

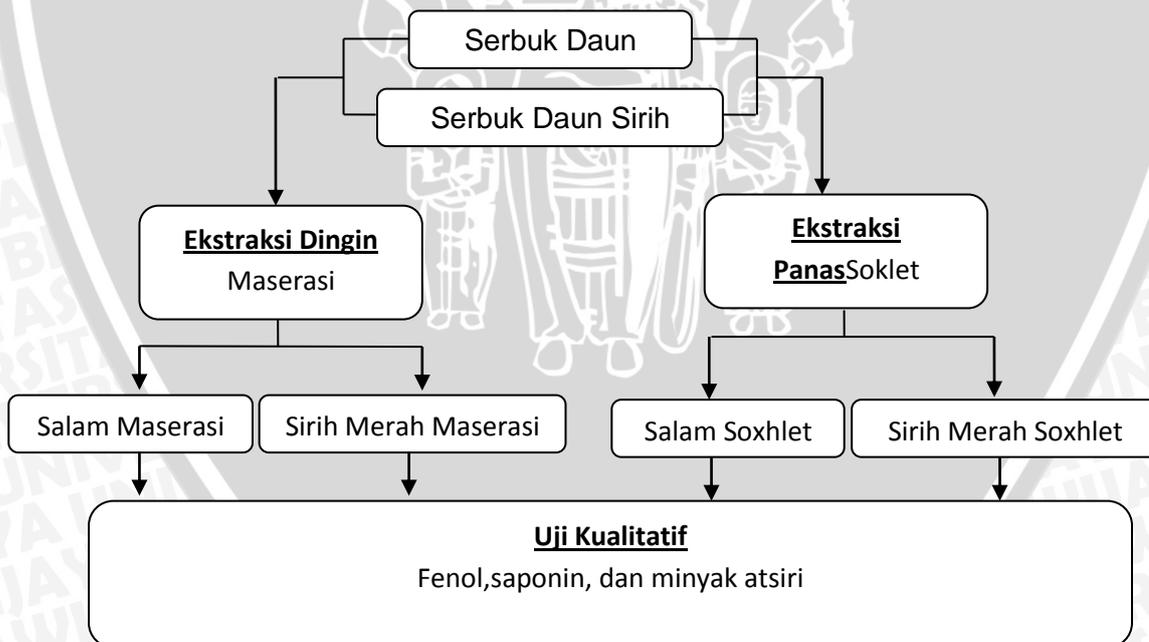
BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan studi empiris melalui pendekatan kuantitatif dan semikualitatif secara eksperimental murni menggunakan desain *true experimental in vitro, post-test only, controlgroup design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun salam, ekstrak daun sirih merah, dan kombinasi kedua ekstrak terhadap efektifitas terapi dalam dan menginduksi apoptosis sel HeLa CCL-2 ,berikut adalah desain penelitian ini:

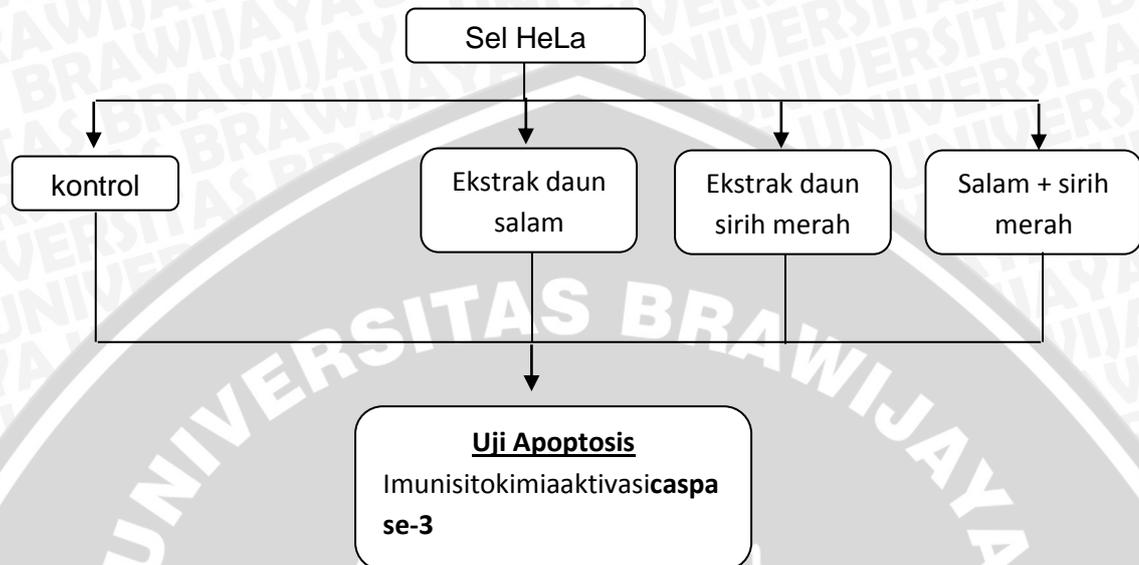
4.1.1 Uji Kandungan Ekstrak



Bagan 4.1 Desain Penelitian Optimasi Ekstrak



4.1.2 Uji Induksi Apoptosis



Bagan 4.2 Desain Penelitian Induksi Apoptosis

Keterangan dosis

Dosis Imunositokimia caspase-3

Salam maserasi : 10,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 20,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Salam soklet : 11,62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 23,24 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Sirih merah maserasi : 13,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 27,42 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Salam maserasi 20,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + Sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Salam soklet 11,62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + Sirih merah maserasi 13,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Salam soklet 23,24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + Sirih merah maserasi 27,42 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah sel HeLa CCL-2, *cell line* kanker serviks yang di kultur. Sel HeLa CCL-2 diperoleh dari *American Type Culture Collection* (ATCC) yang di kultur di Laboratorium Universitas Gajahmada

Yogyakarta. Dalam penelitian 10 kelompok pengulangan untuk perlakuan dapat dicari dengan menggunakan rumus $P (n-1) \geq 15$, dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan.

4.2.1 Imunositokimia caspase-3

$$P (n-1) \geq 15$$

$$10 (n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 1,5$$

$$n \geq 3$$

keterangan :

P : Jumlah Perlakuan

n : jumlah pengulangan

Pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebanyak 3 kali, maka banyaknya sampel yang akan digunakan adalah :

- 1) Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 10,16 $\mu\text{g/mL}$.
- 2) Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi dengan konsentrasi 20,32 $\mu\text{g/mL}$.
- 3) Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 11,62 $\mu\text{g/mL}$.
- 4) Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet dengan konsentrasi 23,24 $\mu\text{g/mL}$.
- 5) Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 13,71 $\mu\text{g/mL}$.

- 6) Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun sirih merah maserasi dengan konsentrasi 27,42 µg/mL.
- 7) Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam maserasi 20,32µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/mL.
- 8) Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 11,62 µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 13,71 µg/mL.
- 9) Tiga sampel yang berisi sel HeLa CCL-2 yang diberi ekstrak daun salam soklet 23,24µg/mL + ekstrak daun sirih merah maserasi 27,42 µg/mL.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini dosisekstrakdaunsalam, daunsirihmerah. Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas anti proliferasi, induksiapoptossdariaktivitascaspase-3 dan Level ROSpada Cell HeLa CCL-2.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi dan waktu penelitian ditetapkan untuk menentukan tempat dan durasi berlangsungnya penelitian. Berikut lokasi dan waktu penelitian yang ditetapkan:

4.4.1 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan. Berikut tempat penelitian yang digunakan:

1. Ekstraksidilakukan di Laboratorium LSIH UB danLaboratoriumFarmasiFKUB.
- 2) KulturselHeLadilakukan di LPPT Universitas Gajah Mada Yogyakartaandan LaboratoriumBiomedik FKUB.

- 3) Uji jalur induksi apoptosis dilakukan di Laboratorium Biokimia FKUB dan LPPT Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian berlangsung antara bulan Februari – Juni 2013.

4.5 BahandanAlat/instrumen Penelitian

4.5.1 BahanPenelitian

4.5.1.1 BahanEkstraksi

Bahan yang digunakan adalah serbuk kering daun salam 100 gram, serbuk kering daun sirih merah 100 gram yang berasal dari Batu Materia Medika (BMM) Malang, etanol 96% dari Merck Millipore (Frankfurter Str, Darmstedt, Jerman).

4.5.1.2 BahanUjiFitokimiaEkstrak

Bahan yang digunakan untuk uji kualitatif ekstrak meliputi :

- 1) Bahan yang digunakan untuk uji saponin adalah sampel ekstrak, 20 mL air distilasi.
- 2) Bahan yang digunakan untuk uji fenol adalah 50 mg ekstrak, 5 mL air distilasi, 5% larutan Ferric chloride dari Smart-lab (Serpong, Tangerang, Indonesia).
- 3) Bahan yang digunakan untuk uji minyak atsiri adalah reagen Mayer Smart-lab (Serpong, Tangerang, Indonesia).

4.5.1.3 BahanKulturSelHeLa

Bahan yang digunakan untuk kultur sel HeLa adalah Sel HeLa CCL-2 dari LPTT Universitas Gajah Mada Yogyakarta, medium RPMI 1640 dan penicillin-streptomycin dari Sigma (St. Louis, MO, USA), FBS (Fetal Bovine Serum) dari Gibco, PBS (Phosphate Buffer Saline), Sodium Bicarbonate, HCl, Trypsine-EDTA, aquadest, spiritus, dan alkohol.

4.5.1.4 Bahan Uji Apoptosis dengan Immunositokimia caspase-3

Bahan yang digunakan untuk uji aktivasi Caspase-3 adalah Stok sampel (10 mg), DMSO dari Merck Millipore (Frankfurter Str, Darmstadt, Jerman), RPMI 1640, PBS 1X, metanol, larutan hidrogen peroksida, Novostain Universal Detection Kit, antibodi monoklonal primer untuk caspase-3 dari Santa Cruz Biotechnology Inc (Europe), xylol, dan mounting media.

4.5.2 Peralatan Penelitian

Alat-alat disesuaikan dengan tahap penelitian yang dilakukan. Pada umumnya, alat-alat yang digunakan sesuai standart peralatan laboratorium. Berikut alat-alat yang digunakan selama proses penelitian :

4.5.2.1 Ekstraksi Maserasi

Toples kaca 5 L, toples kaca 1 L, pengaduk, gelasukur, pipet tetes, gelas piala.

4.5.2.2 Ekstraksi Soklet

Seperangkat peralatan ekstraksi soklet, gelasukur, pipet tetes, gelas piala.

4.5.2.3 Uji Fitokimia Ekstrak

Plat tetes, pipet tetes, tabung reaksi, raktabung reaksi, spiritus.

4.4.2.4 Kultur Sel HeLa

Laminar air-flow, inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$, mikroskop *inverted*, 96-well *plates*, gelas penutup, sentrifuge, pipet disposable, mikropipet dan tip biru dan kuning, konikal tube, dan tisu.

4.4.2.5 Uji apoptosis sel

Mikropipet 20, 200, 1000 μL dan tip biru dan kuning, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortek, *cover slip*, gelas objek, *24-well plate*, dan buangan untuk media bekas.

4.6 Definisi Istilah/Operasional

- 1) **Apoptosis** atau kematian sel secara terprogram untuk mengontrol proliferasi sel maupun respon terhadap kerusakan DNA pada sel (Ghobrial *et al*, 2005).
- 2) **Caspase** (*Cystein Aspartate Specific Proteases*) merupakan kelompok enzim protease yang berperan dalam apoptosis sel mamalia. Aktivasi caspase terjadi sebagai akibat dihentikannya *growth factor*, paparan radiasi atau zat kemoterapi, atau inisiasi proses kematian sel yang diperantarai reseptor Fas/Apo-1 (Hussana *et al*, 2010). Caspase-3 mengamplifikasi sinyal dari caspase-8 (ekstrinsik) atau caspase-9 (intrinsik) menuju apoptosis (Hussana *et al*, 2010).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Kultur sel HeLa (CCRC, 2013):

4.7.1.1 Penumbuhan sel

- 1) Menyiapkan aliquot 3 mL RPMI 1640 dalam *conical tube* steril.

- 2) Mengambil ampul (*cryo tube*) yang berisi sel HeLa CCL-2 dari tangki nitrogen cair.
- 3) Mencairkan suspensi sel dalam *cryo tube* pada suhu kamar hingga tepat mencair.
- 4) Mengambil suspensi sel dengan mikropipet 1 mL, masukkan tetes demi tetes ke dalam RPMI 1640 yang telah disiapkan dalam *conical tube*.
- 5) Menutup *conical tube* dengan rapat. Sentrifugasi dengan sentrifus untuk *conical tube* (tanpa pendingin) pada 1000 rpm selama 5 menit sebanyak 2 kali.
- 6) Kembali ke dalam LAF. menyemprot *conical tube* dan tangan dengan alkohol 70%.
- 7) Membuka *conical tube*, tuang supernatan RPMI 1640 ke dalam pembuangan.
- 8) Menambahkan 4 mL RPMI 1640 baru, meresuspensi kembali sel hingga homogen.
- 9) Mentransfer masing-masing 2 mL suspensi sel ke dalam 2 cawan petri. Dan menambahkan masing-masing 5 mL RPMI 1640 ke dalam dish dihomogenkan dan diamati kondisi sel dengan mikroskop, pastikan sel homogen pada seluruh permukaan cawan petri.
- 10) Memberi penandaan dan simpan sel ke dalam inkubator inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\% \text{CO}_2$.

4.7.1.2 Pergantian Media

- 1) Mengaliquot PBS dan RPMI 1640 di dalam *conical tube*.
- 2) Membuang media lama secara perlahan dengan pipet Pasteur.

- 3) Menuang 3 mL PBS ke dalam *dish*, goyang-goyangkan *dish* ke kanan dan ke kiri untuk mencuci sel.
- 4) Membuang PBS dengan pipet Pasteur.
- 5) Menuang 7 mL RPMI 1640 ke dalam *dish* yang berisi sel.
- 6) Mengamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif pada mikroskop *inverted*.
- 7) Inkubasi semalam dan amati keadaan sel keesokan harinya.

4.7.1.3 Pemanenan Sel

- 1) Mengambil sel dari inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 diamati kondisi sel, panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen
- 2) Membuang media dengan menggunakan pipet pasteur steril.
- 3) Mencuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS adalah $\pm \frac{1}{2}$ volume media awal).
- 4) Menambahkan tripsin-EDTA 1x (trypsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit.
- 5) Menambahkan RPMI 1640 ± 5 mL untuk menginaktifkan tripsin, meresuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu.
- 6) Mengamati keadaan sel di mikroskop, resuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol.
- 7) Mentransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru.

4.7.1.4 Perhitungan Sel

- 1) Mengambil sel dari inkubator $37^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ CO_2 , diamati kondisi sel.
- 2) Membuang media dengan menggunakan pipet pasteur steril.
- 3) Mencuci sel 2 kali dengan PBS 1x (volume PBS + $\frac{1}{2}$ volume media awal).

- 4) Tambahkan tripsin-EDTA 1x (tripsin 0,25%) secara merata dan inkubasi di dalam inkubator selama 3 menit.
- 5) Menambahkan media kurang lebih 2-3 mL untuk menginaktifkan tripsin, meresuspensi sel dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu.
- 6) Mengamati keadaan sel di mikroskop, meresuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol.
- 7) Mentransfer sel yang telah lepas satu-satu ke dalam *conical* steril baru, tambahkan RPMI 1640 kurang lebih 2-3 mL, resuspensi sel.
- 8) Mengambil 10 μ L panen sel dan dipipetkan ke hemasitometer.
- 9) Menghitung sel di bawah mikroskop (*inverted* atau mikroskop cahaya) dengan *counter*.

4.7.1.5 Subkultur Sel

- 1) Melakukan panen sel sesuai dengan protokol panen sel.
- 2) Meresuspensi suspensi sel di dalam *conical tube*.
- 3) Mengambil 300 μ L panen sel dan masukkan ke dalam *conical* yang lain. menambahkan 7 mL RPMI 1640 dan meresuspensi kembali.
- 4) Menuang sel ke dalam wadah (*dish*) yang telah disiapkan, dihomogenkan dan diamati kondisi dan jumlah sel secara kualitatif.
- 5) Menginkubasi semalam dan mengganti RPMI 1640 esok harinya, diamati keadaan sel sebelum dan setelah diganti media.

4.7.2 Maserasi Daun Salam dan Daun Sirih Merah

Berikut prosedur ekstraksi soklet (Handa, 2008):

- 1) Mencuci semua alat yang akan digunakan.
- 2) Mengeringkan semua alat yang akan digunakan.
- 3) Memberi label “maserasi serbuk daun salam dan daun sirih merah” pada wadah kaca tertutup 1,5L.
- 4) Mengambil kaca alroji dan sendok untuk tempat serbuk.
- 5) Menimbang 100 gram serbuk daun salam dan daun sirih merah.
- 6) Memasukkan 100 gram serbuk daun salam dan daun sirih merah (sesuaikan dengan label pada toples).
- 7) Merendam dengan etanol 96% 1L selama 6 hari dengan pergantian pelarut sebanyak 3 kali.
- 8) Mencatat waktu tepat setelah menutup wadah.
- 9) Melakukan pengadukan setiap 30 menit setiap hari (sore hari) menggunakan stirer.
- 10) Hasil dari masing-masing filtrat dicampur pada wadah kaca tertutup 3L kemudian disaring menggunakan kertas saring whatman-42/Flanel.
- 11) Hasil Ekstraksi dikeringkan menggunakan *rotary evaporator*.
- 12) Hasil akhir ekstrak di *freeze-dried* untuk menghilangkan residu air.
- 13) Hasil akhir ekstrak di simpan pada suhu 4°C sampai digunakan.

4.7.3 Sokletasi Daun Salam dan Daun Sirih Merah

Berikut prosedur ekstraksi soklet (Handa, 2008):

- 1) Mencuci semua alat yang akan digunakan.
- 2) Mengeringkan semua alat yang akan digunakan.

- 3) Menimbangserbukdaunsalam dan daun sirih merahsebanyak 100 gram danbungkusedengankertassaringwhatman.
- 4) Menyiapkan alat soklet untuk mengekstraksi.
- 5) Memasukkan pelarut etanol 96% dalam labu alas bulat yang ada disoklet (\pm 100 mL).
- 6) Memasukkan bahan yang telah diberi kertas saring kedalamlabuklonsongsoklet.
- 7) Menyalakan alat ekstraksi soklet.
- 8) Melakukan proses sokletasi hingga bahan terekstrak sempurna (16 siklusatau 20-25 siklus).
- 9) Hasil Ekstraksi dikeringkan menggunakan rotary evaporator.
- 10) Hasil akhir ekstrak di freeze-dryed untuk menghilangkan any residual air.
- 11) Hasil akhir ekstrak di simpan pada suhu 4°C sampai digunakan.

4.7.4 Pemaparan Ekstrak Daun Salam, Ekstrak Daun Sirih Merah, dan Kombinasi keduanya pada Kultur Sel

- 1) Mengencerkan ekstrak daun salam, ekstrak daun sirih merah, dan kombinasi keduanyasesuai dengan jumlah dan konsentrasi yang diinginkan di medium sel HeLa.
- 2) Menambahkan larutan ekstrak daun salam, ekstrak daun sirih merah, dan kombinasi keduanya tersebut ke dalam plate, mendinginkan selama 24, 48, dan 72 jam.
- 3) larutan ekstrak daun salam, ekstrak daun sirih merah, dan kombinasi keduanya dicuci dengan medium sel kembali.

4.7.5 Penentuan Kualitatif Fitokimia

Pada pengujian secara kualitatif ini digunakan reagen, untuk mengetahui kandungan fenol ditimbang ekstrak 50 mg dilarutkan dalam 5 mL aquades setelah larut ditambahkan beberapa tetes 5% FeCl₃ dan indikasi positif ekstrak mengandung phenol terdapat perubahan warna hijau tua. Untuk mengetahui adanya kandungan saponin ditimbang ekstrak 50 mg dan dilarutkan dalam 20 mL aquades, larutan suspensi tersebut dikocok selama 15 menit dalam tabung reaksi dan indikasi positif ekstrak mengandung saponin adalah terdapat 2 cm layer atau busa (Tamilselvi,2012). Untuk mengetahui kandungan minyak atsiri pada ekstrak dengan menambahkan reagen Sudan III indikasi ekstrak mengandung minyak atsiri adalah dengan perubahan warna merah pada ekstrak(Raja *et al.*, 2010).

4.7.6 Imunositokimia *caspase-3*

Berikut prosedur Imunositokimia (CCRC, 2013):

- 1) Mengambil sel HeLa CCL-2 dari inkubator CO₂, amati kondisi sel.
- 2) Memanen sel sesuai dengan protokol panen.
- 3) Menghitung jumlah sel HeLa CCL-2 sesuai dengan protokol penghitungan sel (jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji imunositokimia adalah 5×10^4 sel/sumuran (5×10^4 sel/1000 μ L RPMI 1640).
- 4) Membuat pengenceran suspensi sel sehingga konsentrasi sel akhir 5×10^4 sel/1000 μ L RPMI 1640.
- 5) Menyiapkan *24 well plate* dan *cover slip*.
- 6) Masukkan *cover slip* sejumlah yang dibutuhkan ke dalam sumuran menggunakan pinset dengan hati-hati.

- 7) Mentransfer 1000 μ L RPMI 1640 suspensi sel ke atas cover slip.
- 8) Mengamati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel.
- 9) Menginkubasi sel di dalam inkubator selama semalam.
- 10) membuat satu konsentrasi sampel, yaitu pada IC_{50} untuk perlakuan sebanyak 1000 μ L. Untuk imunositokimia, minimal diperlukan 3 perlakuan :
 - a. Perlakuan dengan sampel , b. Kontrol sel tanpa antibodi primer (akan menunjukkan warna biru), c. Kontrol sel dengan antibodi primer.
- 11) Mengambil *24 well plate* yang telah berisi sel dari inkubator CO_2 .
- 12) Membuang semua MK dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.
- 13) Mengisikan PBS masing-masing 500 μ L ke dalam sumuran untuk mencuci sel.
- 14) Membuang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.
- 15) Memasukkan sampel sebanyak 1000 μ L ke dalam sumuran.
- 16) Memasukkan 1000 μ L MK untuk kontrol sel.
- 17) Menginkubasi di dalam inkubator CO_2 selama 15 jam.
- 18) Mengamati kondisi sel setelah 14 jam, didokumentasikan dengan kamera
- 19) Menyiapkan metanol dingin dan PBS.
- 20) Pada jam ke-15, inkubasi dengan sampel dihentikan (Pekerjaan selanjutnya, tidak perlu di dalam LAF).
- 21) Membuang semua media dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.
- 22) mengisikan PBS 500 μ L ke dalam masing-masing sumuran secara perlahan untuk mencuci sel.
- 23) Membuang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.

- 24) Mengambil *cover slip* menggunakan pinset dengan bantuan ujung jarum dengan hati-hati.
- 25) Meletakkan di dalam sumuran *6-well plate* bekas atau dish bekas yang bersih.
- 26) Memberi label pada masing-masing sumuran.
- 27) Meneteskan 300 μL metanol dingin, inkubasi 10 menit di dalam *freezer*.
- 28) metanol secara perlahan, jangan sampai *cover slip* terbalik.
- 29) Menambahkan 500 μL PBS pada *cover slip*, diamkan selama 5 menit., ambil dan buang PBS dengan mikropipet 1 mL, lakukan pencucian dengan PBS 2 kali.
- 30) Menambahkan 500 μL akuades, diamkan selama 5 menit, buang akuades, lakukan pencucian dengan akuades 2 kali.
- 31) Meneteskan larutan hidrogen peroksida (*blocking solution*), diinkubasi selama 10 menit, dibuang larutan dengan mikropipet.
- 32) Meneteskan *prediluted blocking serum*, inkubasi selama 10 menit, buang larutan.
- 33) Meneteskan antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati (*caspase-3*) dengan pengenceran 1:200 sebesar 400 μL .
- 34) Menambahkan 500 μL PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS.
- 35) Meneteskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (*biotinylated universal secondary antibody*) pengenceran 1:200 sebesar 400 μL lalu di inkubasi selama 10 menit.
- 36) Menambahkan 500 μL PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS.
- 37) Meneteskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, inkubasi selama 10 menit.

- 38) Menambahkan 500 μ L PBS, inkubasi selama 5 menit, buang PBS.
- 39) meneteskan larutan substrat kromogen DAB, inkubasi selama 10 menit.
- 40) Menambahkan 500 μ L akuades, kemudian buang kembali.
- 41) Meneteskan larutan Mayer inkubasi selama 3 menit.
- 42) Menambahkan 500 μ L akuades, kemudian buang kembali.
- 43) Mengangkat *cover slip* dengan pinset secara hati-hati, kemudian celupkan dalam xylol.
- 44) Mencilupkan *cover slip* dalam alkohol. *cover slip* dikeringkan.
- 45) Meletakkan *cover slip* di atas gelas objek, tetesi dengan lem (*mounting media*). Menutup *cover slip* dengan *cover slip* kotak.
- 46) Mengamati ekspresi protein dengan mikroskop cahaya.

4.8 Analisa Data

Hasil pengukuran dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16,0 for Windows 7. Dilakukan uji normalitas dan homogenitas data. Uji statistik data menggunakan one way ANOVA. Untuk mengetahui pengaruh dosis daun salam dan daun sirih merah serta kombinasinya terhadap aktivitas apoptosis dari aktivasi caspase-3. Dengan tingkat kebermaknaan 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Apabila diperoleh $p > 0,05$ artinya tidak ada perbedaan/pengaruh yang signifikan, sebaliknya bila $p < 0,05$ menunjukkan ada perbedaan/pengaruh yang signifikan.