 5 kali per minggu selama 4 minggu. Protokol ini dapat digunakan untuk latihan daya tahan karena tebukti mampu meningkatkan fungsi jantung (Fenning et., al 2003).
2) ***Western Blotting,*** Inflamasi Jaringan Adiposa yang ditandai dengan IL-6 dan TNF-alpha akan diukur dengan menggunakan metode *Western* Blotting. Western Blot 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, Western Blot dilakukan melalui beberapa tahap. Tahap pertama, elektroforesis. Tahap kedua, elektrotransfer. Tahap ketiga, deteksi (Kindt et al., 2007).

3.3.2.1 Tahap Pertama: persiapan pembuatan sampel

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-langkah pembuatan sampel paru:

1. Siapkan larutan Buffer yang berisi: Solution A + 10 ul/ml PMSF + 1 ul/ml leupeptin + 1 ul/ml pepstatin A.
2. Siapkan refrigeran sebagai alas
3. Tempelkan kertas parafin diatas refrigerant
4. Potong Lemak dari hasil harvest (di simpan pada suhu -8000 C.) sebesar 100 mg-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: paru 100 mg maka buffer yg diperlukan = 100 mg x 20 = 2000 ul.
7. Homogenate sampel paru pada kecepatan 1000 rpm dan sampel paru harus dalam keadaan suhu 400 C (dalam es). Homegenate dilakukan dalam waktu 3 menit.
8. Kumpulkan supernatan hasil homogenate dalam tube

9. Beri tanda pada tutup tube

3.3.2.2 Tahap Kedua: Membuat Gel

Langkah selanjutnya adalah membuat gel yang akan digunakan dalam elektroforesis. 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 selembar palstik wrap dan lekatkan dengan isolasi. Kemudian tempatkan kertas coklat/ brown towel diatasnya.
2. Menyiapkan semua peralatan yang butuhkan seperti; casting stand, glass plate sandwitch, 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 sandwitch 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 pasangkan 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. Beberapa running gel yang menjadi pilihan:

Tabel 3.1 Konsentrasi *Running Gel*

15	**%Running gel,lower (for2gel)**		**10,5**	**mL**	**x2**	
		Final conc.				
100 %	Dw	11,1 %	1,162	mL	2,324	mL

1	M	Tris-HCl (pH8.6 at R.T.)	0,375	%	3,9375	mL	7,875	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

12,5	**%Running gel,lower (for2gel)**		**10,5**	**mL**	**x2**	
		Final conc.				
100	%	Dw	19,4	%	2,037	mL	4,074	mL
1	M	Tris-HCl (pH8.6 at R.T.)	0,375	%	3,9375	mL	7,875	mL
10	%	SDS	0,1	%	105	µL	210	µL
30	%	*Acrylamide*	12,5	%	4,375	mL	8,75	mL
10	%	APS	0,03	%	35	µL	70	µL
100	%	TEMED	0,1	%	10,5	µL	21	µL

10	**%Running gel,lower (for2gel)**		**10,5**	**mL**	**x2**	
		Final conc.				
100	%	Dw	27,7	%	2,912	mL	5,824	mL
1	M	Tris-HCl (pH8.6 at R.T.)	0,375	%	3,9375	mL	7,875	mL
10	%	SDS	0,1	%	105	µL	210	µL
30	%	*Acrylamide*	10	%	3,5	mL	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**	**mL**	**x2**

		Final conc.				
100 %	Dw	36,1 %	3,787	mL	7,574	mL
1 M	Tris-HCl (pH8.6 at R.T.)	0,375 %	3,9375	mL	7,875	mL
10 %	SDS	0,1 %	105	µL	210	µL
30 %	*Acrylamide*	7,5 %	2,625	mL	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**	**mL**	**x2**

		Final conc.				
100 %	Dw	41,1 %	4,312	mL	8,624	mL
1 M	Tris-HCl (pH8.6 at R.T.)	0,375 %	3,9375	mL	7,875	mL
10 %	SDS	0,1 %	105	µL	210	µL
30 %	*Acrylamide*	6 %	2,1	mL	4,2	mL
10 %	APS	0,03 %	35	µL	70	µL
100 %	TEMED	0,1 %	10,5	µL	21	µL

4,75	**%Running gel,lower (for2gel)**	**10,5**	**mL**	**x2**

		Final conc.				
100 %	Dw	57,83 %	5,205	mL	10,41	mL
1 M	Tris-HCl (pH8.6 at R.T.)	0,375 %	3,9375	mL	7,875	mL
10 %	SDS	0,1 %	105	µL	210	µL
30 %	*Acrylamide*	4,75 %	1,425	mL	2,85	mL
10 %	APS	0,03 %	30	µL	60	µL
100 %	TEMED	0,2 %	18	µL	36	µL

6. Sesuaikan dengan berat molekul protein yang ingin dideteksi. Misalnya berat molekul protein sampel paru akan menggunakan 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 µL
- 30% Acrylamide 4,375 mL
- 10% APS 35 µL
- 100% TEMED 10,5 µL

7. Campurkan semua *reagent* diatas secara berurutan, dalam tube 15 mL yang ditaruh diatas 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 dimasukan ke dalam *cassete/glass plate sandwich* menggunakan pipet. Hati-hati agar tidak ada gelembung udara di dalam gel. Masukan larutan gel higga 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 (+- 30 – 60 menit).
8. Setelah gel terbentuk, dapat dilanjutkan dengan melakukan elektroforesis. Jika waktu tidak memungkinkan, maka gel dapat disimpan pada suhu 4º C dengan dibungkung dengan brown towel yang dibasahi milli-Q dan disemprot sedikit alkohol 70%, dan bungkus lagi dengan plastik wrap.

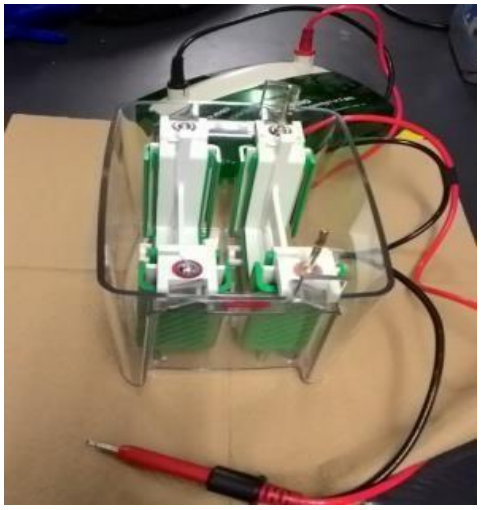
3.3.2.3 Tahap Ketiga: Elektroforesis

Elektroforesis merupakan pemisahan protein berdasarkan ukuran molekul dalam suatu tegangan listrik tertentu. 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 selembar plastik wrap dan lekatkan dengan isolasi. Kemudian tempatkan brown towel diatasnya.

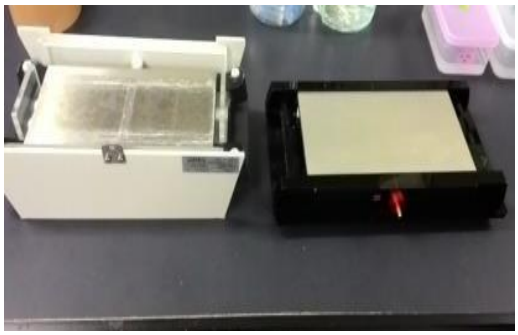
2. Siapkan alat untuk elektroforesis (alat hijau dengan elektroda) bila hanya 1 gel pilih yang ada besi ke atas.
3. Tuangkan washing buffer sampai tanda = 2 gel =, kemudian isi larutan di tengah gel dengan larutan washing buffer. Washing buffer = 60 mL + 540 mL mili-Q.
4. Ambil sampel + protein marker (Multi Code Dyna III). (APS αϒ).
5. Mulai masukan marker terlebih dahulu ke dalam gel line sebanyak 5 µL.
6. Kemudian diikuti dengan memasukan 5 µL atau sejumlah sampel yang diinginkan (disesuaikan dengan hasil protein assay) ke dalam line.
7. Setelah semua sampel dimasukan, tutup mesin elecktroforesisnya dan sambungkan soket (merah ► merah, dan hitam ► hitam).
8. Atur arus listrik = 10 mA (untuk 1 gel), tegangan listrik max untuk selama di stacking gel (± 20 – 30 menit).
9. Jika sampel sudah mencapai running gel, naikan arus listrik menjadi dua kali lipat menjadi 20 mA (± 30 – 45 menit).
10. Matikan mesin elektroforesisnya jika band terlihat sudah mencapai bagian bawah dari running gel.



Gambar 3.2 Alat Elektroforesis

3.3.2.4 Tahap Keempat: Pemindahan Protein

Pemindahan ini 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.



Gambar 3.3 Alat Elektrotransfer

Transfer protein dari gel poliakrilamid menuju gel transfer merupakan tahap yang sangat penting dalam Western Blotting. Oleh karena itu, ada beberapa faktor yang harus diperhatikan dalam proses transfer protein tersebut. Arus listrik yang digunakan harus diperhatikan karena arus yang terlalu tinggi dapat menghasilkan panas selama transfer yang dapat menimbulkan masalah. Kekuatan ion yang rendah buffer transfer yang rendah dapat digunakan pada tegangan listrik yang tinggi tanpa perlu dikhawatirkan menghasilkan panas yang tinggi. Salah satu arus listrik yang dapat digunakan adalah 200 mA selama 2 jam. 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: 300mM Tris, 5% methanol

   Tris 0,3 g

Methanol	5mL
Milli-Q	
Total	100 mL

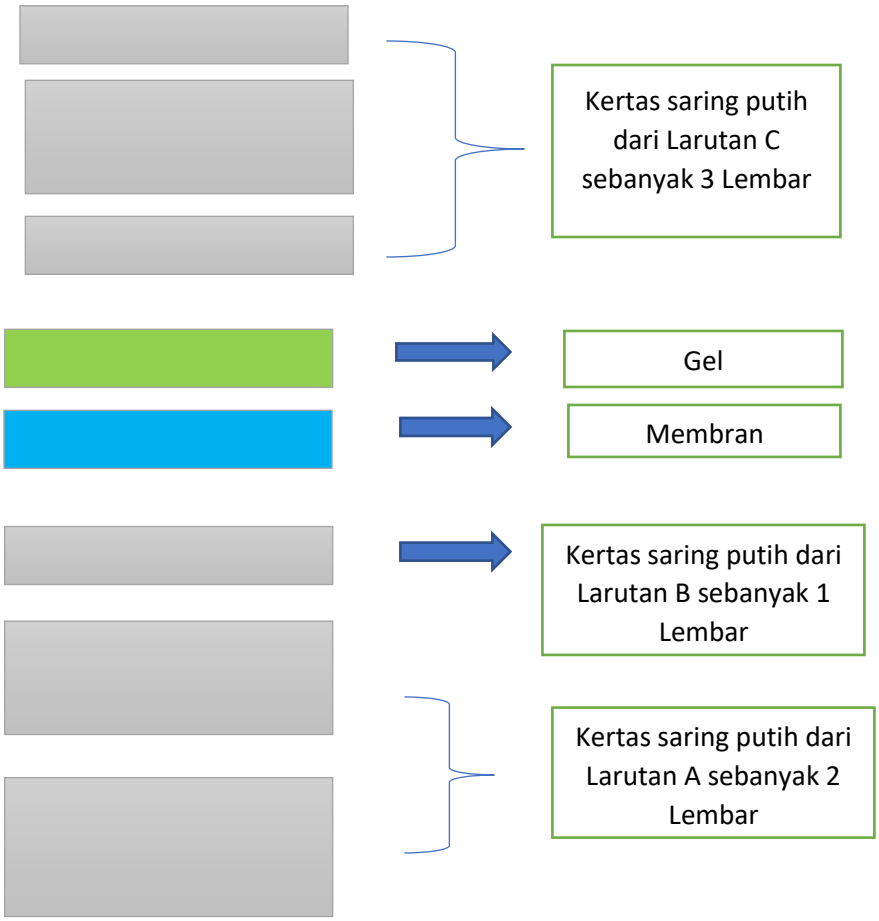
Larutan B: 25 mM Tris, 5% methanol

Tris	3,63 g
Methanol	5 mL
Milli-Q	
Total	100 mL

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

Tris	3,63 g
6-aminohexnoic acid	0,525 g
Methanol	5 mL
Milli-Q	
Total	100mL

2. Menyiapkan PVDF membrane dan kertas saring
   1) Ambil membrane dengan pinset, masukan membrane ke methanol (5 menit) kemudian pindahkan ke solution B, goyangkan 30 menit.
   2) Ambil kertas putih = 3 lembar masukan ke larutan C (rendam selama 5 menit).
   3) Ambil kertas putih = 1 lembar masukan ke larutan B (rendam selama 5 menit).
   4) Ambil kertas putih = 2 lembar masukan ke larutan A (rendam selama 5 menit).
   5) Buat sandwitch dengan susunan:



3. Jika elektroforesis telah selesai, maka akan dilanjutkan dengan proses transfer dengan menggunakan mesin blotting. Atur sandwitch paper seperti pada gambar di atas. Hindari membuat gelembung udara pada sandwitch 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 indicator 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 menitpda 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 ± 12 jam (semalaman). Inkubasi dilakukan pada suhu 4ºC sambil digoyang. (Tingkat pengenceran antibody primer: x 500~10000).

3.3.2.5 Tahap Kelima: Deteksi Protein

Deteksi protein ini 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. 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 antibodi yang kita beli untuk digunakan. Contoh:
    1) Menyiapkan secondary antibody untuk COX-IV:

5% Skim Milk	10 mL
Anti-Rabbit	10 µL
Total	10,010 mL

    2) Menyiapkan secondary antibody untuk All Myosin Heavy Chain:

5% Skim Milk	10 mL
Anti-Mouse	10 µL
Total	10,010 mL

3) Menyiapkan secondary antibody untuk α-tubulin:

5% Skim Milk	10 mL
Anti-Mouse	10 µL
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 siapkan larutan pewarna yaitu Amersham ECL series (GE Healthcare) atau Ez Wes tLumi plus (ATTO), etc… (1:1);

Brown bottle (solution A) 200 µL

White bottle (solution B) 200 µL

Total 400 µL per membrane

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

6. Ambil larutan pewarna (ECL atau ATTO) dengan pipet dan tempatkan pada plastik (sudah 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 klick pad “Gel Capture” untuk membuka programnya, kemudian tunggu selama 15 hingga 30 menit sampai siap untuk digunakan. Catatan: 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 kilk “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”.

Gambar 3.4 Alat Deteksi Protein

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pemeliharaan hewan coba sebelum diberi perlakuan

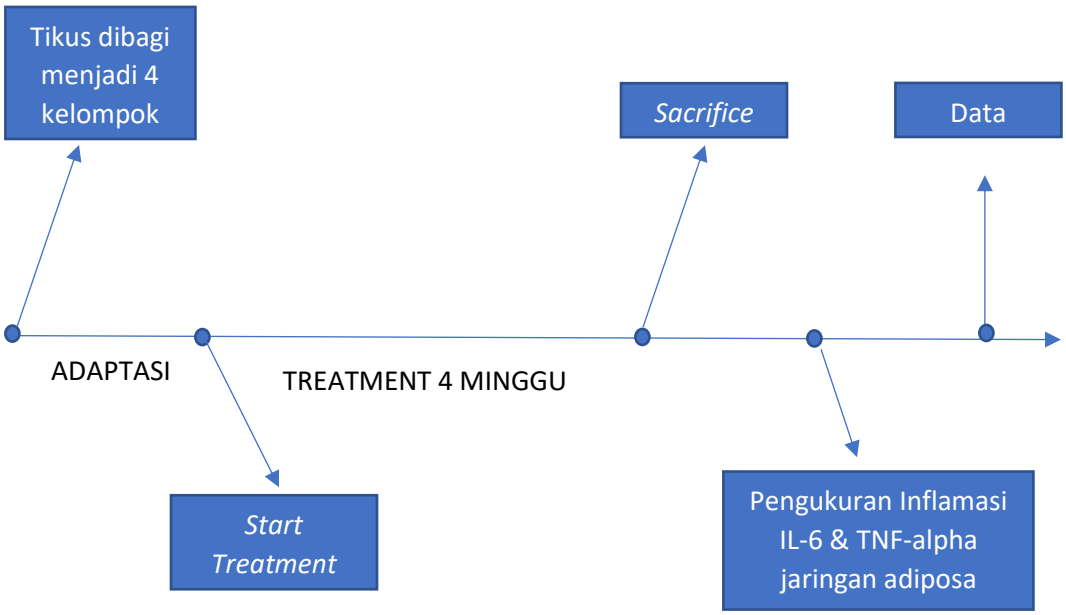
1) Tikus disiapkan sebanyak 24 ekor dengan berat 200-250gram yang berusia 8-9 minggu sebagai sampel penelitian
2) Tikus dimasukkan ke dalam kandang bersih dengan ukuran panjang 70 cm x lebar 50 cm x tinggi 55 cm dan kapasitas kandang dapat digunakan maksimal 6 ekor per kandang.
3) Pemeliharaan kandang setiap 3x seminggu dilakukan penggantian sekam pengalas kandang tikus, serta tikus diberi pakan standar dan diberi minum ad libitum.
4) Penerangan diatur bergantian setiap 12 jam, kelembaban dan suhu diatur sedemikian rupa sehingga hewan coba merasa nyaman. Adaptasi kandang dilakukan 1 minggu, sedangkan adaptasi olahraga (*running exercise*) dilakukan selama 2 minggu dengan peningkatan bertahap lama dari olahraga lari yang diberikan.

3.4.2 Pemeliharaan hewan coba selama perlakuan

1) 24 hewan coba di bagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok eksperimen olahraga di ruang terbuka, kelompok NonExercise kontrol tanpa moringa, kelompok NonExercise dengan moringa, Kelompok Exercise control tanpa moringa dan kelompok Exercise control dengan moringa.
2) Pada kelompok eksperimen olahraga yang melakukan Exercise, sampel melakukan olahraga lari dengan intensitas moderat selama 30 menit dengan kualitas udara baik. Latihan dilakukan pada lintasan treadmill dengan ukuran panjang 80 cm x lebar 10 cm dengan kecepatan 20 m/s. Latihan diberikan selama 5 kali per minggu selama total pemberian latihan adalah 4 minggu.
3) Pada kelompok kontrol yang tidak diberikan latihan, tetap didiamkan di dalam kendang saja.
4) Berat badan di ukur dua hari sekali pada pagi hari sebelum dilakukan perlakuan

3.4.3 Pemeliharaan hewan coba setelah perlakuan

1) Setelah di berikan perlakuan selama 28 hari, hewan akan dianestesi dengan isoflurane kemudian didislokasi servikal, setelah itu diambil darah melalui jantung serta lemak diambil dan di simpan dalam larutan nitrogen untuk kemudian di bekukan dalam freezer -80^0 C. Setelah darah dan lemak diambil dilakukan terninasi dengan pengangkatan organ jantungnya.
2) Setelah organ-organ sampel diambil, akan dilakukan pengukuran Jaringan Adiposa.



Gambar 3.3 Alur Waktu Penelitian

3.5 Analisis Data

Data yang dianalisis pada penelitian ini menggunakan ANOVA satu jalur untuk mengetahui pengaruh dan perbandingan pada dua kelompok sampel. Analisis data menggunakan program *Statistical Product for Social Science (SPSS)* Seri 26**.** Setelah memperoleh data, selanjutnya data tersebut diolah dan dianalisis, dengan tujuan dapat memperoleh kesimpulan penelitian. Dalam tahapannya, melalui tahapan sebagai berikut:

3.5.1 Deskriptif Data

Deskriptif data merupakan tahapan pengolahan untuk memperoleh informasi mengenai data, diantaranya rata–rata, standar deviasi,skor terendah dan skor tertinggi

3.5.2 Uji Normalitas

Uji normalitas data dilakukan untuk mengetahui apakah data berada pada taraf distribusi normal atau tidak. Uji normalitas data yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*, dengan asumsi kelompok sampel termasuk ke dalam sampel kecil atau 30 kebawah. Format pengujiannya dengan membandingkan nilai probabilitas (*p)* atau signifikansi (Sig.) dengan derajat kebebasan (dk) $\alpha = 0{,}05$. Uji kebermaknaannya adalah sebagai berikut:

a) Jika nilai Sig. Atau *P-value* > 0,05 maka data dinyatakan berdistribusi normal.

b) Jika nilai Sig. Atau *P-value* < 0,05 maka data dinyatakan berdistribusi tidak normal.

3.5.3 Uji Homogenitas

Uji homogenitas data dilakukan untuk mengetahui apakah data varianya sama atau tidak, uji homogenitas dilakukan sebagai prasyarat dalam ANOVA. Adapun dasar pengambilan keputusan dalam uji homogenitas adalah :

1) Jika nilai Sig. Atau *P-value* > 0,05 maka dikatakan bahwa varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah tidak sama

2) Jika nilai Sig. Atau *P-value* < 0,05 maka dikatakan bahwa varian dari dua atau lebih kelompok populasi data adalah sama

Jika data variansnya sama maka selanjutnya data akan diuji menggunakan ANOVA dua jalur, namun jika data tidak berdistribusi normal maka data akan diuji menggunkan *Kruskal Wallis.*

3.5.4 ANOVA Satu Jalur

ANOVA merupakan singkatan dari "*analysis of varian*". *Analysis of Varian* adalah salah satu uji komparatif yang digunakan untuk menguji perbedaan rata-rata data lebih dari dua kelompok. Pedoman pengambilan keputusan dalam uji ini adalah sebagai berikut :

1. H_0 : Jika nilai Sig. atau *P-value* > 0,05 maka dinyatakan tidak terdapat perbedaan antar kelompok sampel.
2. H_1 : Jika nilai Sig. atau *P-Value* < 0,05 maka dinyatakan terdapat perbedaan antar kelompok sampel.

Jika hasil uji menunjukkan H_0 diterima maka uji *Post-Hoc Test* tidak dilakukan, namun jika hasil uji menunjukkan H_0 ditolak maka uji *Post-Hoc Test* dilakukan untuk melihat kelompok mana saja yang berbeda.