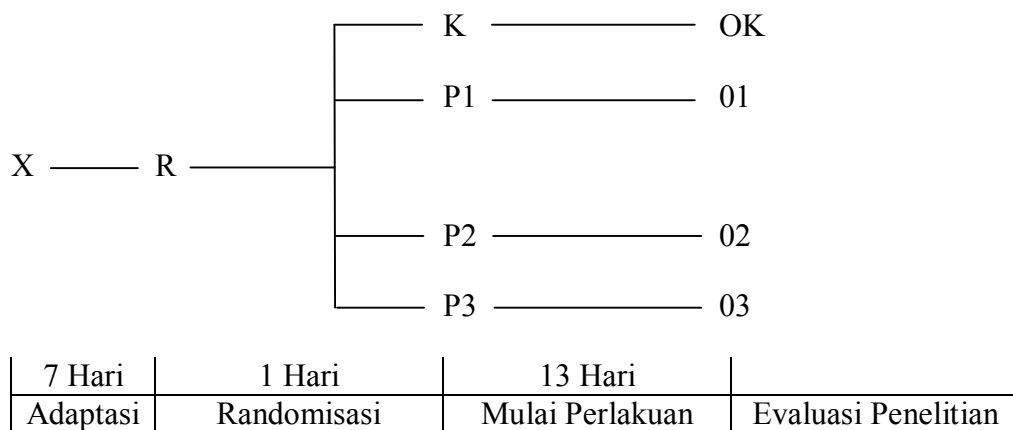


BAB IV

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *The Post Test-Only Control Group* yang menggunakan hewan coba mencit Balb/C sebagai objek penelitian.^{13,27} Perlakuan adalah pemberian ekstrak *Merremia mammosa* dengan keluaran adalah perubahan respon proliferasi limfosit dan produksi ROI makrofag.



Gambar 4.1. Bagan Rancangan Eksperimen

Keterangan :

- X → R : Masa adaptasi 1 minggu
- R : Randomisasi
- K : Kontrol, sebagai pembanding mencit hanya diberi Aquadest per oral selama 13 hari dan infeksi dengan *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.
- P1 : Mencit diberi ekstrak *Merremia mammosa* dosis 0,32 mg per oral setiap hari selama 13 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.
- P2 : Mencit diberi ekstrak *Merremia mammosa* dosis 1,6 mg per oral setiap hari selama 13 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.
- P3 : Mencit diberi ekstrak *Merremia mammosa* dosis 8 mg per oral setiap hari selama 13 hari dan diinfeksi *Salmonella typhimurium* intra peritoneal pada hari ke-6.
- OK : Pengamatan pada mencit kelompok kontrol
- O1 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P1.
- O2 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P2.
- O3 : Pengamatan pada kelompok mencit dengan perlakuan P3

B. RUANG LINGKUP PENELITIAN

Ruang lingkup disiplin ilmu penelitian ini meliputi bidang ilmu Imunopatobiologi, Imunologi, dan Farmakologi.

C. POPULASI DAN SAMPEL

1. Populasi

Populasi penelitian meliputi mencit strain Balb/C yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Populasi adalah mencit jantan Balb/C berusia 8-10 minggu, berat 20-30 gram. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa strain ini sensitif terhadap infeksi *Salmonella typhimurium* dan beberapa jam setelah infeksi akan menimbulkan respon imunitas melawan bakteri tersebut. Sedangkan penentuan jenis kelamin mencit pada penelitian ini perlu dilakukan karena hormon estrogen, progesteron pada mencit betina dapat mempengaruhi respon imunitas. Pada mencit yang berumur tujuh minggu telah terjadi stadium ovulasi yang waktunya berbeda antara mencit satu dan lainnya, sehingga rasio kadar estrogen dan progesteron pada tiap mencit berbeda-beda. Oleh karena itu pada penelitian ini dipilih mencit jantan.³

Kuman *Salmonella typhimurium* yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain *Salmonella virulen* (*phage type* 510) dengan dosis LD⁵⁰ 10⁶ CFU. Sehingga 10⁵ CFU organisme *Salmonella typhimurium* hidup dapat menginduksi respon imunitas seluler, dipilih karena patogen ini merupakan organisme ideal dan banyak dijadikan model untuk mempelajari respon imun nonspesifik maupun spesifik terhadap infeksi bakteri intraseluler.¹⁷

2. Sampel

Sampel penelitian diperoleh dari populasi dengan cara pengambilan sampel secara *simple random sampling* kriteria inklusi dan eksklusi untuk menghindari bias dalam perlakuan diambil sebagai berikut:^{27,28}

Kriteria Inklusi :

1. Faktor keturunan mencit , diambil dari populasi mencit yang diambil dari populasi mencit yang secara genetik adalah homogen yaitu strain Balb/c
2. Jenis kelamin jantan
3. Umur 8–10 minggu
4. Berat badan sebelum perlakuan 20–30 gram
5. Tidak ada kelainan anatomis
6. Sehat dan aktif selama masa adaptasi
7. Penempatan kandang, ditempatkan pada tempat yang sama, (di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Undip)

Kriteria Eksklusi :

- a. Mencit sakit selama masa adaptasi 7 hari (gerakan tidak aktif)
- b. Mencit mati selama perlakuan berlangsung (*drop out*) .

Besar sampel minimal menggunakan rumus besar sampel eksperimental dari Federer dengan rumus sebagai berikut $(t-1)(r-1) \geq 15$ dimana t = jumlah perlakuan dan r = Jumlah ulangan atau sampel perkelompok.¹³ Dalam penelitian ini jumlah perlakuan adalah 4, sehingga jumlah sampel perkelompok perlakuan harus lebih dari 5. Pada penelitian ini menggunakan

6 ekor mencit perkelompok, sehingga jumlah yang dibutuhkan untuk penelitian eksperimental laboratorium sebanyak 24 ekor mencit.

D. VARIABEL PENELITIAN

1. Variabel Bebas (*Independent Variabel*)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak *Merremia mammosa*.

2. Variabel Terikat (*dependent variabel*)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah respon proliferasi limfosit dan produksi ROI makrofag.

E. DEFINISI OPERASIONAL

1. Pemberian ekstrak *Merremia mammosa* dengan dosis bertingkat (0,32 mg/hari, 1,6 mg/hari, 8 mg/hari). Dosis yang digunakan berdasarkan dosis yang telah dikonversi dari kisaran dosis ekstrak *Merremia mammosa* untuk mencit. Dengan skala variabel rasio
2. Respon proliferasi limfosit yaitu respon proliferasi limfosit di limpa mencit, yang diukur dari tiga parameter yaitu berat limpa, jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas.
 - a. Berat limpa yaitu berat limpa mencit yang ditimbang dengan timbangan elektronik dengan satuan mg. Dengan skala variabel rasio
 - b. Jumlah limfosit yaitu jumlah limfosit dihitung dengan *Neubouer Improve* dengan satuan sel. Dengan skala variabel rasio

- c. Jumlah relatif limfoblas yaitu jumlah limfoblas yang ditemukan setiap 200 sel dilihat dengan mikroskop cahaya dengan satuan sel. Dengan skala variabel rasio
3. Produksi ROI makrofag teraktivasi yaitu produksi ROI makrofag teraktivasi dengan adanya anion superoksida/ O_2^- , dilihat dengan mikroskop cahaya dan ditentukan persentase dan derajatnya/50 sel makrofag kemudian dibuat indeks rata-ratanya. Dengan skala variabel rasio

F. BAHAN DAN REAGEN PENELITIAN

1. *Merremia mammosa* yang diperoleh dari Gedong Songo Ungaran Semarang. *Merremia mammosa* yang digunakan adalah 6 bulan sampai dengan 1 tahun
2. *Salmonella typhimurium* virulen (10^5 CFU phage type 510) dalam media HIB, diperoleh dari Unit Mikrobiologi Laboratorium Kesehatan Telogosari Semarang.
3. *Peritoneal exudate cells* (PEC) dari mencit strain Balb/C, organ limpa dari mencit Balb/C, larutan *roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-640, *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA), *nitro blue tetrazolium* (NBT) dilarutkan dengan aquadest 1 mg/ml, *phosphate Buffered Saline* (PBS), *fetal Bovine Serum* (FBS), larutan Giemsa 20 %, alkohol 70 %, *neutral Red Solution* 2%, *glutamine*, metanol absolut, larutan NaCl fisiologis steril, aquades Steril, NH_4Cl 0.85%, media *Salmonella-Shigella* (SS), pakan Standar, *canada balsam*.

G. ALAT PENELITIAN

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *sputit disposable* 1 ml dan 10 ml steril dengan jarum ukuran 18 atau 25 G, tabung sentrifusi 15 ml dan 50 ml steril, pipet ukur 25 ml dan 50 ml, gunting, pinset dan klem, pipet Pasteur steril, tabung reaksi biasa, *hemocytometer*, *laminar air flow*, inkubator CO₂ 5%, mikroskop cahaya, kamera digital, *aluminium foil*, *vortex Genie 2*, gelas ukur, *coverslip* bulat, *refrigerated centrifuge*, pipet *ependorf*, *microplate* 24 *well*, timbangan elektrik, sonde lambung, *colony counter*, cawan petri, kandang hewan coba.

H. PROSEDUR PEMBUATAN EKSTRAK

1. Determinasi *Merremia mammosa*

Determinasi dilakukan terlebih dahulu untuk memperoleh kepastian bahwa tanaman yang digunakan berasal dari tanaman yang dimaksud, sehingga kemungkinan timbulnya kesalahan dalam pengumpulan bahan penelitian dapat dihindari. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang.

2. Pengeringan dan Penyiapan Sampel

Merremia mammosa diambil lalu dikupas kulitnya kemudian dicuci bersih dengan air mengalir. *Merremia mammosa* yang benar-benar telah bersih dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan dan dijemur di bawah matahari secara tidak langsung atau dengan ditutup menggunakan kain hitam hingga kering. Simplisia yang telah kering ini dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak.

Ekstrak bahan aktif dari *Merremia mammosa* diperoleh dengan cara ekstraksi secara meserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia yang telah diayak dalam etanol selama tiga hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya, cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan dan penggantian cairan penyari setiap hari. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan filtratnya dipekatkan. Filtrat etanol tadi diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga didapatkan *crude* senyawa umbi bidara upas.

3. Prosedur Penghitungan Dosis

Dosis *Merremia mammosa* yang akan diberikan pada *Salmonella typhimurium* sebagai imunomodulator didasarkan pada dosis penggunaannya sebagai antibakteri di masyarakat. *Merremia mammosa* di masyarakat yang digunakan untuk mengobati antibakteri pada demam tifoid adalah 10 – 100 gram dalam bentuk serbuk. Dosis yang digunakan adalah 100 gram kemudian dihitung dan dikonversikan dengan mencit sehingga diperoleh hasil dibawah ini.

$$70/50 \times 0,0026 = 400 \text{ mg/mencit (dosis lazim)}$$

Dosis serbuk 400 mg ini diolah dengan proses ekstraksi maserasi sehingga diperoleh ekstrak dengan berat 1,6 mg (dosis lazim) atau dosis

2. Penelitian ini menggunakan 3 tingkatan dosis. Dosis 1 0.32 mg merupakan 1/5 dari dosis lazim, dosis 3 merupakan 5 kali besar dosis lazim. Pemilihan rentang dosis ini didasarkan pada hasil pre-penelitian. Rentang dosis 10 kali dosis lazim menyebabkan kematian pada hari pertama, sehingga diturunkan menjadi 5 kali. Rentang dosis yang terlalu rendah yaitu 3 kali dosis lazim, ditakutkan tidak memberikan efek yang signifikan terhadap perlakuan. Pertimbangan penentuan dosis ini berdasarkan pada kurva *dose relationship*.

4. Prosedur Penghitungan Jumlah Bakteri

Strain murni *Salmonella typhimurium* diletakkan di media *Salmonella-Shigella* (SS) kemudian dipindahkan ke media penyubur menggunakan selenit cair kemudian dipindahkan kembali ke media isolasi sehingga didapatkan koloni *Salmonella typhimurium* dan dilakukan uji biokimia, pembacaan tabel, tes serologi, antigen spesifik yang semuanya dilakukan untuk mengidentifikasi bahwa kuman yang dikulturkan benar *Salmonella typhimurium*. Untuk menumbuhkan bakteri digunakan HIB dan diencerkan 10^5 menggunakan NaCl fisiologis.

I. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Cebior Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro pada bulan Oktober – November 2011.

J. PROSEDUR PENGUMPULAN DATA

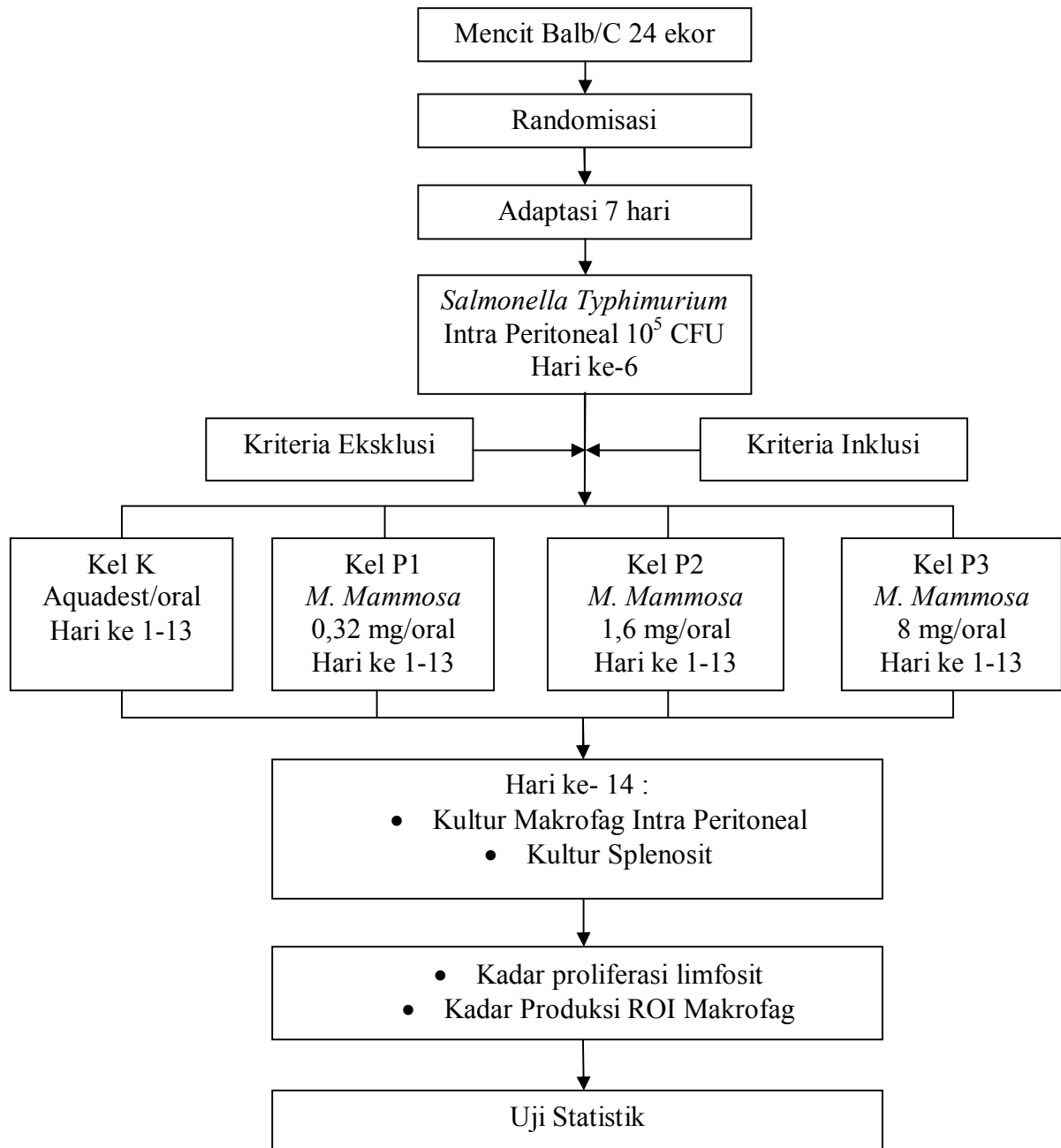
1. Dua puluh empat ekor mencit jantan strain Balb/c berumur 8-10 minggu di adaptasikan selama seminggu di laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran dengan dikandangkan secara memadai dan diberi pakan standar serta minum secara *ad libitum*.
2. Dua puluh empat ekor mencit dibagi menjadi 4 kelompok kecil dimana masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit yang ditentukan dengan cara acak sederhana lalu dikandangkan berkelompok.
3. Mencit Balb/c yang diinfeksi *Salmonella typhimurium* adalah mencit Balb/c yang diinjeksi 0,5 ml suspensi kuman *Salmonella typhimurium* virulen (*phage type* 510) yang diperoleh dari Dinas Kesehatan Unit Mikrobiologi Laboratorium Kesehatan Telogosari Semarang dengan 10^5 CFU secara intra peritoneal.
4. Setiap kelompok diberi pakan standar sama dan dilakukan penimbangan berat badan sebelum perlakuan. Hari pertama sampai hari ke enam diberi ekstrak *Merremia mammosa* dapat bereaksi untuk meningkatkan respon imunitas seluler terhadap antigen sehingga yang disebut sebagai imunomodulator, karena itu mencit hari ke enam diinfeksi *salmonella typhimurium* dan kenapa hari ke-13 dilakukan pemeriksaan karena infeksi sistemik pada mencit oleh *Salmonella typhimurium* secara intra peritoneal

setelah 3-7 hari, infeksi *Salmonella typhimurium* dalam hati dan limpa menjadi pertumbuhan yang menetap (*plateau*) dibawah pengaruh makrofag teraktivasi yang memproduksi sitokin proinflamasi.

- a. Kelompok kontrol (K) : Mencit mendapat diet standar dan aquadest/hari peroral selama 13 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *Salmonella typhimurium* intra peritoneal. Hari ke-14 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit, dan produksi ROI makrofag.
- b. Kelompok P1 : Mencit mendapat diet standar dan Ekstrak *Merremia mammosa* dengan dosis 0,32 mg/hari peroral setiap hari selama 13 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *Salmonella typhimurium* intra peritoneal. Hari ke-14 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit dan produksi ROI makrofag.

- c. Kelompok P2 : Mencit mendapat diet standar dan Ekstrak *Merremia mammosa* dengan dosis 1,6 mg/hari peroral setiap hari selama 13 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *Salmonella typhimurium* intra peritoneal. Hari ke-14 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit dan produksi ROI makrofag.
- d. Kelompok P3 : Mencit mendapat diet standar dan ekstrak *Merremia mammosa* dengan dosis 8 mg/hari peroral setiap hari selama 13 hari, pada hari ke-6 diinfeksi 10^5 CFU *Salmonella typhimurium* intra peritoneal. Hari ke-14 mencit dibunuh untuk dilakukan pemeriksaan respon proliferasi limfosit dan produksi ROI makrofag.

K. ALUR KERJA PENELITIAN



Gambar 4.2. Bagan Alur Kerja

L. PROSEDUR PEMERIKSAAN

1. Prosedur Pengambilan Sampel dari Hewan Percobaan

- a. Mencit dibunuh dengan dislokasi leher setelah dinarkose dengan *chloroform*, Mencit diletakan dalam posisi terlentang dan seluruh permukaan ventral disemprotkan alkohol 70 %.
- b. Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial abdomen. Robek kulit menggunakan 2 pinset kearah kepala dan ekor mencit, sehingga kulit terkelupas dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan alkohol 70 % untuk menyingkirkan bulu-bulu yang rontok.
- c. Medium RPMI 10 ml yang mengandung 2 % FBS diinjeksikan dalam rongga peritoneum, ditunggu 2 menit sambil dipijat perlahan-lahan.
- d. Cairan peritoneal diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan di aspirasi dengan spuit injeksi, dipilih bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifusi.
 1. Aspirat yang didapat kemudian disentrifusi pada kecepatan 1200 rpm, suhu 4° C selama 10 menit. Bila cairan terkontaminasi darah, sel dicuci dengan NH₄Cl 2 ml disentrifusi pada 1200 rpm, 4° C selama 2 menit, supernatan dibuang, Di cuci kembali dengan dengan RPMI 2 % PBS disentrifusi pada 1200 rpm, 4° C selama 10 menit, lalu supernatan dibuang. Pencucian diulang sampai 2 kali.

2. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 2 ml medium RPMI komplet (RPMI 1640 yang mengandung *L- glutamine* 1 mM), *Foetal Bovine Serum* (FBS) 10 % dan ditambah antibiotik (*Penicillin* 50 unit dan *Streptomycin* 50 g/ml).
3. Sel-sel di hitung dengan *hemocytometer* dengan cara meneteskan setetes larutan 10 L pada bilik hitung dan dihitung jumlah sel makrofagnya. Resuspensikan lagi dengan medium komplet RPMI sehingga di dapat suspensi sel dengan kepadatan 5×10^5 sel/ml.
4. Sel yang didapat merupakan PEC yang di gunakan untuk pemeriksaan produksi ROI makrofag.
- e. Limpa diambil dari rongga abdomen dibalik lambung dibawah hepar untuk pengukuran berat limpa dan penghitungan proliferasi limfosit.

2. Pemeriksaan Proliferasi Limfosit

Respon proliferasi limfosit dapat di nilai berdasarkan parameter makroskopis. Respon secara makroskopis dilihat dari penambahan berat limpa, sedangkan parameter mikroskopis jumlah limfosit di limpa dan jumlah relatif limfoblas.^{15,8}

- a. Setelah limpa di angkat dari rongga peritoneum, kemudian dibersihkan dari jaringan ikat maupun pembuluh darah yang masih melekat. Berat limpa diukur menggunakan timbangan elektrik dalam satuan milligram.
- b. Penghitungan jumlah limfosit dilakukan dengan cara limpa di letakkan diatas cawan petri yang berisi 1,5 ml RPMI kemudian

dihancurkan dan menjadi air. Kotoran pada substrat dibersihkan, selanjutnya di lakukan pencucian dengan PBS 10 ml di sentrifusi pada 1200 rpm, 4° C selama 10 menit dan supernatan dibuang lalu ditambah PBS 2 ml. Jumlah limfosit dihitung dengan bilik hitung (*Neubouer Improve*) dengan cara meneteskan cairan limpa tersebut.

- c. Penghitungan jumlah relatif limfoblas dengan cara setetes substrat limpa diambil dan dibuat preparat apusan di atas gelas sediaan, dilakukan fiksasi dengan metanol absolut dan dikeringkan, Dicat dengan pewarna Giemsa, Jumlah sel limfoblas di hitung dari 200 sel (limfoblas dan limfosit) di area homogen menggunakan mikroskop cahaya dengan objektif 400 X. Limfoblas di identifikasi sebagai sel besar dengan inti yang bernukleolus, kromatin belum padat (warna ungu muda) dan masih terlihat adanya sitoplasma. Sedangkan limfosit ukuran selnya lebih kecil dengan inti bulat berkromatin padat (warna ungu tua) tidak ada nukleolus dan hampir tidak terlihat sitoplasma.

3. Pemeriksaan Produksi ROI (O_2^-) dengan Cara Reduksi NBT

Prinsip : Makrofag di stimulasi dengan PMA sehingga mensekresi anion superoksida (O_2^-) yang akan mengoksidasi NBT menjadi presipitat formazan (tidak larut) yang tampak berwarna biru dengan pewarnaan *Neutral Red Solution*, jika di lihat dengan mikroskop cahaya. Terbentuknya presipitat yang berwarna biru tersebut dihitung persentasenya pada tiap makrofag sebanyak 50 sel kemudian ditentukan derajatnya.

Suspensi makrofag (PEC) yang telah dihitung dan dikultur pada *microplate 24 well* yang telah diberi *coverslip* bulat, setiap sumuran 200 μ L (5×10^5 sel), diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% 37°C selama 300 menit, ditambahkan medium komplet 1 ml/ sumuran, diinkubasi selama 2 jam. Sel dicuci dengan RPMI 2 kali, kemudian ditambah medium komplet 1 ml/sumuran diinkubasi 24 jam. Setelah itu ditambah 500 μ L larutan NBT yang mengandung 125 ng/ml PMA. Pada sumuran kontrol hanya diberi NBT saja, diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% 37°C selama 60 menit. Sel dicuci dengan PBS 3 kali, dikeringkan pada suhu kamar. Fiksasi dengan metanol absolut selama 2-3 menit, setelah kering diwarnai dengan 2% *Neutral Red Sol.* Selama 15 menit, dicuci dengan aquades dan dikeringkan pada suhu kamar. *Coverslip* bulat di *mounting* pada kaca obyekt dengan *canada balsam*. Sel dengan reduksi NBT dihitung persentase terbentuknya presipitat dengan kriteria. Derajat 1 presipitat < 25 %, Derajat 2 presipitat 25 – 50 %, Derajat 3 presipitat 50 – 75 %, Derajat 4 presipitat > 75%. Masing-masing sediaan dibaca pada 50 sel makrofag kemudian dibuat rata-ratanya.

M. KODE ETIK PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan spesimen cairan peritoneal subjek penelitian. Cairan peritoneal diperoleh dari rongga peritoneal yang dilakukan oleh peneliti dan laboran CEBIOR Universitas Diponegoro yang berpengalaman. Prosedur pengambilan cairan peritoneal mengharuskan subjek

penelitian dibunuh terlebih dahulu, dilakukan dekapitasi secara dislokasi servikal.

Seluruh biaya yang berhubungan dengan penelitian akan ditanggung oleh peneliti. Protokol penelitian telah disetujui oleh pembimbing I, Pembimbing II, dan Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Pascasarjana Universitas Diponegoro.

N. ANALISIS DATA

Sebelum dilakukan uji Analisis, data yang terkumpul lengkap terlebih dahulu dilakukan *Editing, Coding, Recoding, Entry, dan Cleaning*. Setelah itu dilakukan analisis statistik deskriptif dan uji statistik. Dalam analisis deskriptif dalam bentuk rerata, dan *standart deviation* (SD) dari variabel tergantung proliferasi limfosit, produksi ROI makrofag. Hasilnya disajikan dalam bentuk tabel silang. Dibuat grafik *box plot* menurut kelompok perlakuan. Untuk menilai normalitas dari variabel tergantung dilakukan uji dengan *Shapiro wilks*.

Kemampuan proliferasi limfosit yang meliputi berat limpa, jumlah limfosit dan jumlah relatif limfoblas berdistribusi data normal sehingga dalam analisis digunakan uji hipotesis menggunakan *One Way Anova* dilanjutkan dengan uji *Bonferroni*. Untuk hasil pemeriksaan produksi ROI yang berdistribusi data tidak normal dilakukan analisis non parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan uji *Mann Whitney U*. Analisis statistik dibantu dengan program SPSS 15.0 *for windows*. Nilai signifikan dalam penelitian ini apabila variabel yang dianalisis memiliki $p < 0,05$.