

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan *desain true experimental laboratorik* dengan metode *Randomized Posttest Only Controlloed Group Design*. Dimana pemilihan subjek penelitian untuk pengelompokan dan pemberian perlakuan dengan menggunakan metode Rancangan acak lengkap. Hal ini karena hewan coba, tempat percobaan, dan bahan penelitian dapat dikatakan homogen.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Histologi, dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai Januari 2012 sampai dengan September 2012

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang menjadi target penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*). Sampel penelitian yang digunakan adalah tikus putih strain wistar.

4.3.1 Cara Pemilihan Sampel

Penelitian ini menggunakan hewan uji berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar. Adapun kriteria inklusi yang digunakan adalah sebagai berikut:

- tikus betina
- usia 2-3 bulan
- berat badan 150-200 gram
- kondisi sehat yang ditandai dengan gerak yang aktif.

Sedangkan yang termasuk kriteria eksklusi penelitian ini adalah :

tikus tidak sehat, sebelumnya pernah untuk eksperimen lain.

4.3.2 Estimasi Jumlah Sampel dan Pengulangan

Dalam penelitian ini terdapat 6 kelompok perlakuan. Jumlah hewan uji untuk masing – masing perlakuan dapat dicari dengan menggunakan rumus $p(n - 1) \geq 15$, dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan, p = jumlah perlakuan. Jumlah pengulangan (jumlah sampel) yang dibutuhkan adalah (Syireen, 2008):

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

Dari rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 6 maka jumlah pengulangan yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan adalah 3. Jadi untuk 6 kelompok dibutuhkan 18 ekor tikus. Randomisasi dengan *simple random sampling* (Sastroasmoro, 1995).

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

- Variabel Bebas : Pemberian ekstrak metanol ciplukan sebanyak dosis 500 mg/kgBB (P1), 1500 mg/kgBB (P2), dan 2500

mg/kgBB (P3)

b. Variabel Tergantung : Lebar Ruang Ligamen Periodontal

4.4.2 Definisi Operasional

1. **Ekstrak metanol daun ciplukan** : adalah ekstrak dari daun ciplukan (*Physalis minima L.*) yang didapat dari kota Batu yang telah disertifikasi oleh Materia Medika, yang diekstraksi dengan pelarut metanol absolut memakai alat ekstraktor sokhlet dan dibagi menjadi 3 dosis pemakaian seperti yang akan dijelaskan pada subbab selanjutnya.
2. **Hewan coba** yang digunakan adalah tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus strain wistar*) betina untuk menyesuaikan dengan keadaan pasca menopause yang terjadi pada wanita. Tikus diperoleh dari Bandung berumur 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Tikus yang sudah disiapkan dengan dibagi menjadi 6 kelompok (setiap kelompok terdiri dari 4 tikus) yaitu 1 kelompok kontrol negatif, 2 kelompok kontrol positif, dan 3 kelompok perlakuan (P₁, P₂, P₃). Kelompok kontrol positif dan perlakuan diovariectomi sehingga terjadi periodontitis. Penggunaan tikus dalam penelitian ini juga dimintakan sertifikat laik etik penelitian dalam menggunakan hewan coba.
3. **Ovariectomi** : Tindakan pembedahan berupa pengangkatan kedua ovarium hewan coba dengan tujuan mendapatkan model hewan coba dengan kondisi hipoestrogen.
4. **Lebar Ruang Ligamen Periodontal** : Lebar jaringan yang terletak di antara lapisan terluar sementum dengan lapisan terluar tulang alveolar yang diukur pada tulang mandibula tikus yang telah dibuat slide dan diwarnai dengan hematoxilin-eosin, discan menggunakan Mikroskop

dot scan dengan pembesaran 200 kali. Masing-masing preparat difoto sebanyak 4 lapangan pandang dan diukur menggunakan software olyvia dengan cara menarik garis terlebar antara lapisan terluar sementum dengan lapisan terluar tulang alveolar dalam satuan mikrometer (μm).

4.5 Alat & Bahan Penelitian

4.5.1 Bahan

4.5.1.1 Bahan Untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Kandang pemeliharaan hewan coba yang terbuat dari kotak plastik, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, alkohol 70%.

4.5.1.2 Bahan Makanan Hewan Coba

Bahan makanan Hewan Coba yang digunakan adalah *Comfeed PAR-S*, terigu, kolesterol (*feeding eade 95%*), minyak kacang dan air.

4.5.1.3 Bahan Untuk Ovariektomi Hewan Coba

Bahan yang digunakan adalah ketamin untuk anastesi, *betadine solution* dan alkohol 70%, basitrasin serbuk, gentamisin, dan novalgin.

4.5.1.4 Bahan Ekstraksi Daun Ciplukan (*Physalis minima L.*)

6,5 kg Daun Ciplukan (*Physalis minima L.*) yang berasal dari kota Batu yang telah disertifikasi oleh Materia Medika, 450 ml methanol, air pendingin.

4.5.1.5 Bahan Pemrosesan Jaringan dengan Teknik Rutin

Oven, jaringan, formalin, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 96%+prusi, *xylol*, parafin cair (58-60 °c), *gliserin*, air, mayer albumin (putih telur) atau *polisin*, cat.

4.5.1.6 Bahan Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Preparat jaringan periartikular, hematoksilin, eosin, alkohol 1%.

4.5.1.7 Bahan Pemeriksaan Sediaan Histologis Lebar Ruang Ligamen

Periodontal

Minyak emersi untuk pengamatan pada perbesaran 200x

4.5.2 Alat

4.5.2.1 Alat Pembuatan Makanan Hewan Coba

Baskom plastik, timbangan, pembuat pelet, gelas ukur, serta pengaduk.

4.5.2.2 Alat Untuk Ovariektomi Hewan Coba

Meja operasi kecil, baki plastic, handscoen, spet 1 cc, alat cukur, duk steril, pisau tajam untuk insisi, benang, jarum jahit, kasa steril, plester, cotton bud, kapas, dan kandang pemulihan.

4.5.2.3 Alat Ekstraksi Daun Ciplukan (*Physalis minima L.*)

Nampan, pisau, kertas timbel, oven, ekstraktor sochlet, pH meter, satu set alat evaporator vakum/rotary vaccum, waterbath, neraca analitik, tabung erlenmeyer 50 ml dan 250 ml, botol tempat penyimpanan hasil ekstrak.

4.5.2.4 Alat untuk Pemberian Ekstraksi Daun Ciplukan

Alat yang dibutuhkan adalah spuit dan sonde

4.5.2.5 Alat untuk Pembuatan Preparat Tulang Mandibula

Bak, pisau mikrotom, alat cetak yang berbentuk logam berbentuk siku-siku, kaca, tempat parafin, label, lempengan logam, pegangan mikrotom, water bath.

4.5.2.6 Alat Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Rak untuk pewarnaan, pipet, *cover glass*.

4.5.2.7 Alat Pemeriksaan Sediaan Histologis Lebar Ruang Ligamen Periodontal

Mikrometer objektif dan mikroskop cahaya binokuler.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Dilakukan persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba, anyaman kawat, sekam, botol minum, alas semprot, tempat makan, pakan kalsium/fosfat kadar tinggi, alkohol 70%, hewan uji tikus wistar, dan seleksi tikus berdasarkan usia, berat badan, jenis kelamin, kesehatan. Tikus diadaptasikan di dalam laboratorium Farmakologi selama 10 hari. Tikus dibagi dalam enam kelompok yang masing-masing terdiri dari 4 ekor yaitu (a) kelompok normal/tanpa perlakuan, (b) kelompok kontrol negatif, (c) kelompok kontrol positif; (d) kelompok perlakuan I; (e) kelompok perlakuan II; dan (f) kelompok perlakuan III.

4.6.2 Ovariektomi Tikus Putih

Ovariektomi dilakukan menurut metode Ingle dan Grith (1971) yang dimodifikasi.

- a. Setelah disterilkan, alat dan bahan disusun di atas meja kerja. Berat badan tikus ditimbang, lalu tikus difiksasi dalam posisi supinasi.
- b. Dilakukan anestesi menggunakan ketamin i.m dengan dosis 40mg/kgBB. Bulu abdomen dicukur kira kira 1 cm di atas garis kedua ovarium kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan alkohol 70% dan *betadine solution*.

Setelah itu ditutup duk steril. Insisi transabdominal dilakukan kira – kira di atas uterus sepanjang 1,5 – 2 cm selapis demi selapis sampai menembus dinding peritoneum. Luka insisi ditarik ke lateral kanan dan kiri menggunakan hak. Uterus dicari dengan menelusuri kornu *uteru-oviduct-ovarium* dengan hati-hati, ovarium kiri terlihat sebagai sekelompok anggur yang *translucen*. Oviduk dan ovarium dibebaskan dari jaringan lemak dan jaringan ikat sekitarnya. Selanjutnya oviduk bagian distal dan ovarium diligasi. Kemudian oviduk dan ovarium diangkat. Luka potongan diberi *basitrasin* serbuk. Prosedur yang sama dilakukan untuk ovarium kanan. Luka insisi ditutup atau dijahit lapis demi lapis dengan benang, kemudian luka diolesi betadine dan diberi Nebacetin, ditutup dengan kassa steril. Kemudian diberikan gentamycin i. m dengan dosis 60 – 80 mg/kgBB 1 kali per hari selama 3 hari, dan Novalgine i.m dengan dosis 0,3 ml selama 1 hari. Tikus yang telah diovariectomi dipindah ke dalam kandang pemulihan. Tiap kandang berisi 1 ekor. Tikus diamati terus sampai sadar. Selama pemeliharaan tikus diberi makan dan minum yang cukup, cahaya terang atau gelap bergantian selama 12 jam dan dalam suhu kamar. Pasca operasi, untuk mencegah terjadinya infeksi maka diberi antibiotik amoksisilin 3mg/kg BB. Penilaian keberhasilan ovariectomi dilakukan 2 minggu setelah ovariectomi, di mana kadar estradiol mengalami penurunan secara nyata.

4.6.3 Pembuatan Pakan Standar Untuk Hewan Coba

Diet normal tikus : makanan terdiri dari 67% *comfeed* PAR-S, 33% terigu dan air secukupnya. Jumlah makanan rata-rata tikus 100g/hari. Perbandingan konsentrat dengan tepung 2:1. 100 g makanan mengandung konsentrat 66,6 g/hari dan tepung terigu 33,4 g/hari. Konsentrat terdiri dari 63,8% karbohidrat, 5%

lemak, 19% protein. Karbohidrat dalam konsentrat: 42,9 g/hari. Kalori 177,74 kkal/hari (1 g karbohidrat: 4,183 kkal). Lemak dalam konsentrat: 33,3 g/hari. Kalori 29,27 kkal/hari (1 g lemak: 9 kkal). Protein dalam konsentrat: 12,65 g/hari. Kalori 50,52 kkal/hari (1 g protein: 4 kkal). Tepung terigu 33,4 g/hari. Kalori: 139,71 kkal/hari (1 g tepung terigu: 4,183 kkal). Total kalori/hari: 397,34 kkal/hari. Tanpa memperhitungkan kandungan air sehingga makan tikus diberikan dalam keadaan setengah basah. Makanan dan minuman tikus diberi adbitum.

4.6.4 Ekstraksi Daun Ciplukan (*Physalis minima L.*)

Daun ciplukan diiris tipis-tipis, diletakkan di atas nampan, dan dikeringkan pada suhu ruang. Daun ciplukan kering ditimbang dan diambil sebanyak 100 g lalu dimasukkan dalam kertas timbel yang telah dijahit dan dimasukkan dalam ekstraktor soxhlet. Metanol 96% sebanyak 450 ml dimasukkan ke dalam ekstraktor soxhlet. Air pendingin dialirkan. Metanol 96% dan daun ciplukan kering dalam ekstraktor soxhlet dipanaskan dengan *waterbath*. Ekstraksi dilakukan selama 7 kali siklus. Setelah dilakukan ekstraksi, hasil yang diperoleh kemudian didinginkan dalam suhu ruang. Sehingga, didapatkan ekstrak yang masih bercampur dengan pelarut Metanol 96%. Ekstrak yang bercampur dengan campur pelarut dimasukkan dalam *rotator evaporator* pada suhu 40-60°C. Pelarut metanol 96% diuapkan sampai diperoleh ekstrak kental. Didapatkan ekstrak konsentrasi 100%.

4.6.5 Pemberian Ekstrak Metanol Daun Ciplukan

Pemberian ciplukan secara *intra gastric* dengan menggunakan spuit yang pada ujungnya dipasang sonde yang dapat dimasukkan melalui mulut sampai ke

lambung mencit.

Penentuan dosis ekstrak daun ciplukan mengacu pada penelitian Permatasari (2007), yaitu pemberian ekstrak daun ciplukan terhadap kultur sel endotel manusia (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells/HUVECS*) dapat memberikan *estrogenic effect* pada dosis 5%, 15%, dan 25%. Selanjutnya kadar tersebut digunakan sebagai dasar penghitungan dosis dan dikonversikan 10.000 kali ke dalam tubuh tikus (Permatasari, 2007).

Pemberian ekstrak dilakukan selama 4 minggu dikarenakan pemberian diharapkan menyerupai model terapi jangka panjang sehingga dapat memberikan efek yang optimal, dimana 1 bulan usia tikar wistar putih setara dengan usia manusia (Permatasari, 2007).

Hewan coba dibagi menjadi 6 kelompok yaitu 3 (tiga) kelompok kontrol dan 3 (tiga) kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 4 (empat) ekor tikus dengan rincian sebagai berikut:

- a. Kelompok 1 : tanpa ovariektomi dan tanpa pemberian ekstrak metanol daun ciplukan, lebar ruang ligamen periodontal diamati setelah 8 minggu ovariektomi.
- b. Kelompok 2 : ovariektomi tanpa pemberian ekstrak daun metanol ciplukan, lebar ruang ligamen periodontal diamati setelah 4 minggu ovariektomi.
- c. Kelompok 3 : ovariektomi tanpa pemberian ekstrak metanol daun ciplukan, lebar ruang ligamen periodontal diamati setelah 8 minggu ovariektomi.
- d. Kelompok 4 : ovariektomi, kemudian setelah 4 minggu ovariektomi diberi ekstrak metanol daun ciplukan 500 mg/kgBB. Lebar ruang

ligamen periodontal diamati setelah 4 minggu pemberian ekstrak metanol daun ciplukan.

- e. Kelompok 5 : ovariectomi, kemudian setelah 4 minggu ovariectomi diberi ekstrak metanol daun ciplukan 1.500 mg/kgBB. Lebar ruang ligamen periodontal diamati setelah 4 minggu pemberian ekstrak metanol daun ciplukan.
- f. Kelompok 6 : ovariectomi, kemudian setelah 4 minggu ovariectomi diberi ekstrak metanol daun ciplukan 2500 mg/kgBB. Lebar ruang ligamen periodontal diamati setelah 4 minggu pemberian ekstrak metanol daun ciplukan.

4.6.6 Pengambilan Sediaan Tulang Mandibula

Disiapkan peralatan bedah minor, pinset, gunting, eter, formalin 10%, dan botol-botol tertutup untuk tempat organ tikus. Tikus dibunuh dengan cara tikus dimasukkan pada tempat tertutup berisi kapas yang ditetesi eter, kemudian ditutup rapat dan ditunggu beberapa menit sampai tikus benar-benar mati/tidak bergerak lagi. Tikus yang mati diletakkan di atas alas papan dengan perut menghadap ke atas. Tikus difiksasi dengan menggunakan paku payung yang ditancapkan pada keempat telapak kaki. Bagian kepala tikus di dekaputasi dan diambil tulang alveolar mandibula tikus dan dimasukkan dalam botol tertutup berisi formalin 10% sampai terendam seluruhnya untuk mengawetkan sel-sel sehingga struktur sel tidak berubah. Organ tersebut siap dikirim untuk pemrosesan menjadi preparat di Laboratorium Anatomi Histologi.

4.6.7 Pembuatan Preparat Tulang Mandibula

Melakukan proses fiksasi, dehidrasi, *clearing* dan impregnasi dengan cara mencelupkan jaringan ke dalam larutan seperti di bawah ini sesuai dengan waktu yang telah ditentukan.

Tabel 4.1 Pemrosesan Jaringan

Tabung	Larutan	Waktu	Proses
1	Formalin	2 jam	Fiksasi
2	Alkohol 70%	1 jam	Dehidrasi
3	Alkohol 80%	2 jam	Dehidrasi
4	Alkohol 95%	2 jam	Dehidrasi
5	Alkohol 96%+Prusi	2 jam	Dehidrasi
6	Alkohol 96%+Prusi	1 jam	Dehidrasi
7	Alkohol 96%+Prusi	2 jam	Dehidrasi
8	Xylol	1 jam	Clearing
9	Xylol	2 jam	Clearing
10	Xylol	2 jam	Clearing
11	Parafin cair (58-60 °C)	2 jam	Impregnasi
12.	Parafin cair (58-60 °C)	2 jam	Impregnasi

Kemudian dilakukan *embedding* dan penyayatan jaringan dengan mikrotom dengan tata urutan sebagai berikut : Alat cetak yang berbentuk logam berbentuk siku-siku disusun di atas permukaan kaca yang telah diolesi gliserin. Penggunaan gliserin ini untuk mempermudah pemisahan alat cetak dari blok parafin yang sudah beku. Dua tempat parafin cair, yaitu parafin sebagai bahan *embedding* dan parafin sebagai media penyesuaian temperatur jaringan yang akan ditanam, dipersiapkan dengan temperatur optimum tetapi tidak mengembangkan alat cetak blok. Parafin cair pada tempat pertama dituangkan ke dalam alat cetak hingga penuh pada permukaannya, lalu jaringan ditanam pada posisi yang sesuai dengan bagian permukaan jaringan yang menempel pada kaca diusahakan rata. Alat cetak dilepas bila parafin sudah cukup keras, lalu blok jaringan diberi label dan slap disayat. Blok parafin tadi ditempelkan pada

alat pemegangnya yang berupa lempengan logam yang sudah dipanasi. Perhatikan sisi blok mana yang akan dipotong, kemudian didinginkan pada suhu kamar agar melekat erat. Pisau mikrotom dipasang pada pegangan mikrotom membentuk sudut 5-10°. Pisau harus selalu tajam dan permukaannya rata benar. *Water bath* dipersiapkan dengan mengatur suhu air di bawah titik leleh parafin ($\pm 48^{\circ}\text{C}$). Blok yang sudah menempel pada pemegangnya dipasang pada mikrotom dan *slap* dilakukan perpotongan tipis dengan ketebalan yang dikehendaki, umumnya 4-8 mikron. Hasil pemotongan berupa pita tipis dengan hati-hati dipindahkan ke dalam *water bath* agar sayatan jaringan mengembang dengan baik. Sayatan diseleksi dan dipindahkan ke atas kaca obyek dengan telah diolesi dengan *mayer albumin* (putih telur) atau *polisin* sebagai bahan perekatnya dan sudah diberi label pada blok. Sediaan dibiarkan kering dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu optimum (5860°C) selama 30 menit, dan sediaan *slap* dicat.

4.6.8 Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Sediaan dicelup dalam larutan xylol bak 1 selama 2 menit. Pindahkan dalam larutan xylol II selama 2 menit. Dalam alkohol absolut 2 bak, bak I dan bak II, masing-masing 1 menit. Dalam alkohol 95% 2 bak, bak I dan bak II, masing-masing 1 menit. Cuci dalam air mengalir selama 10 menit. Masukkan dalam larutan *mayer hemotoksilin* selama 15 menit. Cuci kembali dengan air. Masukkan ke dalam eosin antara 15 detik sampai 2 menit. Masukkan dalam alkohol 95% 2 bak, bak I dan bak II, masing-masing 1 menit. Dalam alkohol absolut 3 bak, bak I, bak II, dan bak III, masing-masing 2 menit. Terakhir dalam xylol bak I, bak II, dan bak III, masing-masing 2 menit. *Mounting*.

4.6.9 Pemeriksaan Sediaan Histologis Lebar Ruang Ligamen Periodontal

Tahapan-tahapan pemeriksaannya adalah sebagai berikut:

- a. Slide tulang hasil pewarnaan Hematoksilin-Eosin diperiksa menggunakan Mikroskop dot scan dengan *software* Olyvia.
- b. Menghitung lebar ruang ligamen periodontal dan mengambil gambar menggunakan menggunakan Mikroskop dot scan dengan *software* Olyvia.

4.7 Alur Penelitian

Lihat lampiran 2

4.8 Analisis Data

4.8.1 Pengumpulan Data

Data dalam penelitian ini dikumpulkan dari hasil evaluasi pada kelompok normal dilakukan pembedahan setelah 8 minggu tanpa dilakukan ovariektomi, pada tikus control 1 dilakukan pembedahan setelah ovariektomi selama 4 minggu, pada tikus kontrol 2 dilakukan pembedahan setelah ovariektomi selama 8 minggu. Dan pada tikus perlakuan 1,2, dan 3 dilakukan pembedahan setelah 4 minggu ovariektomi dan 4 minggu terapi ekstrak metanol daun ciplukan. Setelah itu struktur diamati secara histologi.

4.8.2 Rencana Pengolahan dan Analisis Data

Hasil pengukuran lebar ruang ligamen periodontal normal, kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *SPSS 17.0 for Macintosh* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif sebagai berikut:

- a. Uji normalitas data : bertujuan untuk menginterpretasikan apakah suatu data memiliki sebaran normal atau tidak. Karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung dari normal tidaknya distribusi data. Untuk penyajian data yang terdistribusi normal, maka digunakan mean dan standar deviasi sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Sedangkan untuk penyajian data yang tidak terdistribusi normal digunakan median dan minimum-maksimum sebagai pasangan ukuran pemusatan dan penyebaran. Untuk uji hipotesis, jika sebaran datanya normal, maka digunakan uji parametrik. Sedangkan jika sebaran data tidak normal digunakan uji non parametrik.
- b. Uji homogenitas varian : bertujuan untuk menguji berlaku atau tidaknya asumsi ANOVA, yaitu apakah data yang diperoleh dari setiap perlakuan memiliki varian yang homogen. Jika didapatkan varian yang homogen, maka analisa dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.
- c. Uji *One-way* ANOVA : bertujuan untuk membandingkan nilai rata-rata dari masing-masing kelompok perlakuan dan mengetahui bahwa minimal ada dua kelompok yang berbeda signifikan.
- d. Post hoc test (uji *Least Significant Difference*) : bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil tes ANOVA. Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji LSD dengan tingkat kemaknaan 95% ($p < 0,05$)
- e. Uji Korelasi Pearson : untuk mengetahui besarnya perbedaan secara kualitatif kelompok yang berbeda secara signifikan, yang telah ditentukan sebelumnya dari hasil uji *Post Hoc* (LSD)