

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah desain penelitian eksperimental laboratoris untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) dengan berbagai konsentrasi terhadap *Klebsiella pneumoniae*. Penelitian ini akan menggunakan metode *tube dilution test*. Pada *tube dilution test* terdiri atas dua tahap: tahap pertama, tahap pengamatan kekeruhan bahan media broth untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM), dan tahap kedua dilakukan penanaman satu ose pada media NAP dari masing-masing tabung reaksi dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Dimana pada penelitian ini dibagi dalam 2 kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan, yaitu kelompok bakteri yang diberi ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.), sedangkan untuk kelompok kontrol, yaitu kelompok bakteri yang tidak diberi ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.).

Adapun rancangan operasional penelitian ini, yaitu sebagai berikut: ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) dicampurkan pada media bakteri *Klebsiella pneumoniae* (dengan tingkat kekeruhan 10^6 bakteri per ml). Kemudian keesokan harinya diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri dengan melihat kekeruhan media perbenihan cair (*broth*) dan hasilnya dinyatakan dalam bentuk skoring. Dalam pengamatan tersebut disediakan dua tabung kontrol yang masing masing berisi ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*

(L.) Less.) sebagai kontrol negatif dan bakteri *Klebsiella pneumoniae* sebagai kontrol positif. Dari sini dapat diketahui tingkat kekeruhan dan juga nilai KHM (Kadar Hambat Minimal) dari ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Selanjutnya biakan dari semua tabung diinokulasikan pada biakan media agar padat, diinkubasi, keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan ketiadaan pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM (Kadar Bunuh Minimal).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Agustus 2013.

4.3 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) dan menggunakan isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Pengulangan dan Besar Sampel

4.4.1 Pengulangan

Pada penelitian ini, digunakan 5 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda serta 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus estimasi pengulangan sebagai berikut $p(n-1) \geq 15$ (Loekito, 1998). Berdasarkan rumus tersebut, hitungan pengulangan perlakuan adalah sebagai berikut :

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 22/7$$

$$n \geq 3,14 \rightarrow 4$$

Jadi besarnya pengulangan yang dilakukan adalah 4 kali.

Keterangan : n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak daun beluntas).

4.4.2 Besar Sampel

Setelah diketahui jumlah perlakuan dan pengulangan, maka jumlah sampel dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut $S = p \times n$ (Loekito, 1998).

Penghitungan jumlah sampel sebagai berikut :

$$S = p \times n$$

$$= 7 \times 4$$

$$= 28$$

Jadi jumlah sampel yang diperlukan adalah 28 sediaan *Nutrient Agar Plate* yang telah dibiakkan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Keterangan : S = jumlah sampel

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kekeruhan yang timbul pada media cair untuk menentukan Kadar Hambat

Minimum (KHM) dan jumlah koloni yang tumbuh pada media agar padat untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

4.5.2 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) dengan konsentrasi yang berbeda-beda.

4.6 Definisi Operasional

1. Daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tanaman pagar yang tumbuh di daerah Dinoyo Malang dengan jumlah 300 gram yang diekstrak di Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang dengan pelarut etanol yang kemudian dievaporasi sehingga menghasilkan ekstrak yang kental dengan konsentrasi 100%.
2. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang digunakan diperoleh dari kultur bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari sputum penderita pneumonia serta diuji secara biokimia dan memberikan hasil sesuai karakteristik bakteri *Klebsiella pneumoniae*.
3. Uji kepekaan metode *tube dilution test* adalah uji kepekaan *in vitro* dengan melakukan satu seri pengenceran antimikroba, kemudian ditambahkan perbenihan cair yang telah mengandung bakteri.
4. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak daun beluntas yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, ditandai dengan tidak

terdapatnya kekeruhan pada larutan ekstrak daun beluntas yang telah diberi bakteri tersebut dalam media *Nutrient broth*.

5. Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak daun beluntas yang mampu membunuh bakteri *Klebsiella pneumoniae*, ditandai oleh jumlah koloni pada medium NAP yang telah dilakukan *streaking* (penggoresan) dengan satu ose campuran ekstrak daun beluntas dengan bakteri tersebut, dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% (0,001) inokulum asli.

4.7 Pengukuran Pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*

Untuk mengukur pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, dilakukan penghitungan jumlah koloni dengan menggunakan *colony counter*.

4.8 Alat dan Bahan Penelitian

4.8.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.)

1. Daun beluntas
2. Etanol 96%
3. Akuades
4. Botol hasil ekstrak
5. Oven
6. Kertas saring untuk membungkus daun beluntas
7. Timbangan
8. Gelas Erlenmeyer
9. Corong gelas

10. Labu evaporator
11. Labu penampung etanol
12. Evaporator
13. *Rotatory evaporator*
14. Selang *water pump*
15. *Water pump*
16. *Water bath*
17. *Vacuum pump*

4.8.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

1. Isolat bakteri *Klebsiella pneumoniae*
2. *Nutrient Agar Plate (NAP)*
3. Bahan pengecatan gram
 - Kristal Violet
 - Lugol
 - Alkohol 96%
 - Safranin
4. Minyak emersi, ose, mikroskop
5. Lampu spiritus

4.8.3 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Perbenihan Bakteri

1. Tabung reaksi
2. *Nutrient broth*
3. Pipet steril ukuran 1 ml dan 10ml
4. Lampu spiritus
5. Inkubator

6. *Vortex*

4.8.4 Alat dan Bahan untuk *Tube Dilution Test*

1. Tabung reaksi dengan pemberian label I, II, III, IV, dan V, tabung reaksi untuk kontrol bakteri dan ekstrak daun beluntas.
2. Pipet steril ukuran 1ml dan 10 ml.
3. Inkubator
4. *Vortex*
5. Hasil ekstraksi daun beluntas
6. Perbenihan cair yang telah distandarisasikan

4.8.5 Alat dan Bahan untuk Uji *Streaking Plate*

1. NAP
2. Ose
3. Lampu spirtus
4. *Vortex*

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Identifikasi Bakteri

4.9.1.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

1. Mempersiapkan *object glass* dengan cara membersihkan permukaannya dengan kapas dan kemudian dilewatkan diatas api bunsen beberapa kali untuk menghilangkan lemak pada *object glass*. Kemudian *Object glass* didinginkan.

2. Meneteskan satu ose akuades steril pada *object glass* ditambah dengan satu ose sediaan bakteri kemudian disuspensi.
3. Mengeringkan sediaan diudara.
4. Sediaan difiksasi dengan melewati sediaan diatas api sebanyak 3 kali.
5. Meneteskan kristal violet pada sediaan hingga memenuhi seluruh *object glass* dan didiamkan selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dibilas dengan air bersih.
6. Meneteskan lugol pada sediaan hingga memenuhi seluruh *object glass* dan didiamkan selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dibilas dengan air bersih.
7. Meneteskan alkohol 96% pada sediaan hingga memenuhi seluruh *object glass* dan didiamkan selama 5-10 detik. Sisa alkohol dibuang.
8. Meneteskan safranin pada sediaan hingga memenuhi seluruh *object glass* dan didiamkan selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dibilas dengan air bersih.
9. Mengeringkan sediaan dengan kertas penghisap.
10. Melihat sediaan dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x.

Hasil tampak dimikroskop berupa bakteri *Klebsiella pneumoniae* berbentuk batang warna merah (gram negatif).

4.9.1.2 Perbenihan

Pada hari kedua, biakan diambil (satu ose), kemudian ditanam pada medium *Mc Conkey*, untuk mendapatkan koloni terpisah, kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C. Pada hari ketiga, hasil dari *Mc Conkey* dilihat (ada fermentasi gula atau tidak).

4.9.1.3 Tes Microbact

1. Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan ke dalam 3-6 ml garam fisiologis pada tabung reaksi steril hingga homogen.
2. Larutan bakteri yang telah homogen diteteskan ke dalam sumur *Microbact* sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian diteteskan reagen pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes.
4. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*.
5. Angka-angka oktal didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktal).
6. Nama bakteri dilihat dengan komputer berdasarkan angka oktal yang didapat.



Gambar 4.1 Microbact set (Microplate 12A) (Oxoid, 2004)

4.9.1.4 Penanaman pada *Media Nutrient Agar*

Dilakukan inokulasi bakteri pada media *Nutrient Agar* yang kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C, selama 18-24 jam. Penanaman ini untuk melihat pertumbuhan koloni bakteri. Adanya kapsul *polysaccharide* yang tebal menyebabkan koloni *Klebsiella* yang tumbuh pada media perbenihan tampak besar, basah, mukoid, dan berbentuk oval. Kultur berbau khas yang disebut "*cor taco like odor*".

4.9.2 Perbenihan Cair Bakteri 10⁶ bakteri/ml

Pada metode ini digunakan standar yang setara dengan Mc Farland 0,5. Pembuatan biakan materi dengan standar yang setara dengan Mc Farland 0,5 dimulai dengan diambilnya bakteri pada kultur kuman sebanyak satu ose dan dicampur dengan *broth* dengan volume 10 ml dan dikocok sampai diperoleh kepadatan yang sama dengan standar Mc Farland 0,5 (1-1,5 x 10⁸ kuman/ml). Dari larutan bakteri tersebut diambil sebanyak 1 ml dan dicampur dengan *broth* sebanyak 9 ml sehingga diperoleh kepadatan 10⁷ bakteri/ml, ambil lagi 1 ml larutan dengan konsentrasi 1x10⁷ bakteri/ml tersebut, dan masukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml MH *broth* steril. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 1x10⁶ bakteri/ml. Biakan bakteri siap digunakan untuk penelitian.

4.9.3 Pembuatan Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) Metode Maserasi dan Evaporasi

4.9.3.1 Proses Ekstraksi

Daun beluntas dikeringkan di bawah sinar matahari. Kemudian ditumbuk sampai halus dan jika telah halus, 300 gram daun beluntas dibungkus

menggunakan kertas saring dan direndam dalam etanol 96% sampai volume 700 ml selama semalam (\pm 12 jam). Kemudian hasil ekstraksi dievaporasi.

4.9.3.2 Proses Evaporasi

Evaporator set dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan $30^\circ - 40^\circ$ terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin. Kemudian tabung pendingin dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastik. Tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.

Hasil ekstraksi dimasukkan dalam labu penampung sedangkan *rotary evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan. Pemanas akuades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih dengan suhu 80°C (sesuai titik didih etanol) dan etanol mulai menguap.

Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.

Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil berkurang dan menjadi kental. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama 2 jam pada suhu 80°C untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan hasil ekstrak 100%.

4.9.4 Uji Kepekaan Antimikroba *Tube Dilution Test* Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.)

Penelitian eksplorasi pertama menggunakan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%, sehingga pembuatan larutan sebagai berikut :

- 1 Tabung 1 diisi dengan 100 % ekstrak daun beluntas sebagai kontrol negatif.
- 2 Tabung 2 diisi dengan 0,03125 ml ekstrak daun beluntas + 0,9875 ml akuades + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 3,125%
- 3 Tabung 3 diisi dengan 0,0625 ml ekstrak daun beluntas + 0,9375 ml akuades + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 6,25%
- 4 Tabung 4 diisi dengan 0,125 ml ekstrak daun beluntas + 0,875 ml akuades + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 12,5%
- 5 Tabung 5 diisi dengan 0,25 ml ekstrak daun beluntas + 0,75 ml akuades + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 25%
- 6 Tabung 6 diisi dengan 0,5 ml ekstrak daun beluntas + 0,5 ml akuades + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 50%
- 7 Tabung 7 diisi dengan 1 ml ekstrak daun beluntas + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 100%
- 8 Larutan akuades, larutan ekstrak daun beluntas, serta perbenihan cair bakteri *Klebsiella pneumoniae*, dicampur rata dengan vorteks.
- 9 Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

- 10 Keesokan harinya dilakukan pencatatan terhadap tabung yang mulai terjadi kekeruhan. Kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak adanya kekeruhan merupakan KHM.
- 11 Untuk memperoleh data KBM, dilakukan penanaman isi tabung yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan (kekeruhan) sebanyak 0,1 ml (satu mata ose) pada medium NAP. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri.
- 12 Keesokan harinya dilakukan perhitungan jumlah koloni, ditentukan nilai Kadar Bunuh Minimal dari ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) terhadap *Klebsiella pneumoniae*.

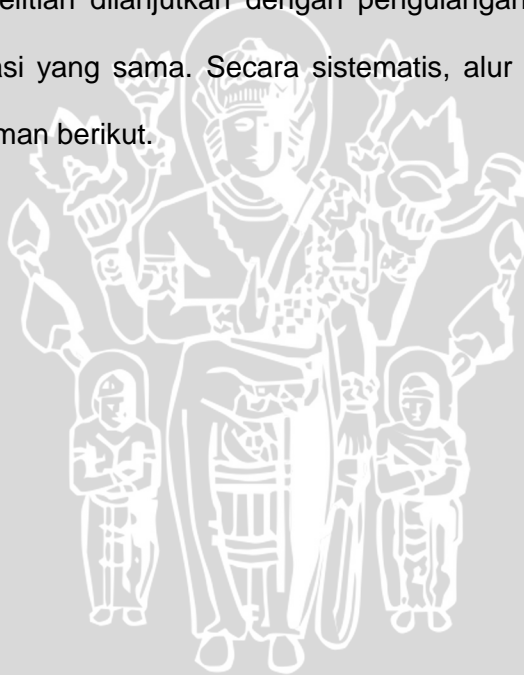
Penelitian eksplorasi kedua menggunakan rentang konsentrasi yang lebih sempit antara 12,5% hingga 25% dengan perbedaan antarkonsentrasi 2,5%, yaitu konsentrasi 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5%, dan 25%. sehingga pembuatan larutan sebagai berikut :

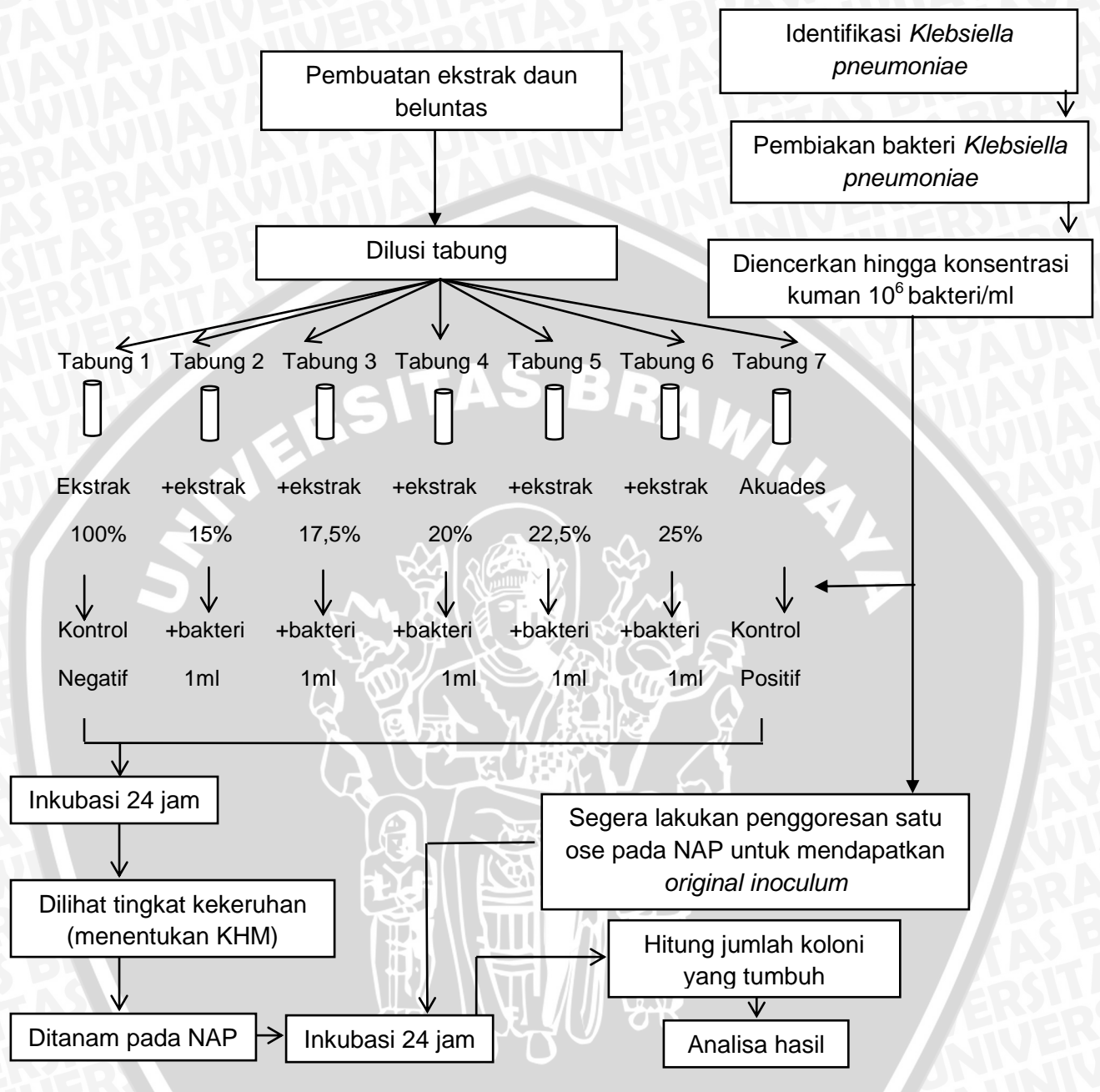
1. Menyediakan 7 tabung reaksi steril; tabung 1, tabung 2, tabung 3, tabung 4, tabung 5, tabung 6, tabung 7.
2. Menyediakan akuades dan larutan bakteri uji.
3. Menyediakan ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.)
4. Untuk pengujian efek antimikroba diberi tanda dan dibuat larutan pada tabung 1 sampai tabung 7, adapun larutan antimikroba tersebut dibuat dengan cara mencampurkan antara ekstrak daun beluntas, akuades dan larutan bakteri uji dengan perbandingan sebagai berikut:
 - Tabung 1 diisi dengan 100 % ekstrak daun beluntas sebagai kontrol negatif.

- Tabung 2 diisi dengan 0,125 ml ekstrak daun beluntas + 0,875 ml akuades + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 12,5%
 - Tabung 3 diisi dengan 0,15 ml ekstrak daun beluntas + 0,85 ml akuades + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 15%
 - Tabung 4 diisi dengan 0,175 ml ekstrak daun beluntas + 0,825 ml akuades + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 17,5%
 - Tabung 5 diisi dengan 0,2 ml ekstrak daun beluntas + 0,8 ml akuades + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 20%
 - Tabung 6 diisi dengan 0,225 ml ekstrak daun beluntas + 0,775 ml akuades + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 22,5%
 - Tabung 7 diisi dengan 0,25 ml ekstrak daun beluntas + 0,75 ml akuades + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumoniae*, sehingga konsentrasi ekstrak daun beluntas adalah 25%
 - Tabung 8 diisi dengan 1 ml *aquades* + 1 ml larutan bakteri *Klebsiella pneumonia* sebagai kontrol positif.
5. Larutan akuades, larutan ekstrak daun beluntas, serta perbenihan cair bakteri *Klebsiella pneumoniae*, dicampur rata dengan vorteks.
 6. Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
 7. Keesokan harinya dilakukan pencatatan terhadap tabung yang mulai terjadi kekeruhan. Kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak adanya kekeruhan merupakan KHM.

8. Untuk memperoleh data KBM, dilakukan penanaman isi tabung yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan (kekeruhan) sebanyak 0,1 ml (satu mata ose) pada medium NAP. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri.
9. Keesokan harinya dilakukan perhitungan jumlah koloni, ditentukan nilai Kadar Bunuh Minimal dari ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) terhadap *Klebsiella pneumoniae*.

Dari uji pendahuluan kedua telah didapatkan konsentrasi penelitian utama. Sehingga penelitian dilanjutkan dengan pengulangan sebanyak empat kali dengan konsentrasi yang sama. Secara sistematis, alur kerja dapat dilihat pada gambar 4.2 halaman berikut.





Gambar 4.2 Alur Kerja Penelitian

KP : Kontrol Positif, KN : Kontrol Negatif, NAP : Nutrient Agar Plate, KHM : Kadar Hambat Minimal, KBM : Kadar Bunuh Minimal

4.10 Pengumpulan dan Analisa Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari hasil penghitungan jumlah koloni *Klebsiella pneumoniae* pada NAP yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Data tersebut kemudian dimasukkan dalam tabel dibawah ini.

Tabel 4.1 Hasil Penghitungan Jumlah Koloni *Klebsiella pneumoniae*

Konsentrasi	Jumlah koloni (Pengulangan)				Jumlah Koloni	Rerata Koloni	Standard Deviasi
	I	II	III	IV			

Seluruh teknik pengolahan data hasil penelitian akan dianalisis secara komputerisasi dengan menggunakan software *Statistical Product and Service Solutions 20 (SPSS 20) for windows* dengan tingkat signifikansi atau nilai probabilitas 0,05 dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

Dari data yang diperoleh, dibuat grafik yang akan menggambarkan adanya hubungan antara ekstrak daun beluntas dalam berbagai konsentrasi. Dengan adanya data jumlah koloni pada perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak daun beluntas, maka penelitian ini dapat dibahas secara analitik dengan menggunakan uji ANOVA, analisa regresi, dan uji korelasi.