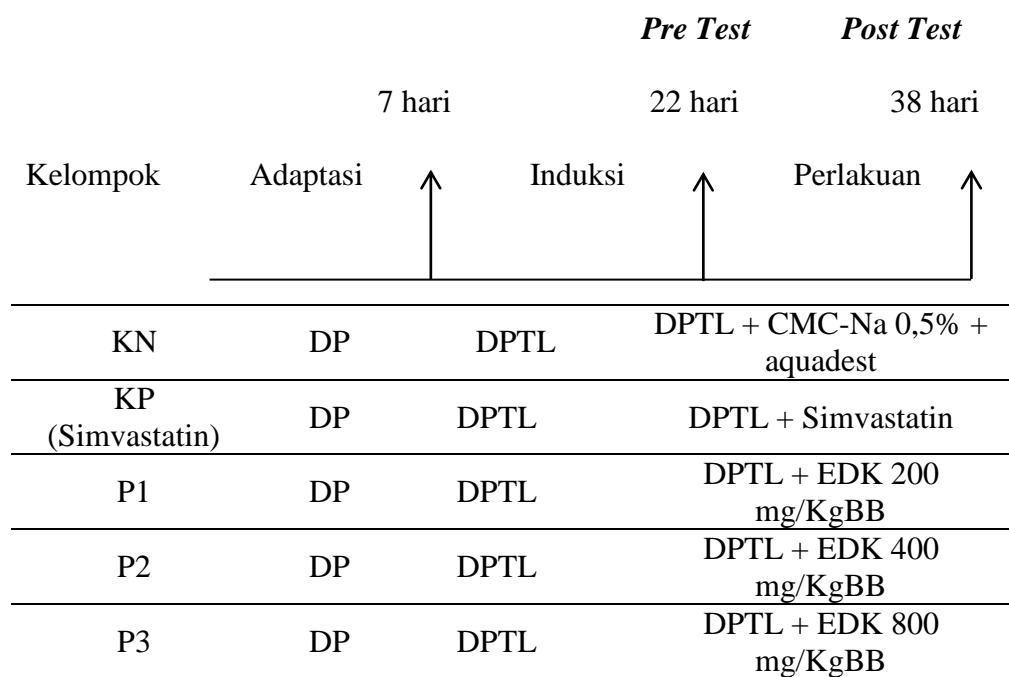


BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain penelitian

Metode penelitian menggunakan metode penelitian eksperimental, dengan rancangan *pre and post with control group design*.



Tabel 3.1 Desain penelitian selama 39 hari

Keterangan

- DP : Diet Pakan
- DPTL : Diet Pakan Tinggi Lemak
- EDK : Ekstrak Daun Kitolod
- P : Perlakuan
- KP : Kelompok Positif
- KN : Kelompok Negatif

B. Lokasi penelitian

1. Tempat penelitian

- a. Pembuatan ekstrak daun kitolod dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

b. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi Fakultas Biologi Universitas Diponegoro.

c. Pengujian hewan uji dalam penelitian kolesterol dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2019 - Januari 2020

C. Subyek Penelitian

Penentuan jumlah sampel hewan uji, menggunakan rumus federer (1991).

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

Keterangan

n : Banyaknya hewan uji tiap kelompok

t : banyaknya kelompok

Sampel dibagi ke dalam 5 kelompok, menjadi :

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

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1)(4) \geq 15$$

$$n \geq 4,75$$

$$n \geq 5$$

Penelitian ini digunakan ekstrak daun kitolod sebagai bahan uji untuk penelitian. Setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus putih jantan, sehingga digunakan tikus putih sebanyak 25 ekor untuk penelitian ini. Menyiapkan 30 ekor tikus, sisa 5 tikus digunakan untuk pencadangan jika sewaktu – waktu ada tikus yang mati.

Uji kadar HDL dan LDL yang digunakan adalah darah hewan uji tikus putih jantan galur wistar yang memenuhi kriteria sebagai berikut :

1. Kriteria inklusi

- a. Tikus putih jantan galur wistar.
- b. Berat badan tikus 150 – 200 gram
- c. Umur 2-3 bulan dengan kondisi sehat.

2. Kriteria eksklusi

Tikus sakit atau mati selama masa penelitian.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang menjadi sebab perubahan (mempengaruhi). Variabel bebas dari penelitian ini yaitu ekstrak daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.), dengan pemberian dosis 100 mg/KgBB, 200 mg/KgBB, 400 mg/KgBB tikus secara per oral menggunakan sonde pada tikus putih jantan (Dermiati, *et al.*, 2017).

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung merupakan variabel yang timbul akibat variabel bebas (variabel terikat). Yang menjadi variabel tergantung pada penelitian ini yaitu peningkatan kadar HDL dan penurunan kadar LDL pada tikus putih jantan.

a. Kolesterol HDL

Kolesterol HDL adalah kolesterol dengan desitas tinggi yang terdapat dalam darah akibat pemberian diet tinggi lemak. Kadar normal pada tikus

putih jantan yaitu ≥ 35 mg/dL (Schaerfer *et al.*, dalam Hartoyo *et al.*, 2008).

Alat ukur : Spektrofotometer λ 500 nm

Hasil ukur : mg/dL

Skala : Rasio

b. Kolesterol LDL

Kolesterol LDL adalah kolesterol dengan densitas rendah dalam darah akibat pemberian diet tinggi lemak. Ambang batas normal LDL pada tikus adalah 7-27,2 mg/dl (Herwiyarirasanta, 2010).

Alat ukur : Rumus Friedwald dengan menggunakan pemeriksaan tidak langsung, yang membutuhkan data dari kadar kolesterol total, HDL, dan trigliserida.

$$\text{LDL} = \text{kolesterol total} - \frac{\text{trigliserida}}{5} - \text{kolesterol HDL}$$

Hasil ukur : mg/dL

Skala : Rasio

3. Variabel Terkendali

Variabel Terkendali adalah variabel yang mempengaruhi hubungan antara variabel bebas dan variabel tergantung.

Variabel Terkendali pada penelitian ini meliputi :

- a. Jenis Kelamin, galur, umur, dan berat badan hewan uji sama yaitu jantan, galur wistar, 2-3 bulan, dan 150-200 gram.

- b. Jenis dan jumlah pakan kelompok perlakuan sama antara semua kelompok.
- c. Tempat dan pemeliharaan dikondisikan sama antara semua kelompok Waktu perlakuan secara bersamaan.

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam pengujian ini adalah *rotary evaporator*, kandang hewan uji, timbangan tikus, botol minum, sonde, kain saring, toples kaca, batang pengaduk, cawan penguap, spatel, pipa kapiler, rak tabung, tabung sentrifuge, beker glass, gelas ukur, vial, labu ukur, tabung *effendorf*, ayakan mesh 40, blender, spuit, *waterbaht*, timbangan analitik, mikropipet, sentrifugator, seperangkat alat maserasi, spektrofotometer λ 500 nm.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :

a. Tikus

- 1) Tikus putih jantan galur wistar
- 2) Umur 2-3 bulan
- 3) Berat 150-200 gram

b. Bahan

Etanol 96%, CMC Na 0,5%, aquadest, pakan tinggi lemak (kuning telur puyuh, lemak sapi, minyak jelantah), pakan BR II, ekstrak daun kitolod, aquadest, $AlCl_3$, asam asetat, quersetin, simvatatin 20 mg, reagen

presipitasi HDL (Buffer, Holesterol esterase, Cholesterol oxidase, Peroxidase, DSBmt (HDL presipitant/R1) 4 aminoantipyrine), dan reagen kolesterol KIT (Buffer fosfat pH 6,5 100 mmol/l, 4-aminophenazone 0,25 mmol/l, Fenol 5 mmol/l, Peroksida 5 KU/l, Kolesterol esterase > 150 U/l, Kolesterol oksidasi > 100 U/l, Natrium azid 0,05%)

F. Pengumpulan Data

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi Fakultas Biologi Universitas Diponegoro. Dilakukan determinasi untuk mengetahui kebenaran tanaman daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.), yang digunakan dalam penelitian.

2. Penyiapan Bahan

Daun kitolod (*Isotoma longiflora* L.) yang diperoleh dari daerah Sumowono, Jawa Tengah. Bahan yang diperoleh lalu dicuci hingga bersih dengan air mengalir. Setelah itu ditiriskan dan diangin – anginkan di tempat yang terkena sinar matahari secara langsung sampai kering. Setelah daun kering lalu digiling hingga halus menjadi serbuk dan diayak.

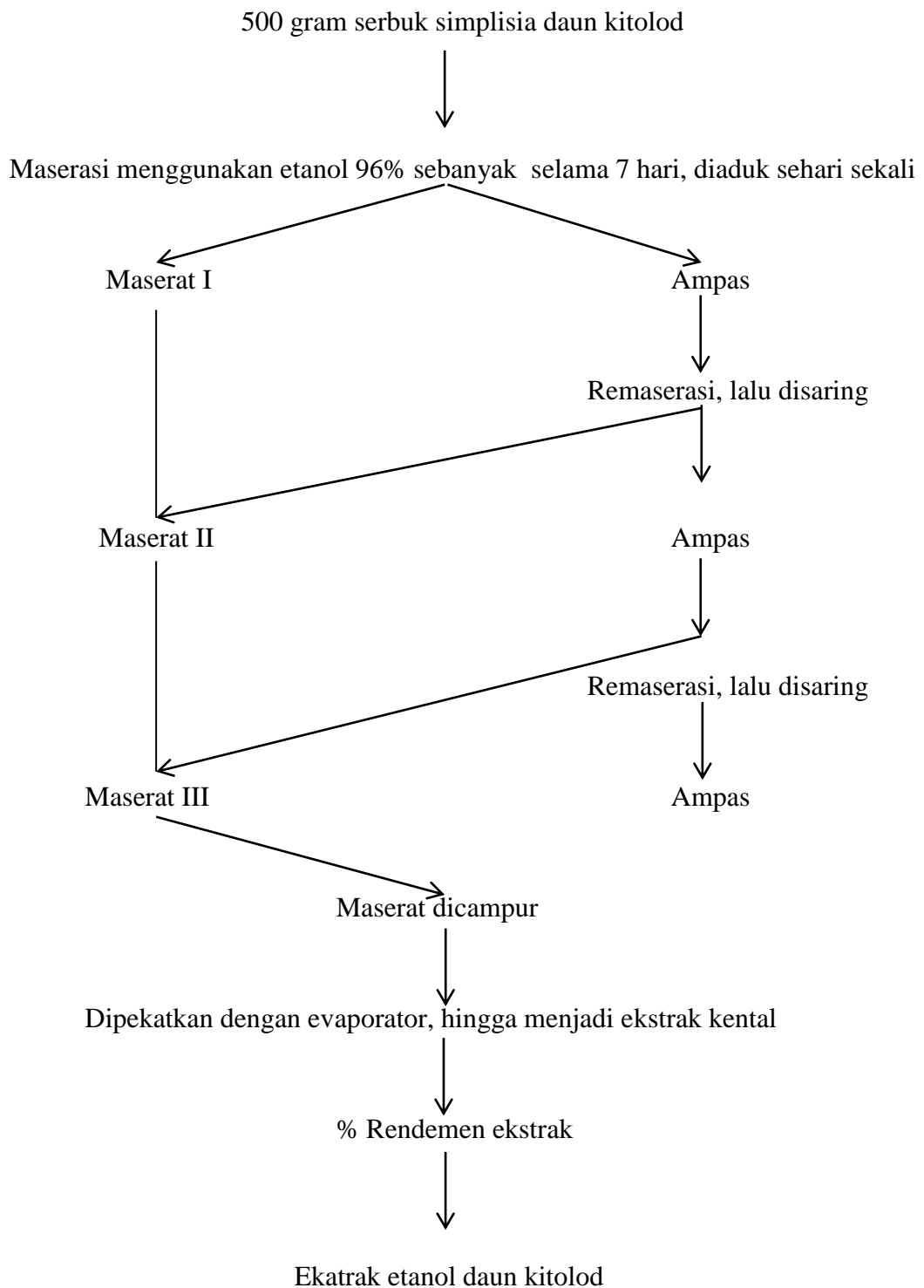
3. Ekstrak Etanol Daun Kitolod

Ekstrak daun kitolod dibuat dengan metode maserasi dengan menimbang 300 gram serbuk simplisia kering daun kitolod, dan diekstraksi menggunakan etanol 96% sebanyak 3 liter di dalam toples kaca. Pelarut

yang digunakan adalah etanol karena etanol adalah pelarut yang aman dan tidak toksik (Markham, 1988).

Maserasi dilakukan selama 7 hari dengan pengadukan sekali sehari dan dilakukan remaserasi 2 hari. Untuk maserasi digunakan etanol sebanyak 12.500 ml, untuk remaserasi pertama digunakan etanol sebanyak 750 ml, dan untuk remaserasi kedua digunakan etanol sebanyak 750 ml. Ekstrak yang dihasilkan lalu disaring untuk mendapatkan filtrat dan residunya. Filtrat dipekatkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 60°C. Tujuan menggunakan pelarut etanol 96% yaitu dimaksudkan agar cairan penyari dapat masuk ke pori-pori serbuk simplisia sehingga mempermudah dalam proses penyarian selanjutnya dan pelarut ini merupakan pelarut polar.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (g)}}{\text{bobot bahan sampel (g)}} \times 100\%$$



Gambar 3.2 Skema pembuatan ekstrak kental daun kitolod

4. Uji Kandungan Total Flavonoid

Dilartukan 0,1 gram ekstrak, dilarutkan etanol sebanyak 10 ml. Setelah itu diambil 1000 ppm sampel dan ditambah dengan 1,0 mL AlCl₃ 2%, 8 mL asam asetat, lalu diinkubasi selama 9 menit, dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis. Kuersetin dibuat dengan konsentrasi 50-90 mg/L sebagai kurva kalibrasi standar. Absorbansi sampel diinterpolasi ke dalam persamaan regresi linier pada kurva standar (Septiani, *et al.*, 2018).

Rumus mencari kandungan flavonoid total berdasarkan penelitian Desmiati, *et al.*, (2009).

$$F = \frac{C \cdot V \cdot fp \cdot 10^{-6}}{m}$$

Keterangan :

F: jumlah flavonoid

C: kesetaraan Quersetin (mg/ml)

V: volume total ekstrak

f: faktor pengenceran

m: berat sampel (g)

5. Pemberian pakan tinggi lemak

Diberikan pakan diet lemak tinggi untuk menaikkan kadar kolesterol di dalam darah. Dengan pencampuran makanan yaitu lemak sapi, minyak jelantah, dan kuning telur puyuh yang diberikan sebanyak 5 ml.

6. Pemberian ekstrak etanol daun kitolod dan simvastatin

Diberikan ekstrak etanol daun kitolod dan simvastatin sebagai tanda apakah daun kitolod efeknya hampir sama dengan simvastatin, dan berguna untuk melihat adanya perubahan kadar.

7. Penentuan Dosis

Asumsi perhitungan untuk menetapkan dosis dari masing-masing bahan :

a. Penetapan Dosis Ekstrak Daun kitolod

Pemberian peroral pada tikus 150 gram adalah 5 ml (Kusumawati, 2004). Berat rata-rata tikus yang digunakan adalah 200 gram, jadi $200/100 \times 5 \text{ ml} = 10 \text{ ml}$. Volume pemberian peroral adalah setengah dari pemberian maksimal, jadi $\frac{1}{2} \times 10 \text{ ml} = 5 \text{ ml}$.

Penelitian ini menggunakan dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/KgBB, dan 800 mg/KgBB tikus yang diberikan secara peroral menggunakan sonde.

1) Ekstrak daun kitolod dengan dosis 200 mg/KgBB tikus

$$\text{Dosis ekstrak} = 200 \text{ mg/KgBB/Hari}$$

$$\text{Berat tikus diasumsikan} = 200 \text{ gram} = 0,2 \text{ Kg}$$

$$\text{Dosis pemberian tikus} = \text{Dosis ekstrak} \times \text{Berat tikus}$$

$$= 200 \text{ mg/Kg} \times 0,2 \text{ Kg}$$

$$= 40 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis stok} = \frac{\text{Dosis ekstrak}}{\text{Volume pemberian}}$$

$$= \frac{40 \text{ mg}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 8 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Sediaan sebanyak 50 ml} = \text{Stok ekstrak} \times \text{Volume sediaan}$$

$$= 8 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ ml}$$

$$= 400 \text{ mg}$$

$$= 0,4 \text{ gram}$$

Untuk membuat ekstrak daun kitolod dengan dosis 200 mg/KgBB :

Ditimbang sebanyak 0,4 gram ekstrak ditambah dengan CMC-Na 0,5 % secukupnya lalu dilarutkan dengan aquades ad 50 ml.

2) Ekstrak daun kitolod dengan dosis 400 mg/KgBB tikus

$$\text{Dosis ekstrak} = 400 \text{ mg/KgBB/Hari}$$

$$\text{Berat tikus diasumsikan} = 200 \text{ gram} = 0,2 \text{ Kg}$$

$$\text{Dosis pemberian tikus} = \text{Dosis ekstrak} \times \text{Berat tikus}$$

$$= 400 \text{ mg/Kg} \times 0,2 \text{ Kg}$$

$$= 80 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis stok} = \frac{\text{Dosis ekstrak}}{\text{Volume pemberian}}$$

$$= \frac{80 \text{ mg}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 16 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Sediaan sebanyak 50 ml} = \text{Stok ekstrak} \times \text{Volume sediaan}$$

$$= 16 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ ml}$$

$$= 800 \text{ mg}$$

$$= 0,8 \text{ gram}$$

Untuk membuat ekstrak daun kitolod dengan dosis 400 mg/KgBB :

Ditimbang sebanyak 0,8 gram ekstrak ditambah dengan CMC-Na 0,5 % secukupnya lalu dilarutkan dengan aquades ad 50 ml.

3) Ekstrak daun kitolod dengan dosis 800 mg/KgBB tikus

$$\text{Dosis ekstrak} = 800 \text{ mg/KgBB/Hari}$$

$$\begin{aligned}
\text{Berat tikus diasumsikan} &= 200 \text{ gram} = 0,2 \text{ Kg} \\
\text{Dosis pemberian tikus} &= \text{Dosis ekstrak} \times \text{Berat tikus} \\
&= 800 \text{ mg/Kg} \times 0,2 \text{ Kg} \\
&= 160 \text{ mg} \\
\text{Dosis stok} &= \frac{\text{Dosis ekstrak}}{\text{Volume pemberian}} \\
&= \frac{160 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \\
&= 32 \text{ mg/ml} \\
\text{Sediaan sebanyak 50 ml} &= \text{Stok ekstrak} \times \text{Volume} \\
&= 32 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ ml} \\
&= 1600 \text{ mg} \\
&= 1,6 \text{ gram}
\end{aligned}$$

Untuk membuat ekstrak daun kitolod dengan dosis 800 mg/KgBB :

Ditimbang sebanyak 1,6 gram ekstrak ditambah dengan CMC-Na 0,5 % secukupnya lalu dilarutkan dengan aquades ad 50 ml.

b. Dosis Simvastatin

Dosis simvastatin pada manusia adalah 10 – 40 mg/hari, dan pada penderita jantung 20 mg/hari (IONI, 2017). Dosis simvastatin yang digunakan untuk penelitian yaitu 20 mg/hari. Berdasarkan tabel konversi Laurence and Bacharach, (1964) dalam Anugrah (2012), dosis tikus didapatkan dari perkalian dengan faktor konversi dari manusia ke tikus yaitu 0,018, dengan berat manusia 70 kg ke tikus putih 200 gram.

$$\text{Dosis manusia 70 kg} \qquad \qquad \qquad = 20 \text{ mg/hari}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Dosis simvastatin pada tikus} &= 0,018 \times \text{dosis manusia} \\
 &= 0,018 \times 20 \text{ mg/hari} \\
 &= 0,36 \text{ mg}/200 \text{ gramBB/hari} \\
 &= 1,8 \text{ mg}/\text{KgBB/hari}
 \end{aligned}$$

$$\text{Volume pemberian tikus} = 5 \text{ ml}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Konsentrasi stok simvastatin} &= \frac{\text{Dosis tikus}}{\text{Volume pemberian}} \\
 &= \frac{0,36 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \\
 &= 0,072 \text{ mg/ml}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Sediaan sebanyak 50 ml} &= \text{stok simvastatin} \times \text{volume} \\
 &= 0,072 \text{ mg/ml} \times 50 \text{ ml} \\
 &= 3,6 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

Berat tablet simvastatin 20 mg yaitu 200 mg

Berat tablet yang dibutuhkan untuk membuat sediaan 50 ml adalah :

$$\frac{3,6 \text{ mg}}{x} = \frac{20 \text{ mg}}{200 \text{ mg}}$$

$$X = \frac{3,6 \text{ mg} \times 20 \text{ mg}}{200 \text{ mg}}$$

$$X = 36 \text{ mg}$$

Pembuatan larutan simvastatin, dengan cara melarutkan antara simvastatin yang ditambah dengan CM – Na 0,5% secukupnya dan dilarutkan dengan aquadest ad 5 ml.

c. Pembuatan Suspensi CMC – Na 0,5 % sebanyak 100 ml

$$\text{CMC – Na 0,5\%} = \frac{0,5 \text{ gram}}{100} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 0,5 \text{ gram}$$

CMC-Na 0,5 gram dimasukkan ke dalam mortir yang diisi aquadest hangat 10 ml, didiamkan selama 15 menit hingga memperoleh massa yang transparan lalu digerus sampai homogen. Selanjutnya diencerkan menggunakan aquadest dan dimasukkan ke dalam labu ukur hingga volume mencapai 100 ml (Soriton, 2014).

d. Pembuatan Pakan Diet Tinggi Lemak

Pembuatan pakan ditunjukkan untuk menginduksi kenaikan kadar lipid pada tikus putih jantan yang diberikan pakan diet lemak tinggi. Pakan yang diberikan terdiri lemak sapi : minyak jelantah : kuning telur puyuh dengan perbandingan 10% : 20% : 20%. Ketiga bahan dicampur dalam 150 ml untuk diberikan pada tikus (Siska, 2018).

Perhitungan

$$\text{Volume pemberian} = 5 \text{ ml}/200 \text{ gram tikus}$$

$$\begin{aligned} \text{Perbandingan pakan} &= \text{lemak sapi} : \text{minyak jelantah} : \\ &\quad \text{kuning telur puyuh} \\ &= 10\% : 20\% : 20\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Pemberian lemak sapi} &= \frac{10\%}{100\%} \times 5 \text{ ml} \\ &= 0,5 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Pemberian minyak jelantah} &= \frac{20\%}{100\%} \times 5 \text{ gram} \\ &= 1 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\text{Pemberian kuning telur puyuh} = \frac{20\%}{100\%} \times 5 \text{ gram}$$

$$= 1 \text{ gram}$$

$$\begin{aligned} \text{Pemberian aquadest} &= \frac{50\%}{100\%} \times 5 \text{ gram} \\ &= 2,5 \text{ gram} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan stok 150 ml :

$$\begin{aligned} \text{pemberian lemak sapi} &= \frac{10\%}{100\%} \times 150 \text{ gram} \\ &= 15 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Pemberian minyak jelantah} &= \frac{20\%}{100\%} \times 150 \text{ gram} \\ &= 30 \text{ gram} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Pemberian kuning telur puyuh} &= \frac{20\%}{100\%} \times 150 \text{ gram} \\ &= 30 \text{ gram} \end{aligned}$$

Maka 15 ml lemak sapi ditambah 30 ml minyak jelantah ditambah 30 ml kuning telur puyuh diaduk hingga homogen lalu ditambah dengan air sampai volume 150 ml. Kemudian campuran pakan yang sudah dibuat diinduksikan ke tikus putih jantan secara per oral sebanyak 5 ml dalam satu kali sehari.

8. Pengambilan Darah

Tikus dipuasakan 12 jam sebelum dilakukan pengambilan darah (Tubagus, 2015). Pengambilan darah dilakukan sebanyak 2 kali, yaitu sebelum perlakuan dan setelah perlakuan. Pengambilan darah dilakukan dengan cara tikus dikondisikan senyaman mungkin, kemudian pipa kapiler digoreskan pada *retro-orbital pleksus* (mata). Pipa kapiler diputar sampai

melukai pleksus, lalu darah ditampung pada tube EDTA untuk tujuan pengambilan plasma darah . Darah yang diambil dari setiap mata tikus berkisar antara 1-2ml.

9. Pengukuran Kadar

Pengukuran kadar kolesterol total darah tikus dilakukan dengan metode enzimatis. Menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm.

a. Perhitungan HDL

Pengukuran kadar HDL dilakukan dengan metode presipitasi langsung yaitu mengendapkan kilomikron, VLDL, dan LDL menggunakan asam fosfotungstik dan magnesium klorida. Pengukuran kadar Hdl berfungsi untuk mengetahui kadar lemak dengan densitas tinggi yang ada di dalam darah. Cara untuk mengetahui kadarnya yaitu dengan mengambil darah tikus di daerah mata, diambil sebanyak 200 μ L dan ditambahkan 500 μ L reagen kit HDL. Setelah itu disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm menggunakan reagen kit HDL. Setelah didapatkan supernatan lalu ditambahkan dengan reagen kit kolesterol dan dibaca di spektrofotometer. Jumlah akuabides, sampel, standar, dan reagen kit kolesterol total yang dibutuhkan dalam penetapan kadar HDL, untuk dimasukkan ke dalam kuvet sesuai dengan Tabel 3.3 (Devi, *et al.*, 2014).

Tabel 3.1 Pengukuran HDL

Bahan	Kuvet		
	Blanko (μL)	Standar (μL)	Sampel (μL)
Akuabides	100	-	-
Supernatan Sampel plasma	-	-	100
Supernatan standar HDL	-	100	-
Larutan reagen kit kolesterol total	1000	1000	1000

Kuvet yang telah ditambahkan sesuai tabel, dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20-25⁰C. Serapan sampel (*A sampel*), standar (*A standar*) diukur terhadap blanko pada panjang gelombang 500 nm.

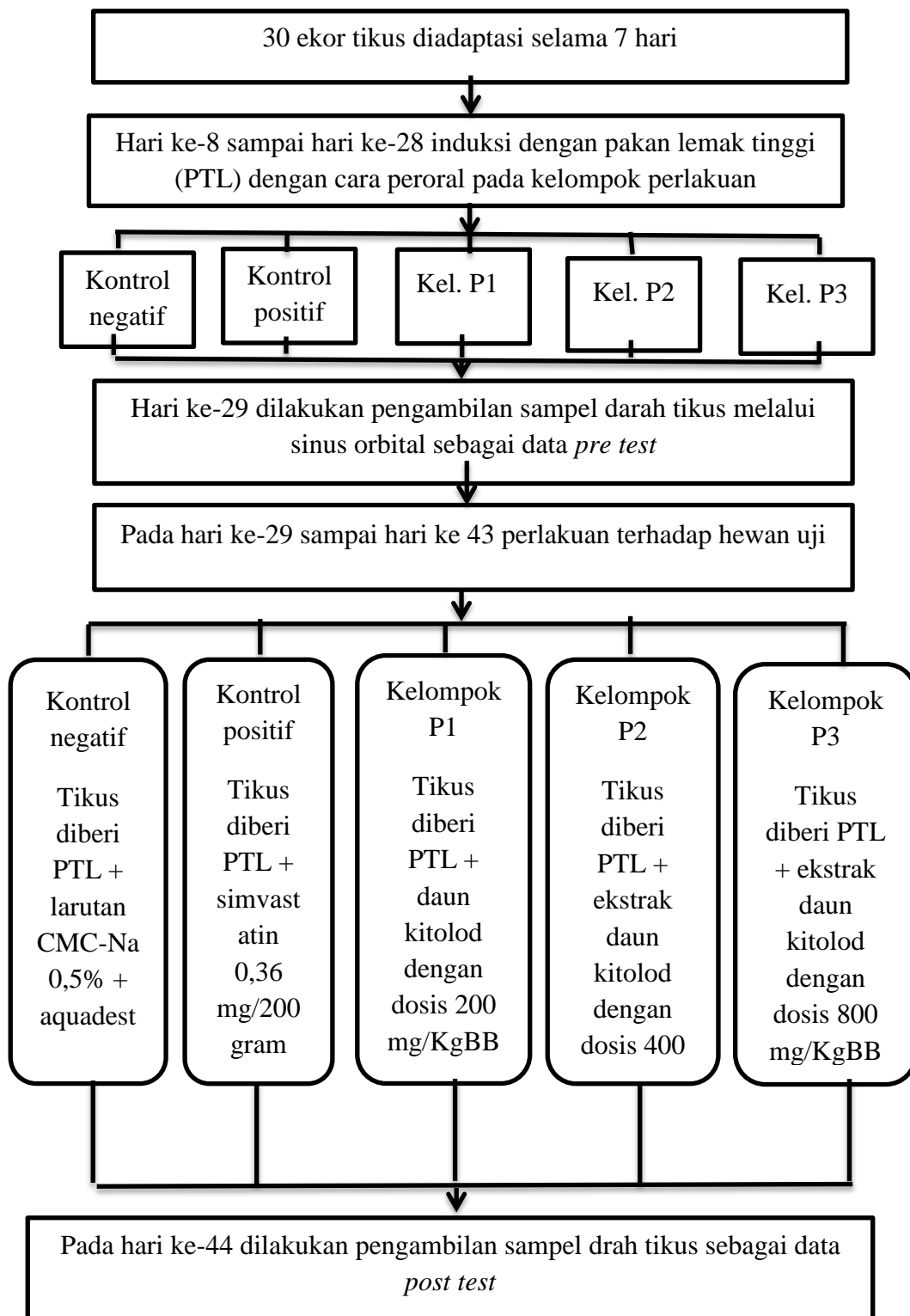
Penentuan kadar HDL dihitung dengan rumus :

$$\text{HDL (mg/dl)} = \frac{A \text{ sampel}}{A \text{ standar}} \times C \text{ standar}$$

b. Perhitungan LDL

Penentuan kadar LDL menggunakan rumus Friedewald (Fischbach, 1999) :

$$\text{LDL} = \text{kolesterol total} - \frac{\text{triglisrida}}{5} - \text{kolesterol HDL}$$



Gambar 3.3 Skema uji kadar HDL dan LDL

G. Pengolahan Data

Pengolahan data pada penelitian ini akan dilakukan dengan tahap – tahap berikut ini :

1. Penyuntingan (*editing*)

Penyuntingan teks yaitu memperbaiki sebuah tulisan yang sudah disiapkan dengan memperhatikan penyajian isi, sistematika, dan bahasa. Hasil yang didapatkan dari kegiatan menyunting adalah mendapatkan suatu tulisan yang baik, baik dari cara penulisannya, maupun secara konteks kalimatnya, sehingga menjadi sebuah tulisan yang menarik, dan berkualitas.

2. *Tabulating*

Tabulating adalah proses penyusunan dan analisis data dalam bentuk tabel dengan cara memasukkan data ke dalam bentuk table sehingga akan mudah melakukan analisis.

3. Pemasukan Data (*Entry*)

Entry data yaitu suatu langkah untuk memasukkan data – data hasil penelitian ke dalam program aplikasi statistik SPSS untuk pengujian statistik.

4. *Cleansing*

Cleansing merupakan bagian pengecekan kembali data yang sudah dimasukkan untuk menghindari kesalahan pengetikan.

H. Analisis Data

Data kadar HDL dan LDL diperoleh dari selisih data *pre and post test* terhadap penurunan kadar HDL dan LDL. Analisis ini menggunakan SPSS for windows 2.6 dengan uji statistik one way ANOVA, untuk mengetahui normalitas dan distribusi yang diuji sebelum dan sesudah diberi perlakuan dengan taraf kepercayaan 95%. Untuk uji distribusi digunakan uji *saphirowilk* karena jumlah sampel <50 . Dari hasil penelitian kostribusi normal ($p>0,05$), yang kemudian data diuji homogenitasnya menggunakan *levene's test* dan hasil uji menunjukkan data terdistribusi homogen ($p>0,05$). Data yang terdistribusi normal dan homogen selanjutnya dianalisis lagi untuk analisis *post test* menggunakan analisis LSD, untuk mengetahui perbedaan signifikan antar kelompok (Devy, 2014). Jika tidak homogen maka dilakukan uji lanjutan dengan *uji post hoc*.