

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi dalam penelitian ini adalah bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. yang diperoleh dari daerah Boyolali, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. yaitu bunga segar yang sudah mekar sempurna diperoleh dari daerah Boyolali, Jawa Tengah.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama adalah variabel yang membuat identifikasi dari semua variabel yang akan diteliti secara langsung. Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dari ekstrak etanol 70% bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dari ekstrak etanol 70% bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama dapat diklasifikasikan kedalam beberapa macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dari ekstrak etanol 70% bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dalam berbagai seri konsentrasi.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang dipengaruhi oleh proses ekstraksi dan fraksinasi bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. yang dilihat dari daya hambat dan daya bunuhnya

variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kemurnian suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, kondisi laboratorium yang digunakan

(meliputi inkas, alat dan bahan harus steril, media yang digunakan, tempat tumbuh tanaman, waktu panen, metode ekstraksi, proses fraksinasi).

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, sampel yang digunakan adalah bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. diperoleh dari Surakarta, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. adalah bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. yang segar dicuci untuk menghilangkan kotoran kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C, setelah kering digiling kemudian diayak dengan pengayak no. 40 untuk menghasilkan serbuk simplisia.

Ketiga, ekstrak etanol 70% adalah hasil dari proses maserasi serbuk simplisia dengan pelarut etanol 70%.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah hasil fraksinasi ekstrak etanol 70% dengan pelarut *n*-heksana, kemudian hasil fraksinasi dipekatkan dengan rotary evaporator.

Kelima, fraksi etil asetat adalah hasil fraksinasi ekstrak etanol 70% dengan pelarut etil asetat, kemudian hasil fraksinasi dipekatkan dengan rotary evaporator.

Keenam, fraksi air adalah hasil fraksinasi ekstrak etanol 70% dengan pelarut air, kemudian hasil fraksinasi dipekatkan dengan rotary evaporator.

Ketujuh, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 adalah bakteri Gram-negatif yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta

Kedelapan, uji aktivitas adalah dengan metode difusi pada ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dari ekstrak etanol 70% bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dan metode dilusi pada fraksi teraktif.

Kesembilan, metode difusi adalah pengujian aktivitas dengan mengukur luas daya hambat dengan kontrol negatif DMSO 3%; kontrol positif antibiotik siprofloksasin 5 µl, ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol 70% bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dengan konsentrasi 40%, 20%, dan 10 %.

Kesepuluh, tujuan metode dilusi adalah menentukan nilai KHM dan KBM, dengan kontrol negatif fraksi teraktif dan kontrol positif suspensi bakteri.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Bahan

**1.1. Bahan Sampel.** Bahan sampel yang digunakan adalah bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. yang diambil dari daerah Boyolali, Jawa Tengah

**1.2. Bakteri Uji.** Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

**1.3. Media.** Media yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Sulfide Indol Motilitas* (SIM), *Kigler Iron Agar* (KIA), *Lysine Indol Agar* (LIA), Citrat

**1.4. Bahan Kimia.** Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, *n*-heksana, etil asetat, aquadest, aquadest steril, DMSO 3%, HCl 2N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, larutan wager, larutan mayer, larutan dragendorf, larutan kristal violet (gram A) dan larutan lugol (gram B), alkohol (gram C), safranin (gram D), Siprofloksasin 5 µl, amil alkohol, serbuk Mg, HCl pekat, FeCl<sub>3</sub> 1%, kloroform, anhidrid asetat, amonia, butanol, asam asetat, petroleum eter, toluena, asam format, metanol, aseton, asam asetat glasial, penyemprot lieberman burchardad, lempeng silika gel GF254.

### 2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol maserasi, corong kaca, flanel, kertas saring, erlenmeyer, corong pisah, gelas ukur, *sterling bidwell*, *moisture balance*, oven, rotary evaporator, water bath, batang pengaduk, cawan penguap, alat penyerbuk, ayakan no.40, timbangan analitik, mikropipet, autoklaf, inkubator, kapas lidi steril, jarum ose, jarum n, cawan petri, lampu spiritus, rak tabung reaksi, tabung reaksi, chamber, lampu UV 254 nm dan 366 nm.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Deteminasi tanaman

Determinasi tanaman *Hibiscus rosa-sinensis* L. dilakukan untuk mengetahui apakah tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah benar *Hibiscus rosa-sinensis* L. Determinasi dilakukan di UPT Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

### 2. Penyiapan serbuk

Sampel bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. dipanen pada saat bunga sudah mekar sempurna, masih segar dan bebas dari hama, diambil dari daerah Boyolali, Jawa Tengah. Setelah dikeringkan, serbuk digiling dan diayak dengan pengayak no 40 agar menghasilkan serbuk simplisia dengan luas permukaan yang besar sehingga lebih banyak kontak antara cairan penyari dengan serbuk simplisia sehingga senyawa dapat tersari dengan maksimal.

### 3. Penyiapan ekstrak

Serbuk simplisia sebanyak 500 gram dilakukan maserasi dengan pelarut etanol 70% sebanyak 5000 ml dengan perbandingan 1:7,5 dan direndam selama 5 hari sambil sesekali dikocok agar larutan yang jenuh bisa tercampur dengan pelarut yang belum jenuh sehingga penarikan senyawa dari simplisia bisa maksimal. Setelah dilakukan penyaringan ulangi proses penyarian dengan pelarut yang sama dengan volume pelarut 2,5 bagian dan didiamkan selama 2 hari. Setelah hasil maserasi disaring dengan flanel kemudian filtrat yang diperoleh dipisahkan dengan rotary evaporator hingga didapat ekstrak kental (Depkes 1986).

### 4. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air dilakukan pada serbuk dan ekstrak bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) dilakukan dengan alat *Sterling Bidwell*. Metode ini dilakukan dengan 20 gram sampel didalam labu destilat ditambahkan 200 ml toluena jenuh air kemudian dipasangkan dalam alat *Sterling Bidwell*.

Penjenuhan toluena dilakukan dengan cara toluena ditambahkan aquadest 20 ml kemudian dipisahkan. Panaskan labu dengan api kecil selama 15 menit. Setelah toluena mendidih atur kecepatan penyulingan kurang lebih 2 tetes tiap

detik kemudian naikkan 4 tetes per detik. Pemanasan dihentikan hingga tidak ada tetesan air yang terlihat. Kemudian lihat volume air pada skala yang tertera pada alat *Sterling Bidwell* (Kemenkes RI 2013).

## **5. Penetapan Susut Pengerinan**

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan cara sebanyak 2 gram serbuk dimasukkan ke dalam alat *moisture balance* yang sudah disetting auto dengan suhu 105°C dan ditunggu hingga alat berbunyi yang menunjukkan proses telah selesai sehingga dapat diketahui persen susut pengeringan.

## **6. Penetapan Berat Jenis**

Penetapan kadar air dilakukan dengan alat piknometer. Pinkometer yang bersih dan kering dimasukkan ekstrak dengan konsentrasi tertentu hingga penuh kemudian timbang, hal sama juga dilakukan untuk air pada suhu 25° C. Berat jenis dapat diketahui dengan cara mengurangkan bobot pinkometer isi dengan kosong kemudan hasil berat ekstrak dibagi dengan hasil berat air (Depkes 1995).

Ekstrak konsentrasi 1% dibuat dengan cara melarutkan 0,5 gram ekstrak dengan etanol 70% hingga 50 ml. perhitungan berat jenis dilakukan 3 kali replikasi.

## **7. Fraksinasi**

Fraksinasi dilakukan dengan cara 20 gram ekstrak etanol 70% dari proses ekstraksi dilarutkan dengan 10 ml etanol 70% dan 65 ml air, didalam corong pisah ekstrak etanol ditambahkan 3 x 75 ml n-heksana, kemudian hasil fraksi n-heksan ditampung dan dipekatkan dengan rotary evaporator. Residu dari fraksinasi n-heksana dimasukkan dalam corong pisah kemudian ditambahkan 3 x 75 ml etil asetat, kemudian didapat hasil fraksi etil asetat dan fraksi air yang ditampung dan dipekatkan dengan rotary evaporator (Harbone 2006).

## **8. Identifikasi kandungan senyawa kimia**

**8.1 Flavonoid.** Serbuk dan ekstrak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam akuadest kemudian panaskan ± 5 menit, filtrat ditambahkan serbuk Mg, 1 ml HCl pekat dan 1 ml amil alkohol. Hasil positif terbentuknya warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Harbone 1996).

**8.2 Tanin.** Serbuk dan ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 ml aquadest, saring kemudian filtrat ditambahkan 3 tetes FeCl<sub>3</sub> 1%. Hasil positif terbentuknya warna hijau kehitaman (Robinson 1995).

**8.3 Alkaloid.** Serbuk dan ekstrak sebanyak 0,5 gram dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N selanjutnya dibagi menjadi dua tabung, tabung pertama ditambahkan Mayer dan tabung kedua ditambahkan Dragendorf. Hasil positif terbentuknya endapan putih setelah direaksikan dengan Mayer dan terbentuk endapan coklat kemerahan atau endapan jingga jika direaksikan dengan Dragendorf (Depkes 1978).

**8.4 Triterpenoid/Steroid.** Serbuk dan ekstrak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam 2 ml kloroform, kemudian ditambahkan 10 tetes anhidrid asetat dan ditambah 3 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung. Hasil positif triterpenoid terbentuknya cincin coklat dan positif steroid terbentuk warna hijau atau biru (Setyowati dkk 2014).

**8.5 Saponin.** Serbuk dan ekstrak sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam air panas kemudian dikocok kuat-kuat selama  $\pm 10$  detik. Hasil positif terbentuknya busa yang stabil setelah ditambahkan HCl 2N (Depkes 1978).

## 9. Pengujian dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi dilakukan dengan fase diam silika gel GF 254 dan menggunakan beberapa fase gerak untuk menentukan fase gerak terbaik. Sampel yang dilakukan KLT adalah ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dan pembanding.

**9.1 Flavonoid.** Identifikasi flavonoid dilakukan dengan KLT menggunakan fase gerak yaitu butanol: asam asetat-air (4:1:5), petroleum eter-etil asetat (5:1), etil asetat-*n*-heksana (9:1) dengan pereaksi sitoborat menghasilkan warna kuning kecoklatan. Baku pembanding dapat menggunakan kuersetin (Koeriwa dkk 2010; Latifah 2015; Yuda dkk 2017).

**9.2 Tanin.** Identifikasi tanin dilakukan dengan KLT menggunakan fase gerak yaitu butanol-asam asetat-air (4:1:5), toluena-etil asetat-asam format (3:0,8:0,2), etil asetat-kloroform-asam asetat 10% (15:5:2) dengan sinar UV 254 nm berwarna

hijau gelap dan pada UV 366 berwarna ungu kemerahan. Baku pembanding dapat menggunakan asam galat (Yuda dkk 2017; Hayati dkk 2010).

**9.3 Alkaloid.** Identifikasi alkaloid dilakukan dengan KLT menggunakan fase gerak yaitu toluena-etil asetat-etilendiamin (7:2:1), kloroform-metanol-air (6:3:0,65), kloroform-metanol (15:1) dengan pereaksi semprot Dragendorf menunjukkan warna coklat hingga jingga. Baku pembanding dapat menggunakan efedrin, nikotin atau atropin (Aksan dkk 2013; Marliana dkk 2005).

## 10 Sterilisasi

Sterilisasi dilakukan pada alat dan bahan yang digunakan pada pengujian. Peralatan seperti tabung reaksi, cawan petri, kapas lidi disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C 1,5 Atm selama 20 menit, bahan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C 1,5 Atm selama 15 menit dan untuk peralatan seperti jarum ose disterilisasi dengan pemijaran.

## 11 Identifikasi bakteri uji

**11.3 Identifikasi bakteri uji secara makroskopis.** Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasikan pada media selektif *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA) dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Penampakan koloni warna kehijauan (Radji 2010).

**11.4 Identifikasi bakteri uji secara mikroskopis.** Pewarnaan gram dilakukan dengan cara bakteri difiksasi/direkatkan diatas gelas preparat dan diwarnai dengan karbol Kristal violet selama 1 menit. Zat warna Gram A (Kristal ungu) tersebut kemudian dicuci dengan aquadest. Preparat diwarnai dengan Gram B (larutan lugol) dan didiamkan selama 30-45 detik kemudian dicuci dengan aquadest. Preparat diberi Gram C (alkohol 96%). Sediaan dicuci dengan air dan diwarnai dengan Gram D (safranin) selama 1-2 menit. Sediaan dicuci, dikeringkan dan diperiksa dibawah mikroskop (Radji 2010). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan bakteri Gram-negatif dengan warna sel merah berbentuk batang.

**11.5 Identifikasi bakteri uji secara biokimia.** Dilakukan uji biokimia dengan media SIM, LIA, KIA, Citrat.

11.5.1 **Sulfida Indol Motility (SIM)**. Biakan bakteri dinokulasikan dalam media SIM dengan cara ditusuk kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi dengan media SIM dapat digunakan untuk mengetahui adanya sulfida, indol dan motilitas. Pengujian Indol dilakukan dengan cara meneteskan reagen Erlich A dan B sebanyak masing-masing 5 tetes (1:1), uji positif indol ditunjukkan dengan adanya cincin merah pada permukaan media. Uji motilitas digunakan untuk mengetahui apakah bakteri memiliki flagel, hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna putih menyebar pada permukaan dan bekas tusukan. Uji sulfida ditunjukkan dengan hasil positif berwarna hitam. Hasil pada *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan negatif sulfida, positif indol dan positif motilitas.

11.5.2 **Kliger's Iron Agar (KIA)**. Biakan bakteri dinokulasikan dalam media KIA dengan cara ditusuk dan digores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi dengan media KIA dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri dapat melakukan fermentasi karbohidrat terutama dalam bentuk glukosa dan laktosa. Uji positif yang menunjukkan bahwa bakteri dapat melakukan fermentasi terhadap glukosa dan laktosa adalah berubahnya warna media menjadi berwarna kuning, yang menunjukkan adanya asam akibat fermentasi glukosa dan laktosa. Pengujian positif sulfida dengan terbentuknya warna hitam, positif gas jika media pecah atau terangkat keatas. Hasil pada *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan negatif sulfida, negatif gas dan media berwarna merah pada bagian lereng dan dasar (K/KS<sup>-</sup>).

11.5.3 **Lysin Iron Agar (LIA)**. Biakan bakteri dinokulasikan dalam media LIA dengan cara ditusuk dan digores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi dengan media LIA dapat digunakan untuk mengetahui terbentuknya sulfida dan deaminasi lisin. Uji positif jika pada lereng dan dasar media berwarna kuning. Hasil pada *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan media berwarna ungu pada lereng dan dasar, sulfida negatif (K/KS<sup>-</sup>)

11.5.4 **Citrat**. Biakan bakteri dinokulasikan dalam media Citrat dengan cara ditusuk dan digores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Identifikasi dengan media LIA dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri



menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Hasil pada *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan warnamedia citrat biru yang berarti positif (Radji 2010).

## **12 Pembuatan suspensi bakteri uji**

Cara pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara 1 ose dari stok bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dimasukkan dalam 10 ml media BHI dan disamakan dengan Mc Farland 0,5 kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Amati kekeruhannya jika suspensi bakteri terlalu keruh dibanding Mc Farland ditambahkan media BHI, jika suspensi bakteri terlalu jernih dibanding Mc Farland dilakukan penambahan suspensi murni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Lakukan hal tersebut hingga didapat suspensi bakteri yang setara dengan Mc Farland 0,5.

## **13 Pembuatan Konsentrasi**

Ekstrak dan fraksi dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi yang dibutuhkan. Pengenceran dilakukan dengan cara ekstrak dan ketiga fraksi kental ditimbang sesuai konsentrasinya kemudian ditambahkan pelarut DMSO 3% sampai batas kemudian dikocok. Konsentrasi 40% dibuat dengan cara menimbang 4 gram ekstrak kemudian larutkan dengan larutan DMSO 3% sampai 10 ml. Konsentrasi 20% dibuat dengan cara larutan konsentrasi 40% pipet 3 ml kemudian tambahkan larutan DMSO 3% hingga 6 ml. Konsentrasi 10% dibuat dengan cara larutan konsentrasi 20% pipet 2 ml kemudian tambahkan larutan DMSO 3% hingga 4 ml.

## **14 Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi**

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari bunga *Hibiscus rosa-sinensis* L. pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi. Pengujian dilakukan dengan konsentrasi masing –masing 40%, 20% dan 10% menggunakan metode cakram.

Media padat *Mueller Hinton Agar* (MHA) diinokulasikan bakteri dengan kapas lidi steril hingga rata kemudian tunggu  $\pm$  10 menit agar suspensi bakteri terdifusi kedalam media. Kertas cakram ditetesi dengan 50  $\mu$ l kemudian didiamkan 4-5 menit agar bahan uji dapat terserap maksimal dalam kertas cakram,

selanjutnya kertas cakram ditempelkan pada media MHA (*Mueller Hinton Agar*) yang sudah diinokulasikan bakteri. Siprofloksasin digunakan sebagai kontrol positif, DMSO 3% sebagai kontrol negatif.

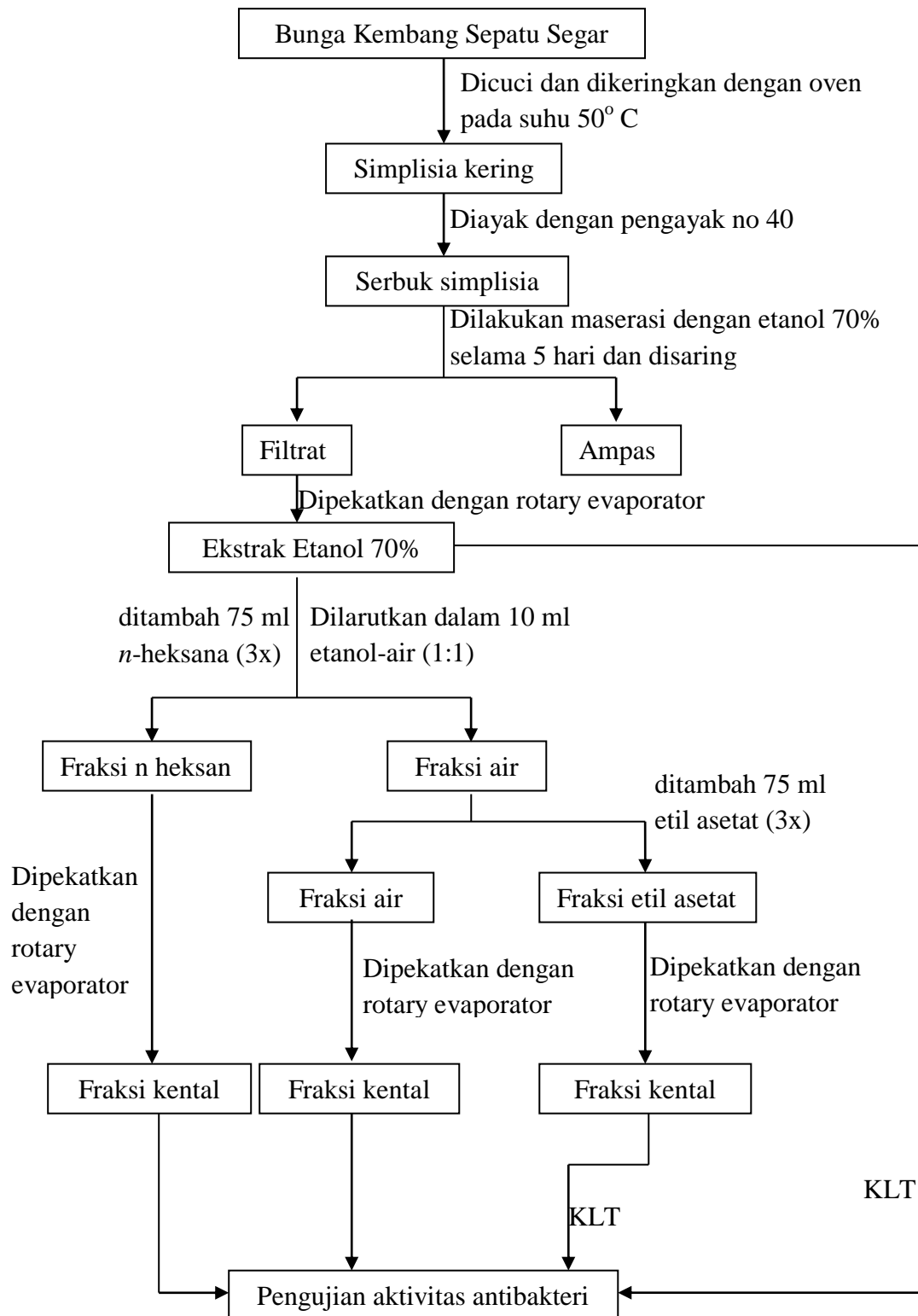
Pembuatan seri konsentrasi menggunakan pelarut DMSO 3%. Inkubasi dilakukan selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati zona hambat yang terbentuk dan dinyatakan dalam mm. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali.

### **15 Uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi**

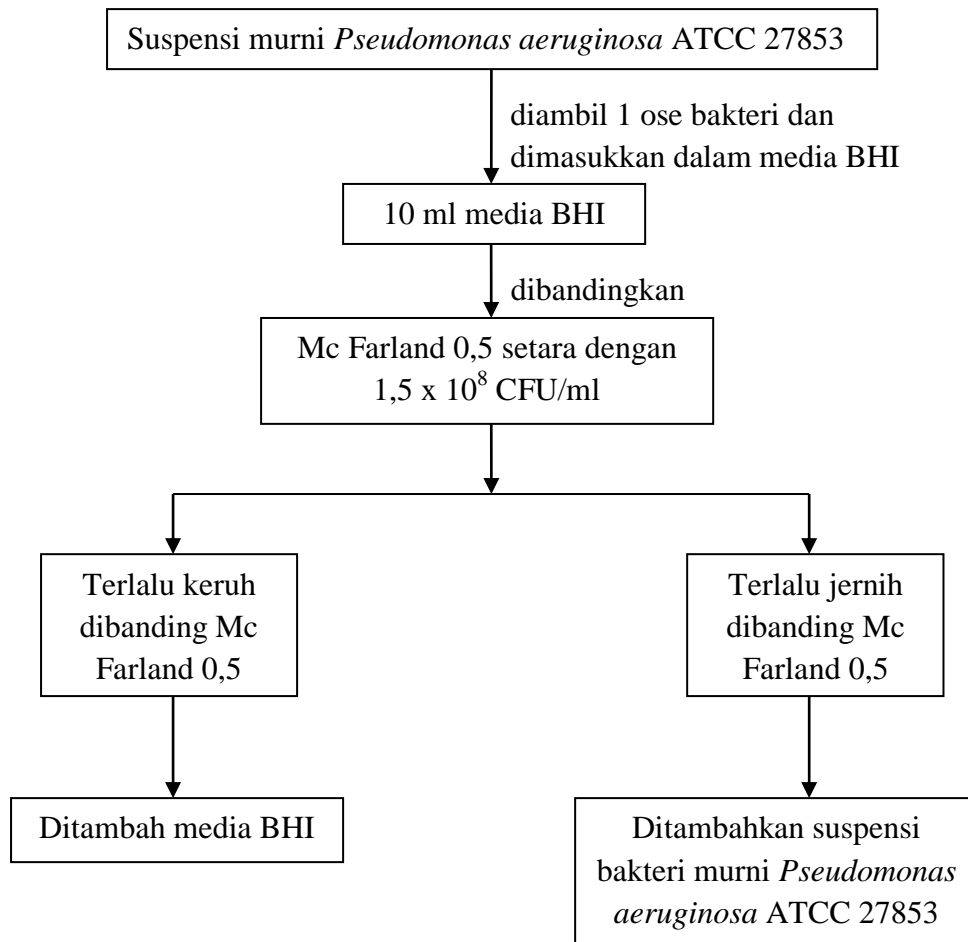
Pengujian dengan metode dilusi menggunakan 10 tabung dengan seri konsentrasi 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,3125%; 0,15625%; 0,078125%. Tabung kedua sampai tabung kesepuluh ditambahkan media BHI sebanyak 0,5 ml. Tabung pertama dan tabung kedua ditambahkan 0,5 ml fraksi teraktif, pada tabung kedua diambil 0,5 ml kemudian dimasukkan kedalam tabung ketiga, pada tabung ketiga diambil 0,5 ml kemudian dimasukkan dalam tabung keempat, pada tabung keempat diambil 0,5 ml kemudian dimasukkan dalam tabung kelima begitu seterusnya dan pada tabung ke sepuluh diambil 0,5 ml kemudian dibuang. Media diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar dan diamati kekeruhannya.

KBM ditentukan dengan cara mengulaskan suspensi media yang jernih pada media selektif (PSA) untuk melihat pertumbuhan mikroba. Media diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri. KBM adalah konsentrasi terendah pada media selektif yang tidak ada pertumbuhan mikroba uji. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali.

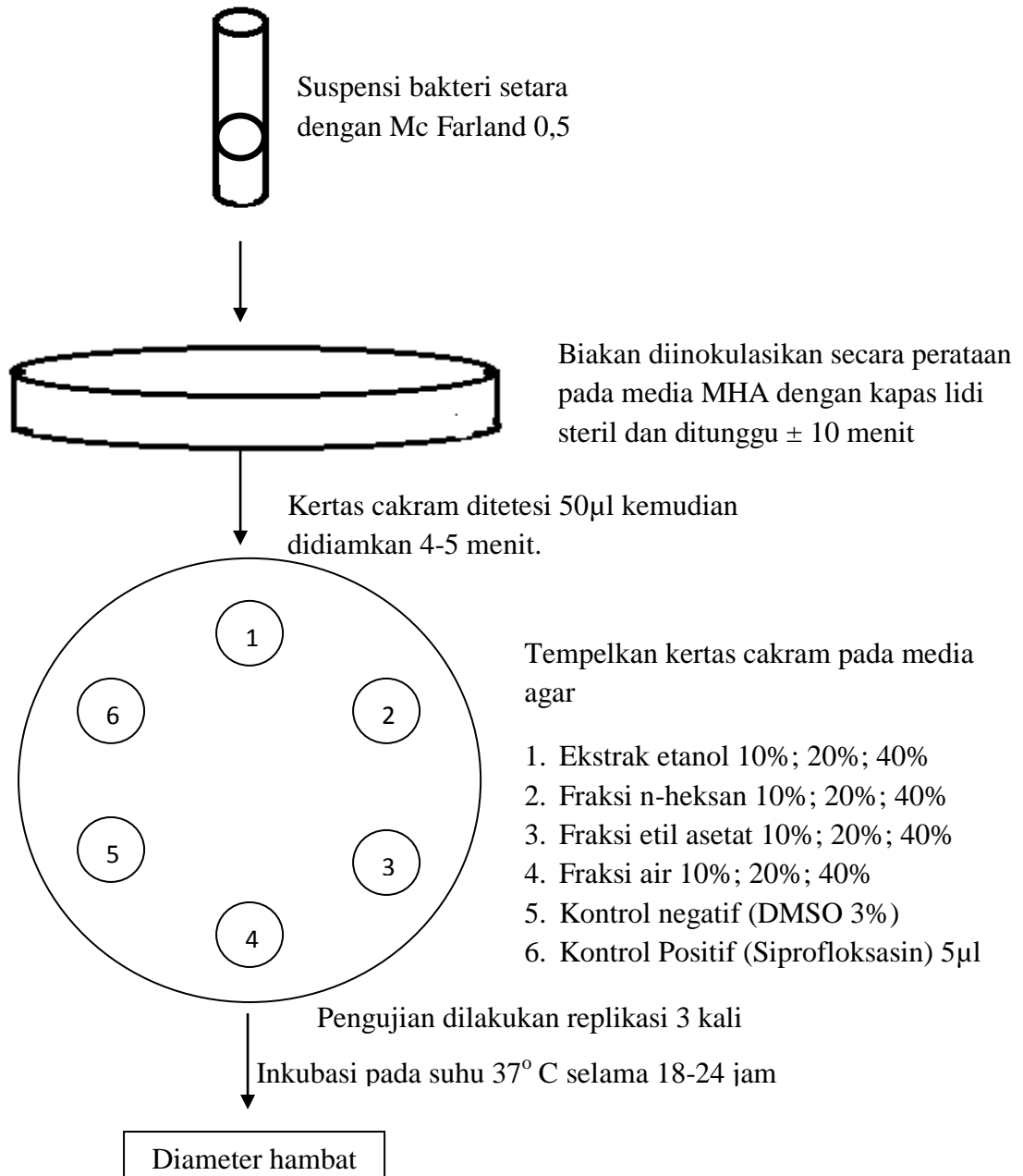
### E. Jalannya Penelitian



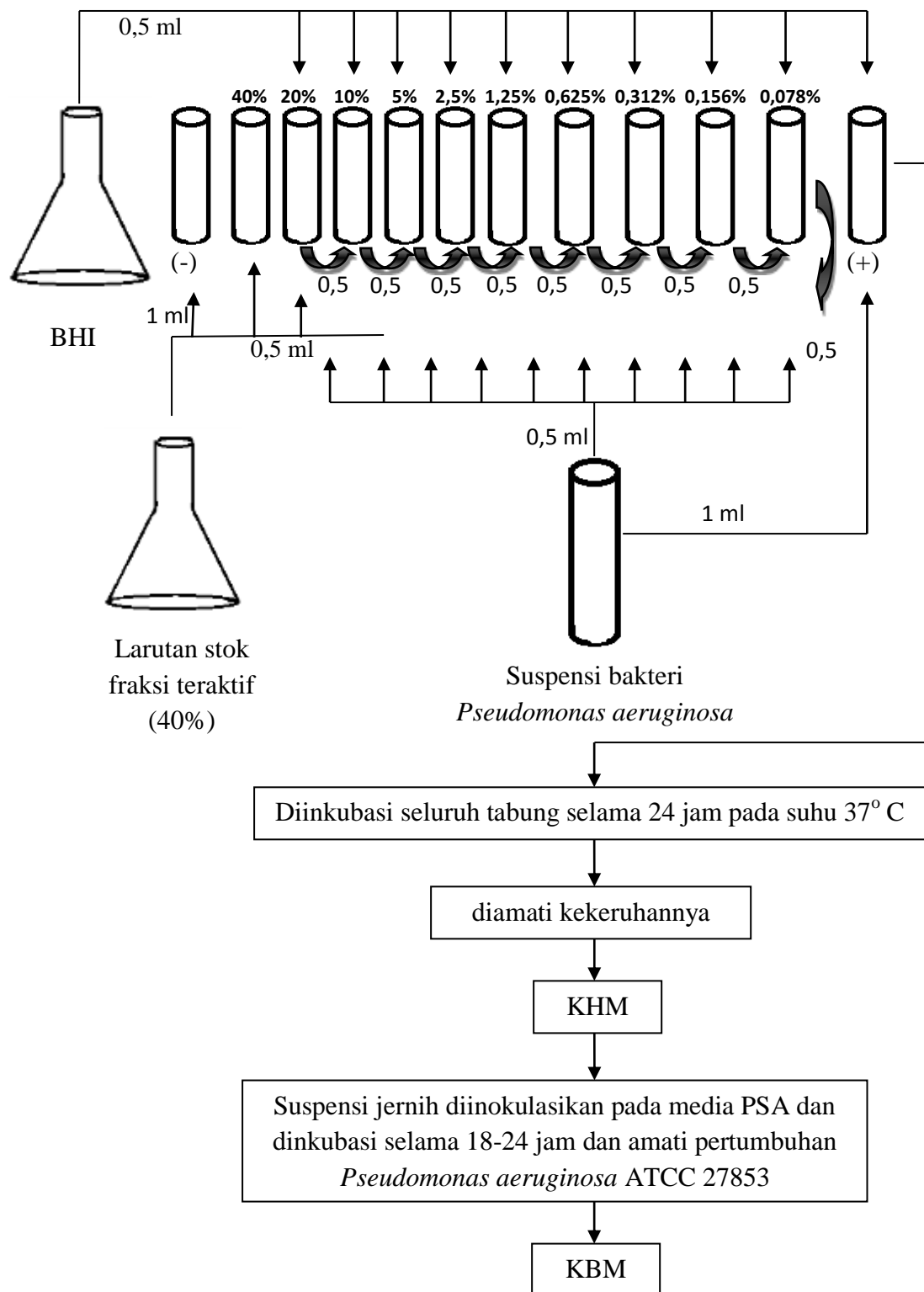
Gambar 1. Skema proses ekstraksi dan fraksinasi



Gambar 2. Skema pembuatan suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



**Gambar 3. Pengujian antibakteri secara difusi**



Gambar 4. Pengujian antibakteri secara dilusi fraksi teraktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785

## **F. Analisis Hasil**

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70%, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dianalisis dengan statistik SPSS.