

## **BAB III METODE PENELITIAN**

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

#### **1. Populasi**

Populasi yaitu seluruh objek sasaran suatu penelitian. Populasi pada penelitian ini menggunakan daun sirsak yang diperoleh dari UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur, Indonesia pada bulan Agustus 2022.

#### **2. Sampel**

Sampel yaitu bagian kecil dari populasi yang mewakili karakteristik dari populasi dalam suatu penelitian. Daun sirsak adalah sampel yang dipakai pada penelitian ini dengan kriteria bunga yang masih muda hingga tua, segar dan bersih, diambil secara acak berasal dari UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Kecamatan Pasuruan, Jawa Tengah, Indonesia pada bulan Agustus 2022.

### **B. Variabel Penelitian**

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

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirsak yang bergantung pada konsentrasi (*Annona muricata* L).

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antijamur terhadap *Candida albicans* dalam bentuk sediaan *mouthwash* ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L)

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

Variabel utama diklasifikasikan menjadi tiga variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diubah ubah untuk dapat dipelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat. Dalam penelitian ini menggunakan variabel bebas adalah sediaan *mouthwash* ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) dengan variasi konsentrasi gliserin 10%, 15% dan 20%.

Variabel terkontrol penelitian ini adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel terikat yang perlu ditetapkan kualifikasinya supaya hasil yang didapat tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti secara lebih tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L) formulasi sediaan *mouthwash*, jamur uji *Candida albicans*, kondisi laboratorium,

media yang digunakan dalam penelitian, kondisi penelitian, suhu dan metode penelitian.

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria dari penelitian. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah uji mutu fisik, stabilitas dan aktivitas antijamur dari sediaan *mouthwash* ekstrak daun sirsak yang memiliki daya hambat terhadap *Candida albicans* pada media uji.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun sirsak (*Annona muricata* L) yang diperoleh dengan cara membeli dari UPT Materia Medica Batu, Kecamatan Pasuruan, Jawa Timur, Indonesia.

Kedua, serbuk daun sirsak (*Annona muricata* L) dibuat dengan menggunakan pucuk dan daun sirsak muda yang diproses dengan tahapan pencucian, pengeringan, penggilingan serta pengayakan dengan mesh 60.

Ketiga, ekstrak daun sirsak adalah hasil dari ekstraksi yang diperoleh dari proses maserasi dengan pelarut etanol 96%.

Keempat, *Candida albicans* adalah bakteri yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta yang di uji dengan menggunakan metode difusi cakram.

Keempat, sediaan *mouthwash* ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) adalah sediaan *mouthwash* yang mengandung ekstrak daun sirsak dengan variasi konsentrasi ekstrak daun sirsak 10%, 15% dan 20% dengan kontrol negatif sediaan tanpa ekstrak daun sirsak dan positif ketokonazol.

Kelima, uji mutu fisik dan uji stabilitas serta uji aktivitas sediaan *mouthwash* ekstrak daun sirsak (*Annona Muricata* L.) terhadap bakteri *Candida albicans* adalah dengan menggunakan metode kertas cakram dan melihat diameter zona bening pertumbuhan bakteri dalam media uji.

## **C. Alat dan Bahan**

### **1. Bahan**

Daun sirsak (*Annona muricata* L) digunakan sebagai bahan sampel penelitian, dan ekstraksi dilakukan menggunakan etanol 96%.

Kloroform, asam anhidrat asetat, toluena jenuh air, LP asam klorida encer, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, metanol, bubuk magnesium, asam klorida pekat, reagen Dragendorff, reagen Mayer, besi(III) klorida 1%, amil

alkohol, n-heksana , reagen Liebermann-Burchard, asam asetat, dan butanol.

Air suling, oleum menthae, gliserin, tween 80, metil dan propil paraben, serta sorbitol merupakan komponen aktif dalam “*moutwash*”.

*C. albicans*, medium gula, medium Sabouraud Dextrose Broth (SDB), medium Potato Dextrose Agar (PDA), warna Lactophenol Cotton Blue (LCB), etanol, dan metil alkohol digunakan dalam uji antijamur.

## **2. Alat**

Penelitian ini menggunakan alat-alat antara lain adalah mortir, stamper, gelas ukur, tabung reaksi, corong, Erlenmeyer, timbangan, anak timbangan, pengaduk kaca, water bath, autoclave, oven, mikropipet, blender, jarum ose, *laminar air flow* (LAF), alat Sterling Bidwe inkubator, bejana untuk ekstraksi, viskometer Rion VT-04F, mikroskop, objek glas, pH meter, cawan petri, neraca analitik, lampu Bunsen.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Pengambilan sampel**

Daun sirsak yang diambil dari tanaman sirsak (*Annona muricata* L) yang diambil dari UPT materia Medica Batu, Kecamatan Pasuruan, Jawa Timur, Indonesia.

### **2. Determinasi tanaman**

Penelitian ini dimulai dengan menentukan kebenaran sampel tanaman daun sirsak (*Annona muricata* L) berdasarkan karakteristik mikroskopis dan makroskopis serta karakteristik morfologi tanaman yang diteliti dengan penentuan determinasi yang disertai dengan bukti laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

### **3. Pengumpulan dan Pengeringan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L)**

Tanaman sirsak (*Annona muricata* L) dibeli pada Agustus 2022 dari UPT Materia Medica Batu di Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur, Indonesia. Daun muda sampai agak tua pada urutan ketiga sampai keenam, segar, dan tidak busuk, merupakan daun yang dapat dimanfaatkan. air bilasan digunakan untuk membilas dan mencuci daun.

Setelah dicuci bersih, daun sirsak (*Annona muricata* L) dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C. Untuk mempermudah proses pembuatan serbuk, daun sirsak dikeringkan untuk meminimalkan jumlah air yang ada, Hentikan perubahan kimiawi dan enzimatis yang menurunkan kualitas, dan kendalikan penyebaran bakteri dan jamur.

#### **4. Uji organoleptis**

Pengamatan bau dan rasa pada simplisia daun sirsak (*Annona muricata* L)

#### **5. Penetapan susut pengeringan serbuk daun sirsak.**

Menggunakan alat penyeimbang kelembaban, penyusutan pengeringan bubuk sirsak dihitung. Setelah memasukkan pelat aluminium dan menekan tombol tara untuk mengatur berat pelat aluminium pada pembacaan 0,00g, alat dihidupkan. Temperatur diatur pada 105°C, serbuk ditimbang 2g, diratakan pada plat aluminium, alat ditutup, tombol start ditekan, dan pemeriksaan diakhiri dengan bunyi bip sekali. Angka yang ditampilkan pada layar harus dicatat dalam persen (%). Kelembaban minimum 10% diperlukan untuk bedak (Kementerian Kesehatan, 2013).

#### **6. Pembuatan ekstrak daun sirsak**

Serbuk daun sirsak sebanyak 1000 g, dimasukan dalam bejana maserasi selanjutnya direndam dengan etanol 96% sebanyak 10 L. Serbuk direndam pada 6 jam pertama kemudian sesekali digojok, dan diamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan penyaringan. Selanjutnya dilakukan remaserasi satu kali dengan jenis cairan penyari yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak 5 L. Maserat yang terkumpul, dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sampai didapatkan ekstrak kental. Ekstrak yang didapatkan selanjutnya ditimbang dan dihitung rendemennya (Kemenkes RI 2013).

#### **7. Penetapan kadar air ekstrak daun sirsak**

Mengetahui berapa banyak air dalam daun teh hijau adalah tujuan dari percobaan ini. Zat tersebut dipanaskan untuk menguapkan air yang ada, dan beratnya tetap konstan setelah ditimbang menggunakan teknik gravimetri. Kandungan air zat berkontribusi pada penurunan berat badan. Cawan kosong dimasak selama 30 menit pada suhu 105°C dengan teknik gravimetri, kemudian dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit sebelum ditimbang (pada berat kering, W0). Masukkan 2 gram ekstrak daun teh hijau yang sudah

diketahui beratnya ke dalam cangkir (W1) yang telah ditakar. Ekstrak daun teh hijau ditimbang, dikeringkan selama tiga jam pada suhu 105°C dalam oven, dimasukkan ke dalam desikator selama 15 sampai 30 menit, kemudian dikeringkan selama satu jam lagi sambil ditambahkan satu cangkir. Dalam cangkir, tuangkan sari daun teh hijau yang sudah dingin. Kandungan air dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Kadar Air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W<sub>1</sub> : Ekstrak daun sirsak awal (Sebelum di oven)

W<sub>2</sub> : Ekstrak daun sirsak (sesudah di oven)

## 8. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak daun sirsak

Identifikasi kandungan kimia ini dilakukan untuk dapat menetapkan kebenaran dari kandungan kimia yang terkandung dalam serbuk dan juga ekstrak daun sirsak.

**8.1 Identifikasi senyawa terpenoid.** Ambil 1 ml ekstrak daun sirsak ditambahkan dengan pereaksi *Liebermann Burchard*. Uji positif terpenoid menghasilkan warna merah atau violet (Illing *et al.*, 2017).

**8.2 Identifikasi senyawa flavonoid.** Ambil 1 ml ekstrak daun sirsak dimasukkan ke tabung reaksi, kemudian ditambahkan HCL pekat sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat. Setelah itu, ditambahkan serbuk Mg dan dikocok kuat. Ekstrak mengandung flavonoid apabila terdapat buih dan larutan akan mengalami perubahan warna dari warna awal hijau muda menjadi warna jingga (Mailuhu *et al.*, 2017).

**8.3 Identifikasi senyawa tanin.** Ambil sebanyak 0,5 gram ekstrak daun sirsak direbus dalam air sebanyak 10 ml dalam tabung reaksi dan kemudian disaring. Ditambahkan beberapa tetes FeCl<sub>3</sub> 0,1% kemudian diamati warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman (Ayoola *et al.*, 2008).

**8.4 Identifikasi senyawa alkaloid.** Ambil 1 ml ekstrak daun sirsak kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml HCL, kemudian ditambahkan 2-3 tetes pereaksi Mayer. Adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan endapan putih (Wijaya *et al.*, 2014). **8.5 Identifikasi senyawa saponin.** Ambil 1 ml ekstrak masukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan air panas, kemudian ditambahkan beberapa tetes HCL pekat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa permanen ± 15 menit (Illing *et al.*, 2017)

## 9. Formulasi dan pembuatan sediaan *mouthwash* ekstrak daun sirsak

Daun sirsak diformulasikan dalam *mouthwash* dengan menentukan konsentrasi ekstrak yang efektif menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* yaitu berdasarkan hasil uji aktivitas antijamur ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 10%. Pembuatan sediaan *mouthwash* menggunakan 3 variasi konsentrasi basis gliserin yakni 10; 15; dan 20%. Pembuatan *mouthwash* ekstrak daun sirsak dimulai dengan menimbang seluruh bahan, lalu tween 80 dilarutkan pada air menggunakan perbandingan 1:5 dan dipanaskan diatas *waterbath* temperature  $\pm 30^{\circ}\text{C}$ - $35^{\circ}\text{C}$  sampai larut. Ekstrak etanol daun sirsak dilarutkan dengan air panas sedikit demi sedikit, kemudian tambahkan larutan tween 80 aduk ad larut dan homogen (larutan I). Larutkan metil paraben, propil paraben dan sorbitol dalam gliserin dengan akuades secukupnya lalu tambahkan dengan *Oleum mentha* (larutan II). Masukkan larutan II ke dalam larutan I aduk sampai homogen. Akuades ditambahkan sampai volume 100 mL.

Rancangan formulasi dijelaskan sebagai berikut :

**Tabel 1. Komposisi bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan *mouthwash***

Nama zat	Jumlah zat alam formula (%b/v)					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Ekstrak daun sirsak	10	10	10	-	-	-
Gliserin	10	15	20	10	15	20
Sorbitol	1	1	1	1	1	1
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Tween 80	10	10	10	10	10	10
Oleum menthae	5 tetes	5 tetes	5 tetes	5 tetes	5 tetes	5 tetes
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100
	ml	ml	ml	ml	ml	ml

### Keterangan :

A : Sediaan *mouthwash* ekstrak daun sirsak + 10 % gliserin

B : Sediaan *mouthwash* ekstrak daun sirsak + 15 % gliserin

C : Sediaan *mouthwash* ekstrak daun sirsak + 20 % gliserin

D : Sediaan *mouthwash* tanpa ekstrak daun sirsak + 10 % gliserin

E : Sediaan *mouthwash* tanpa ekstrak daun sirsak + 15 % gliserin

F : Sediaan *mouthwash* tanpa ekstrak daun sirsak + 20 % gliserin

## 10. Kontrol sediaan

### 10.1 Kontrol positif.

Kontrol positif penelitian ini menggunakan ketokonazol 2%. Ketokonazol dijadikan sebagai kontrol positif karena ketokonazol merupakan salah satu pilihan obat antijamur. Mekanisme kerja ketokonazol yaitu berinteraksi dengan enzim untuk

menghambat demetilasi lanosterol menjadi ergosterol yang penting untuk membrane jamur (cushnie & lamb, 2005)

**10.2 Kontrol negatif.** Kontrol negatif penelitian ini menggunakan sediaan *mouthwash* tanpa ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L)

### **11. Pengujian mutu fisik sediaan *mouthwash***

**11.1 Uji Organoleptis.** Uji organoleptis untuk mengetahui bentuk, warna dan kejernihan *mouthwash* ekstrak daun sirsak. Dilakukan secara visual. Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali.

**11.2 Uji Homogenitas.** Uji homogenitas dilakukan di bawah cahaya yang sangat terang untuk memastikan bahwa semua zat di dalam *mouthwash* benar-benar larut sempurna dan tidak ada partikel yang mengendap di bawahnya, pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali. (Elmitra, 2017).

**11.3 Uji pH sediaan *mouthwash*.** Cek pH menggunakan pH meter. Sebelum digunakan, alat dikalibrasi menggunakan larutan buffer pH 7 dan pH 4. Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali. Saat jarum mencapai posisi yang telah ditentukan, elektroda pH meter dikeluarkan dari *moutwash* dan dipasang kembali. Nilai pH jarum dicatat dan disimpan. (Elmitra, 2017).

**11.4 Uji Viskositas sediaan *mouthwash*.** Uji viskositas sediaan *mouthwash* dimasukkan kedalam wadah sebagai tempat tester kemudian wadah alat dipasang pada portable viskotester. Viskotester diketahui dengan mengamati gerakan jarum penunjuk viskositas. Viskometer Rion VT-04F alat yang biasa digunakan untuk mengukur viskositas. Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali.

**11.5 Uji Stabilitas.** Uji stabilitas dengan metode ruang, pengujian ini dilakukan dengan mengamati larutan *mouthwash* ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L) pada suhu ruang atau kamar. Setelah dilakukan penyimpanan hari ke 1-21 pada suhu kamar 25°C dilakukan pengamatan dengan adanya perubahan organoleptis dari *mouthwash* ekstrak daun sirsak (Ekowati & Inaratul, 2016).

### **12. Identifikasi bakteri uji *Candida albicans***

**12.1 Identifikasi jamur *Candida albicans* dengan pengecatan.** Identifikasi jamur, khamir atau kapang umumnya dilakukan dengan pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue* (LCB). Identifikasi ini dilakukan menggunakan mikroskop dengan tujuan untuk mengetahui morfologi dari jamur yang telah diwarnai dengan

melihat bentuk serta warna biru yang terbentuk pada sel jamur. Pada pewarnaan LCB, fungsi *pHenol* yaitu untuk membunuh jamur. Gliserin digunakan untuk memperpanjang masa simpan preparat dan mengurangi pengendapan cat sedangkan *cotton blue* memberi warna biru pada sel jamur. Metode pewarnaan LCB menggunakan bahan-bahan *pHenol* 20 g, *lactic acid* 20 mL, gliserin 40 g, dan *cotton* 0,05 g. Langkah pewarnaan dimulai dengan membakar jarum ose, diambil pewarna LCB sebanyak dua tetes pada *object glass*. Jamur diambil lalu dicampurkan dengan LCB pada *object glass* kemudian tutup dengan *deck glass*. Preparat diamati di bawah mikroskop, hasil dinyatakan positif jika pada pemeriksaan mikroskopis ditemukan bentuk sel yang berkecambah seperti raket (*germ tube*) (Mulyati *et al.* 2002).

**12.2 Identifikasi mikroskopis *Candida albicans*.** Uji pemeriksaan jamur *Candida albicans* dilakukan dengan menempatkan satu jamur loop pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan mengevaluasi bentuk, tepi, tekstur permukaan, elevasi, dan warna selama 5x24 jam. Jika koloni berwarna krem, berlendir, dan berbau ragi, itu positif untuk *Candida albicans*.

**12.3 Identifikasi biokimia.** Glukosa cair, sukrosa cair, laktosa cair, dan media maltosa cair digunakan untuk identifikasi biokimia. Diinokulasikan pada media glukosa, maltosa, laktosa, dan sukrosa cair sebanyak 0,1 ml isolat pada media *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB). Isolat kemudian dikultur pada suhu kamar selama 7 hari dan perubahan terlihat. Asam akan dihasilkan selama reaksi fermentasi, seperti yang ditunjukkan oleh perubahan warna merah menjadi kekuningan pada indikator merah fenol. Hasil positif ditunjukkan jika media glukosa cair dalam tabung Durham memiliki gelembung. Di dalam tabung Durham, gas yang dihasilkan akan tampak seperti ruang kosong.

### **13. Peremajaan biakan jamur *Candida albicans***

Uji dilakukan secara aseptik menggunakan jarum ose dan koloni jamur hasil biakan murni dioleskan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

### **14. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans***

Tabung steril digunakan untuk memindahkan kultur subkultur *Candida albicans* ke dalam 25 ml media *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Untuk mendapatkan densitas  $1,5 \times 10^6$  unit pembentukan koloni (cfu)/ml,



encerkan dengan media *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) dan ukur kekeruhannya dengan standar 0,5 Mcfarland.

### 15. Metode uji difusi jamur *Candida albicans*

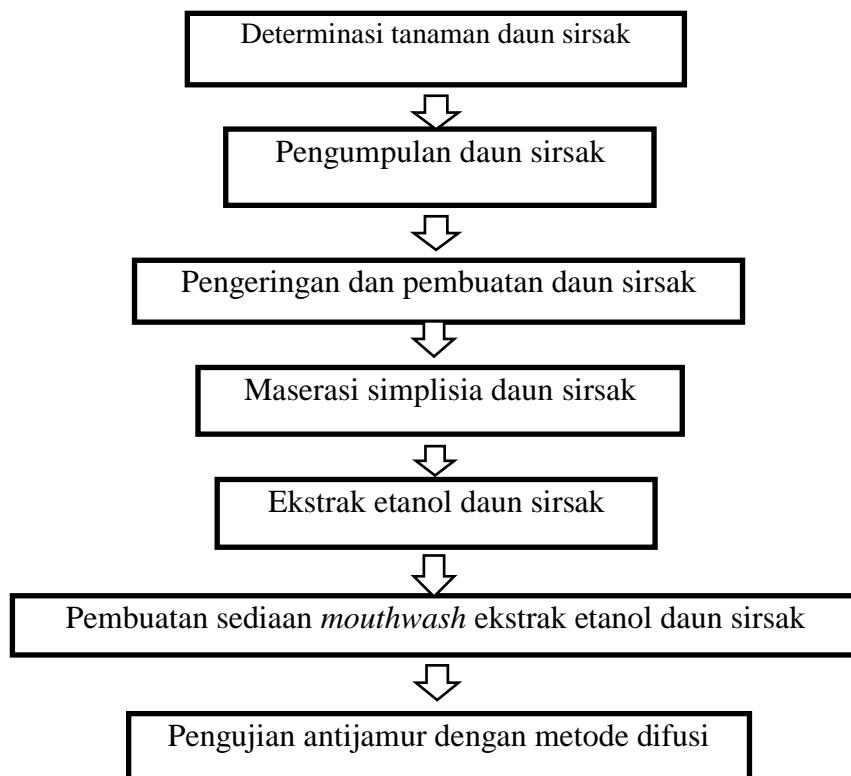
Metode pengujian yang diperlukan dalam penelitian ini adalah metode difusi dengan menggunakan cakram kertas yang digunakan untuk menguji pada biakan jamur *Candida albicans*. Metode perataan (*Spread Plate Method*) adalah metode yang digunakan dilaksanakan dengan cara mencelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri *Candida albicans* yang sudah dibuat setelah itu dilakukan inokulasi pada media agar darah. Agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media dilakukan dengan cara media didiamkan dengan waktu selama 10-31 menit menggunakan suhu kamar. 6 cakram berukuran  $\pm 8$  mm diletakkan pada media agar darah dan mikropipet sebanyak 50 $\mu$ L digunakan untuk menanamkan sediaan *mouthwash* yang mengandung berbagai variasi konsentrasi gliserin pada sediaan *mouthwash* ekstrak daun sirsak. Cakram kertas yang digunakan sebanyak 3 kali untuk konsentrasi ekstrak daun sirsak cakram kertas ditetesi menggunakan variasi konsentrasi gliserin pada tiap-tiapnya yaitu 10%, 15% dan 20% sebagai sampel uji. Cakram kertas digunakan sebanyak 2 untuk kontrol negatif adalah formula *mouthwash* tanpa ekstrak daun sirsak serta kontrol positif yang digunakan ialah ketokonazol 2% tiap-tiap pengujian dengan volume 50 $\mu$ L. Inkubasi dilakukan menggunakan suhu 37°C dengan waktu selama 24-48 jam. Kemudian setelah proses inkubasi selesai, daerah yang bening pada sekitaran cakram kertas dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter dengan menggunakan jangka sorong 4 sisi. Satuan mm digunakan dalam satuan pengukuran daerah hambat. Pengujian pada daya hambat sediaan *mouthwash* ekstrak daun sirsak terhadap bakteri *Candida albicans* dilaksanakan pengulangan sebanyak tiga kali untuk tiap-tiap konsentrasi yang diuji (Ditjen POM,1995).

Penentuan kadar respon hambatan pertumbuhan dapat dilihat pada tabel 2.

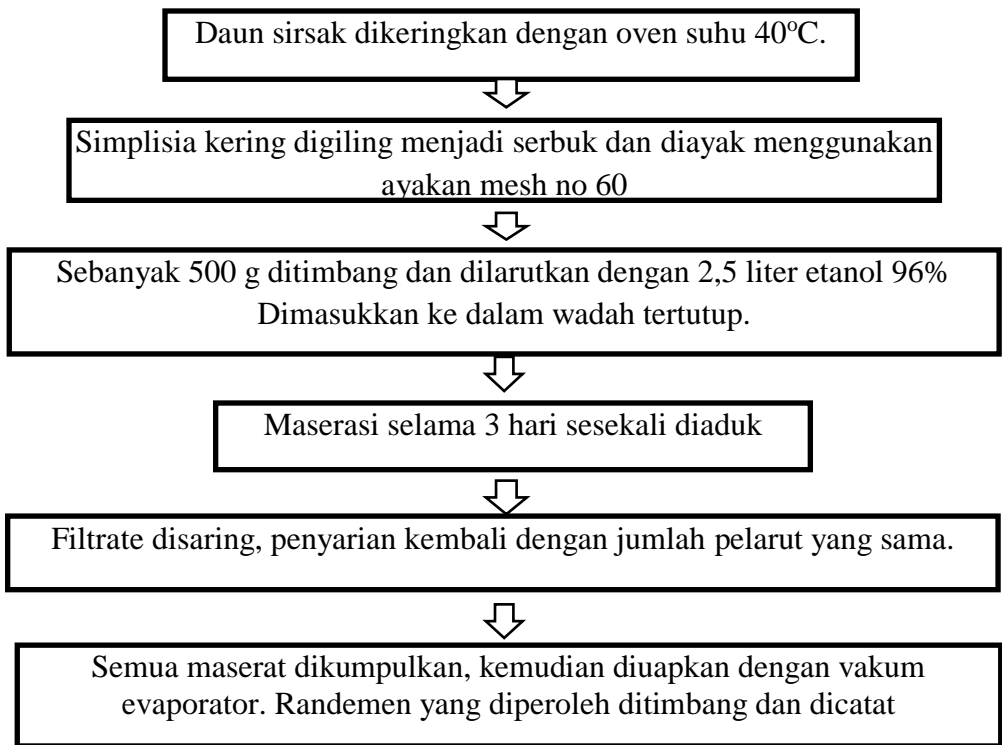
**Tabel 2. Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan jamur**

<b>Diameter zona bening</b>	<b>Respon hambatan pertumbuhan jamur</b>
>20 mm	Sangat kuat
11-20 mm	Kuat
6-10 mm	Sedang
$\leq 5$ mm	Lemah

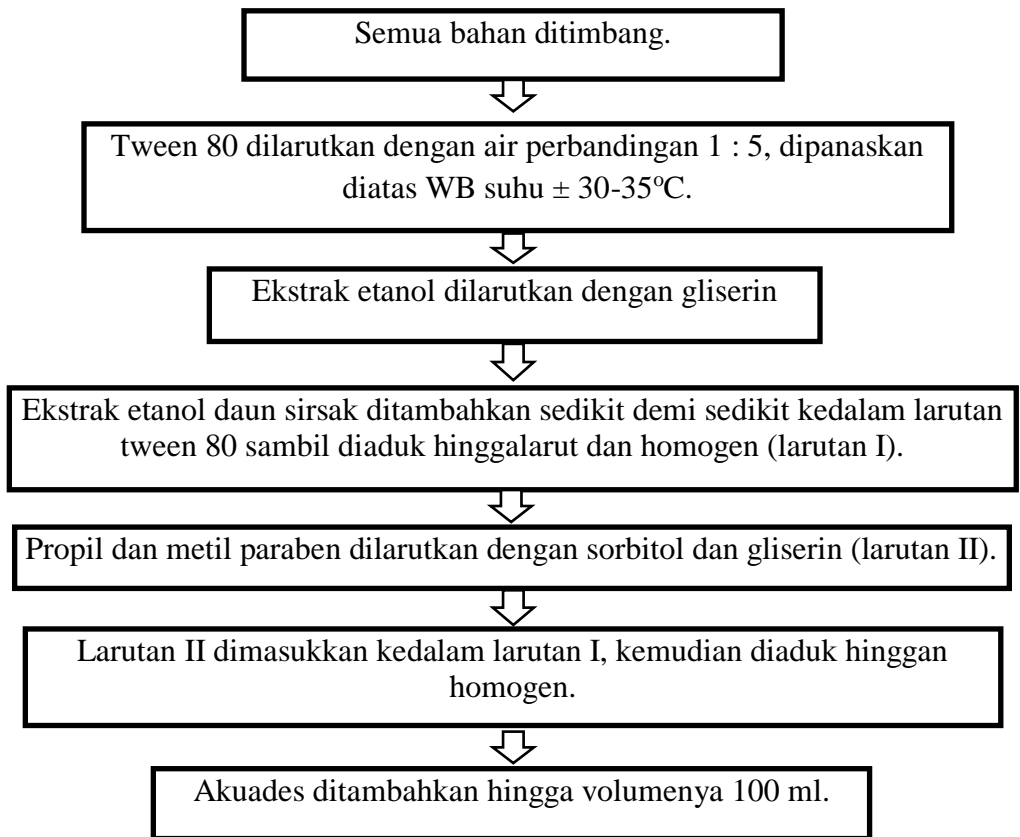
### E. Skema Jalannya penelitian



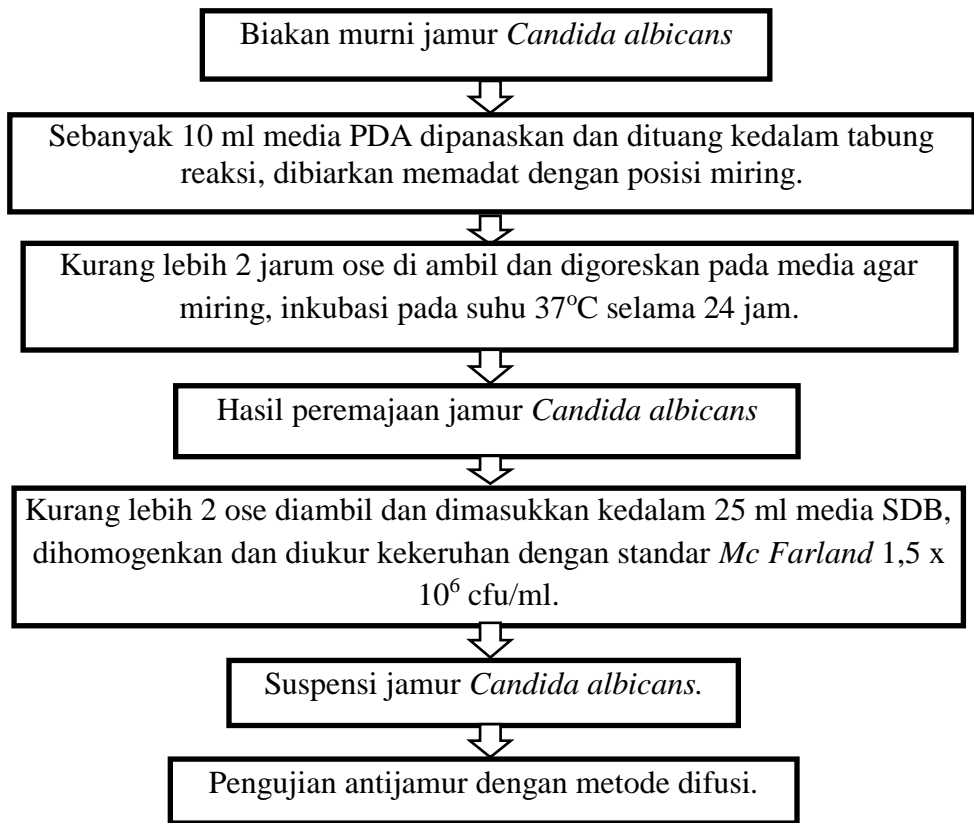
Gambar 2. Alur penelitian



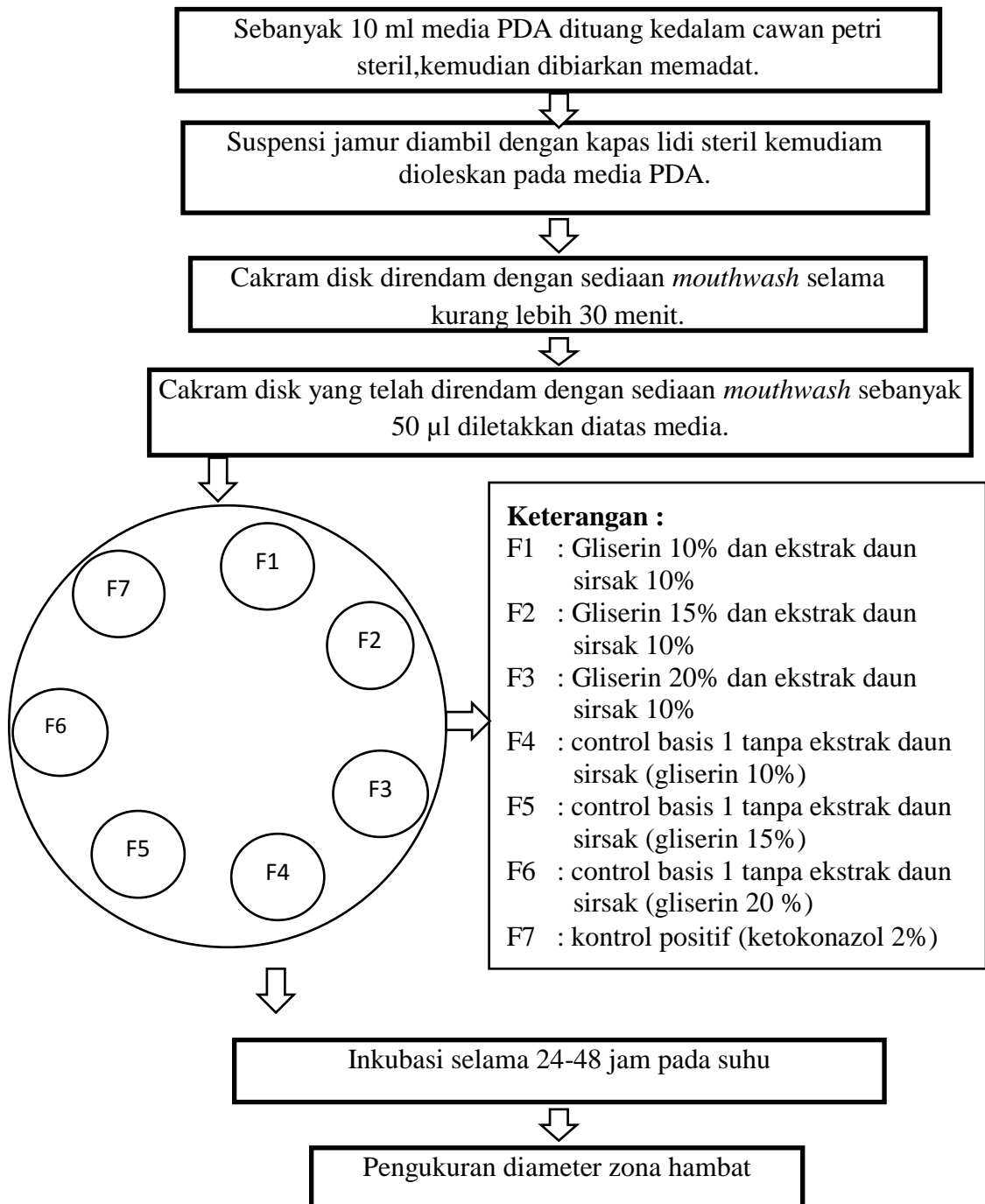
**Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak daun sirsak dengan metode maserasi**



**Gambar 4.** Skema pembuatan sediaan *mouthwash* daun sirsak



Gambar 5. Skema peremajaan dan pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*



**Gambar 6. Skema pengujian aktivitas antijamur secara difusi**

## F. Analisis Hasil

Semua data yang didapat berupa hasil diameter daya hambat dianalisis dengan cara komputerasi serta dengan bantuan perangkat lunak berupa program statistik. Menggunakan uji *One Way ANOVA* untuk uji statistik. Pada penelitian ini dikarenakan jumlah perlakuan melebihi 2 serta variabel penelitian ini bebas. Sebelum melaksanakan uji, dilakukan uji normalitas data dengan uji *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel  $<100$ . Jika data yang diperoleh berdistribusi normal, maka diteruskan dengan uji *One Way ANOVA* ( $p < 0.05$ ). Jika data yang diperoleh tidak berdistribusi normal, maka diteruskan dengan uji *Kruskal-Wallis* ( $p > 0.05$ ) sesudah dilaksanakan uji signifikansi serta didapatkan hasil yang signifikan ( $p < 0.05$ ) maka selanjutnya melakukan analisis *Post Hoc* dengan uji *Tukey* untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan signifikan.