

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan November 2022 sampai dengan Maret 2023. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Teknologi Farmasi, Laboratorium Instrumentasi Jurusan Farmasi Universitas Sriwijaya, Laboratorium Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sriwijaya, dan Laboratorium PT. DKSH Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik (NewTech Electronic Balance[®]), kain hitam, peralatan pembuatan simplisia, peralatan maserasi, *rotary evaporator* (Yamato) oven, *magnetic stirrer* (IKA[®] C-MAG HS 4), alat-alat gelas (Pyrex[®] dan Iwaki), pipet mikro 10 – 1000 (Eppendorf[®], Accumax[®], dan Labopettle[®]), pH meter (Thermo Scientific Eutech[®]), sentrifuge (IEC[®]), lemari pendingin, spektrofotometer UV-Vis (Biobase[®] BK-UV1900PC), *sonicator*, satu set alat pemeliharaan hewan uji, sonde atau spuit per-oral, *Particle Size Analyzer* (Malvern[®]), timbangan analitik (0,0001 g) (Ohaus[®]), *vortex* (LSE[®]), *blender* (Philips[®]).

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun ketepeng cina (*Senna alata* L.), etanol 70% (Brataco[®]), kertas saring (Whatman[®]), Kitosan (Sigma

Aldrich[®]), Natrium Tripolifosfat (Nitro kimia), Asam sitrat (Sigma Aldrich[®]), aquadest (Bratachem[®]), tabung *vacutainer* EDTA (Vaculab[®]), plat silika gel GF254 (Merck), *blue tip* (Eppendorf[®]), Na CMC 0,5% (Brataco[®]), Metformin (PT.Dexa Medica[®]) dan NaCl 0,9% (Merck[®])

3.3 Hewan Uji

Tikus putih berjenis kelamin jantan dengan jenis galur Wistar (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini dengan berat badan tikus antara 200-300 g dan berumur antara 2-3 bulan. Penelitian ini menggunakan tikus yang sehat, berperilaku normal, dan tidak cacat.

3.4 Metode Penelitian

3.4.1 Pembuatan Simplisia

Bagian tanaman yang digunakan berupa bagian daun dari tanaman ketepeng cina (*Senna alata* L.) yang diperoleh dari wilayah Inderalaya, Sumatera Selatan. Simplisia dibuat dengan cara sampel sampel daun ketepeng cina (*Senna alata* L.) ditimbang sebanyak 5kg, disortasi, ditimbang, pengeringan di lakukan dengan cara diangin-anginkan di bawah sinar matahari dan ditutup kain hitam. Daun ketepeng cina yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan blender dan ditimbang bobot bersihnya.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia ketepeng cina sejumlah 1 kg dimaserasi dalam wadah kaca terlindung sinar matahari selama 2 x 24 jam. Proses maserasi pertama dilakukan selama 2x 24 jam menggunakan 6 L etanol 70%. Remaserasi dilakukan pada sisi ampas menggunakan 4 L etanol 70%. Maserat yang didapat, dipisahkan dengan cara disaring menggunakan kertas saring dan filtrat yang diperoleh dipekatkan

dengan cara menguapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 70°C. Nilai % rendemen ekstrak daun ketepeng cina dihitung dengan rumus sesuai Persamaan 1 di bawah ini (Riadini dkk., 2015).

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat (g)}}{\text{bobot serbuk simplisia yang diekstraksi (g)}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

3.4.3 Skrining Fitokimia

Ekstrak daun ketepeng cina di lakukan skrining fitokimia secara kualitatif untuk mengetahui kandungan metabolit sekundernya dan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam daun ketepeng cina. Skrining fitokimia ekstrak yang dilakukan antara lain

3.4.3.1 Uji Fitokimia Senyawa Flavonoid

Ekstrak diambil sebanyak 500 mg, lalu dicampurkan dengan 5 mL etanol 70%, lalu dikocok, dan dipanaskan selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh kemudian ditambah serbuk magnesium sebanyak 0,2 g dan beberapa tetes HCl pekat. Terbentuknya warna kuning kehijauan, jingga menunjukkan adanya flavonoid (Setiabudi dan Tukiran, 2017).

3.4.3.2 Uji Fitokimia Senyawa Saponin

Pengujian senyawa saponin dilakukan dengan menggunakan sebanyak 500 mg ekstrak ditambahkan 2 mL air suling sambil dikocok selama 10 detik. Jika busa yang terbentuk tetap stabil selama 10 menit maka menunjukkan adanya saponin (Bulugahayapitiya, 2013).

3.4.3.3 Uji Fitokimia Senyawa Tanin

Pengujian dilakukan dengan 2 gram ekstrak daun ketepeng dilarutkan dengan air lalu direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%, jika terjadi warna

biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin (Hita *et al*, 2021; Kristianti *et al*, 2008).

3.4.3.4 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid

Ekstrak sebanyak 2 g dicampurkan dengan 5 mL larutan 0,05 N amonia dalam kloroform dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok, dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 5 tetes asam sulfat 2 N, kocok, dan diamkan beberapa menit hingga terbentuk 2 lapisan (Sangi dkk., 2008). Lapisan atas digunakan untuk pengujian alkaloid dengan cara filtrat dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing 2,5 mL. Ketiga tabung reaksi tersebut dianalisis menggunakan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Terbentuknya endapan putih pada pereaksi Mayer, endapan coklat pada pereaksi Wagner, dan endapan orange pada pereaksi Dragendorff pada masing-masing hasil uji menunjukkan adanya kandungan senyawa alkaloid (Sangi dkk., 2008).

3.4.3.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid dan Triterpenoid

Pengujian steroid dan triterpenoid menggunakan lapisan bawah. Lapisan bawah diteteskan ke plat tetes dan dibiarkan kering. Setelah kering tambahkan asam asetat anhidrat dan diaduk rata. Setelah homogen, maka dimasukkan 3 tetes asam sulfat pekat dan amati warna yang terjadi. Perubahan warna menjadi hijau menunjukkan adanya steroid. Perubahan warna menjadi merah jingga menunjukkan adanya triterpenoid (Sangi dkk., 2008).

3.4.3.6 Uji Fitokimia Senyawa Fenolik

Pengujian dilakukan dengan menggunakan 100 mg ekstrak dicampur dengan 1 mL larutan besi klorida 2% jika menunjukkan warna hijau kebiruan atau hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa fenolik (Bulugahayapitiya, 2013).

3.4.4 Karakterisasi Ekstrak

3.4.4.1 Uji Organoleptis

Uji organoleptis pada ekstrak daun ketepeng cina dilakukan dengan cara memeriksa warna, bau atau aroma, bentuk dan rasa dari daun ketepeng cina yang diamati dengan panca indra.

3.4.4.2 Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air menggunakan alat Moisture balance dengan cara meletakkan simplisia ketepeng cina pada plat lempengan alat sebanyak 1g, kemudian hasil dicatat pada saat presentase kadar air konstan.

3.4.4.3 Uji Susut Pengerinan

Ditimbang ekstrak sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam krus porselen bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan telah ditara. Sampel diratakan dalam krus porselen dengan menggoyangkan kurs hingga merata. Masukkan kedalam oven, buka tutup krus, dipanaskan pada tempertur 105°, ditimbang dan ulangi pemanasan sampai didapat berat yang konstan. Perhitungan dapat menggunakan persamaan 6 (Depkes RI, 2000).

$$\% \text{Susut pengeringan} = \frac{w_0 - w_1}{w_1} \times 100 \% \dots\dots\dots(2)$$

3.4.5 Penentuan Kadar Flavonoid Total

3.4.5.1 Pembuatan Larutan Standar Kuarsetin

Sebanyak 10 mg kuarsetin ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL etanol 96% sebagai larutan standar kuarsetin 100 ppm. Dibuat seri konsentrasi larutan standar kuarsetin 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm. Masing-masing larutan standar kuarsetin dipipet sebanyak 0,5 mL lalu ditambahkan 0,1 mL aluminium (III) klorida

10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL akuades. Larutan dikocok hingga homogen, diinkubasi selama 30 menit. Penetapan panjang gelombang maksimum larutan standar kuersetin dilakukan dengan cara diambil salah satu konsentrasi larutan standar dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Haeria *et al.*, 2016).

3.4.5.2 Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

Kurva standar kuersetin dibuat dengan cara menghubungkan konsentrasi larutan standar kuersetin dengan hasil serapannya yang diperoleh dari pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah didapatkan berdasarkan penetapan panjang gelombang maksimum larutan standar kuersetin (Haeria *et al.*, 2016). Dari data pengukuran tersebut dibuat kurva standar kuersetin dengan menghubungkan nilai absorbansi sebagai koordinat (Y) dan konsentrasi larutan standar (ppm) sebagai absis (X).

3.4.5.3 Penetapan Kadar Flavonoid Total

Sebanyak 10 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL metanol Pa. Sebanyak 1,5 mL sampel uji diambil lalu ditambahkan 0,1 mL aluminium (III) klorida 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M dan 3,3 mL akuades. Larutan dikocok hingga homogen kemudian diinkubasi selama 30 menit. Diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah didapatkan berdasarkan penetapan panjang gelombang maksimum larutan standar kuersetin (Haeria *et al.*, 2016). Kadar flavonoid total dihitung dengan rumus pada persamaan 3 di bawah ini:

$$\text{TFC} = \frac{c \times V \times fp}{m} \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan :

TFC = kadar flavonoid total (mgQE/g sampel)

c = kesetaraan kuersetin (mg/L)

V = volume sampel (L)

Fp = faktor pengenceran

m = massa sampel (g)

3.5 Formula Nanosuspensi

Formula yang digunakan pada penelitian ini terdapat 3 formula dengan menggunakan variasi konsentrasi kitosan. Menurut penelitian Putri (2019) ED50 ekstrak daun ketepeng cina sebagai antidiabetes sebanyak 522,4 mg. Natrium tripolifosfat dengan konsentrasi 0,1% kemudian masing-masing formula ditambahkan kitosan dengan variasi 0,1%, 0,5%, dan 1% dengan acuan penelitian Katas *et al.*(2012) dan Nanda *et al* (2012).

Tabel 1. Komposisi formula nanosuspensi daun ketepeng cina

Bahan	Jumlah dalam formula		
	F1	F2	F3
Ekstrak daun ketepeng cina (<i>Senna alata</i> L.)	522,4 mg	522,4 mg	522,4 mg
Kitosan	0,1%	0,5%	1%
Natrium tripolifosfat	0,1%	0,1%	0,1%
Tween 80	0,01%	0,01%	0,01%

3.6 Preparasi Sediaan

3.6.1 Preparasi Larutan Asam Sitrat

Preparasi asam sitrat 2% dengan menimbang serbuk asam sitrat sebanyak 0,6 gram yang dilarutkan dalam 30 mL aquadeion kedalam vial dan diaduk hingga homogen. Hasil larutan asam sitrat 2% yang telah homogen tersebut kemudian digunakan untuk melarutkan serbuk kitosan.

3.6.2 Preparasi Larutan Kitosan

Pembuatan larutan kitosan berdasarkan masing-masing variasi konsentrasi yang digunakan 0,1%,0,5%,1% kemudian dilarutkan di dalam 30 mL asam sitrat 2%. Larutan diaduk secara konstan dengan menggunakan *magnetic stirrer* berkecepatan 750 rpm selama 60 menit pada suhu kamar hingga larut.

3.6.3 Preparasi Larutan Natrium Tripolifosfat

Pembuatan larutan natrium tripolifosfat 0,1% dilakukan dengan menimbang 0,03 gram, dibuat dengan cara dilarutkan dengan cara dilarutkan dalam 30 mL aquademineral yang diaduk secara konstan dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut.

3.6.4 Pembuatan Sediaan Nanosuspensi Ekstrak Daun Ketepeng Cina

Pembuatan sediaan uji nanosuspensi ekstrak daun ketepeng Cina dilakukan dengan metode gelasi ionik. 522,4 mg ekstrak daun ketepeng Cina dilarutkan dalam 5 mL aquadest hingga tercampur homogen. Larutan kitosan dalam asam sitrat 2% sebanyak 20 mL ditambahkan ke dalam larutan ekstrak daun ketepeng Cina secara *drop by drop* menggunakan pipet mikro 50 μ L. Larutan diaduk secara konstan dengan menggunakan *magnetic stirrer* berkecepatan 750 rpm selama 30 menit pada suhu kamar hingga homogen.

Selanjutnya tambahkan *drop by drop crosslinker* natrium tripolifosfat menggunakan kecepatan 1 tetes per 3 detik ke dalam larutan kitosan-ekstrak daun ketepeng Cina dengan pengadukan yang konstan. Pengadukan dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* dan dihomogenkan selama 1 jam dengan kecepatan 750 rpm. Setelah itu dihomogenisasi menggunakan *sonicator bath* untuk memperkecil ukuran partikel.

3.7 Karakteristik Nanosuspensi Ekstrak Daun Ketepeng Cina

3.7.1 Organoleptis

Pengujian organoleptis nanosuspensi yang dihasilkan diuji secara organoleptis mulai dari bentuk dan warna dari sediaan yang terbentuk. Terdapat pula parameter lainnya yang diperhatikan yaitu dari segi endapan dan kemampuan sediaan untuk terdispersi. Sediaan yang dihasilkan ini diharapkan mampu terdispersi secara sempurna atau sediaan mudah untuk terdispersi kembali.

3.7.2 Pengukuran pH Sediaan

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter ke dalam sediaan nanosuspensi ekstrak daun ketepeng cina. Sediaan ditentukan dengan pH meter digital. Alat dilakukan kalibrasi lalu elektroda dari pH meter digital dicelupkan ke dalam sediaan kemudian ke dalam sediaan kemudian dibiarkan selama 30 detik, catat nilai pH.

3.7.3 Ukuran Partikel, Poly Dispersity Index (PDI), Zeta Potensial

Ukuran diameter, distribusi, dan zeta potensial partikel setiap formula dianalisis dengan menggunakan alat PSA melalui metode DLS. Instrumen akan menembakkan cahaya monokromatik yang kemudian akan dibiaskan pada sudut 173° dan sudut 90° . Detektor yang bertugas menghasilkan nilai zeta potensial akan menangkap sinar yang dibiaskan pada sudut 173° , detektor yang menghasilkan diameter dan distribusi partikel menangkap sinar yang dibiaskan pada sudut 90° .

3.7.4 Penentuan Persen Efisiensi Enkapsulasi(% EE)

Sediaan nanosuspensi diambil sebanyak 2 mL lalu disentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang dihasilkan dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang yang

digunakan pada kurva kalibrasi. Hasil yang didapatkan dihitung jumlah % EE menggunakan persamaan berikut.

$$\%EE = \frac{\text{Jumlah konsentrasi ekstrak} - \text{Jumlah konsentrasi ekstrak tidak terjerap}}{\text{Jumlah konsentrasi ekstrak}} \times 100\% \dots\dots(4)$$

3.7.4.1 Analisis Data Penentuan Formula Terbaik

Data persen efisiensi penjerapan dan kelarutan diolah dengan metode *One way* ANOVA pada program SPSS®26 dengan terlebih dahulu dilakukan uji normalitas untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak terdistribusi normal. Analisis *One way* ANOVA dilakukan untuk mengetahui nilai signifikan dan mengamati pengaruh antara faktor terhadap respon dari nilai signifikan (*p-value*). Selanjutnya dilakukan uji lanjutan post hoc Duncan untuk menguji perbedaan diantara semua pasangan perlakuan

3.8 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan yaitu tikus putih jantan galur Wistar yang berusia 2 – 3 bulan dengan berat badan 150 – 200 g. Proses aklimatisasi hewan uji dilakukan selama satu minggu. Aklimatisasi merupakan prosedur pengadaptasian hewan uji dengan lingkungan barunya. Pembagian jumlah tikus untuk uji penurunan glukosa darah tiap kelompok dihitung berdasarkan rumus Federer (1977) menggunakan Persamaan sebagai berikut:

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

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan (t = 5)

n = jumlah ulangan tiap perlakuan

Penelitian yang dilakukan ini termasuk jenis penelitian eksperimen, kemudian berdasarkan perhitungan menggunakan rumus, maka jumlah total sampel yang digunakan bagi hewan uji sebanyak 25 ekor dalam rentang jumlah yang diharuskan. Hewan uji ini terbagi atas 5 ekor di setiap kelompok sejumlah 5 kelompok uji. Selain itu, tiap kelompok perlakuan di lebihkan satu untuk mengantisipasi kematian pada hewan uji, sehingga tikus yang dibutuhkan pada penelitian ini sebanyak 30 ekor, pada tabel di bawah dapat dilihat kelompok uji yang digunakan dalam penelitian ini.

Tabel 2. Kelompok perlakuan hewan uji

No	Kelompok	Perlakuan
1	Normal	Tidak diberikan perlakuan
2	Kontrol negative	DTLF + plasebo nanosuspensi
3	Kontrol positif	DLTF + metformin dosis 150 mg/kgBB
4	Perlakuan I	DLTF + suspensi ekstrak daun ketepeng cina 522,4 mg/kgBB
5	Perlakuan II	DTLF + nanosuspensi ekstrak ketepeng cina 522,4 mg/kgBB

3.9 Pembuatan Sediaan Uji

3.9.1 Pakan diet lemak dan tinggi fruktosa

Hewan uji diberikan pakan diet lemak tinggi fruktosa dengan komposisi fruktosa sebanyak 1,8 g/kg BB dan lemak tinggi sebanyak 15 g/kg BB yang terdiri dari pakan standar 80%, 15% minyak jelantah, dan 5% kuning telur bebek yang diberikan secara oral. Pakan dibuat dengan cara merebus telur bebek hingga matang. Kuning telur bebek yang telah matang digerus hingga halus dan dicampur dengan minyak jelantah hingga homogen. Pakan kaya lemak diberikan dalam keadaan kering setelah dijemur (Ariani dkk., 2017).

3.9.2 Suspensi Na CMC 0,5%

Sebanyak 500 mg Na CMC ditaburkan pada 10 mL air panas dalam lumpang panas hingga mengembang. Setelah mengembang gerus dengan air sampai 100 mL hingga homogen.

3.9.3 Suspensi Metformin

Sediaan suspensi metformin dengan cara menggerus 0,045 g serbuk metformin di dalam lumpang, kemudian ditambahkan Na CMC 0,5% hingga terdispersi dan digerus hingga homogen. Setelah homogen, tambahkan sedikit aquadest dan diasuk merata lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga 100 mL, dan diasuk merata (Anwar dkk., 2017).

3.9.4 Suspensi Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina

Pembuatan suspensi ekstrak etanol daun ketepeng cina dilakukan dengan membuat larutan induk dibuat dari dosis ekstrak etanol 522,4 mg/kgBB dengan melarutkan 0,522 g ekstrak etanol daun ketepeng cina ke dalam larutan Na CMC 0,5% secukupnya kemudian tambahkan akuades hingga 100 mL di dalam labu ukur 100 mL. Sediaan uji dosis 522,4 mg/kgBB dibuat dengan pengenceran dari larutan induk.

Cara membuat sediaan dosis 522,4 mg/kgBB yaitu dengan mengambil 25 mL larutan induk, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan akuades hingga volume mencapai 50 mL. Sediaan dengan dosis 522,4 mg/kgBB dibuat dengan mengambil 12,5 mL larutan induk dan ditambahkan akuades hingga volume mencapai 50 mL.

3.10 Pengukuran Kadar Glukosa Darah

Pengukuran kadar glukosa darah pada hari ke-30 dilakukan pengukuran kadar glukosa darah tikus untuk mengetahui peningkatan kadar glukosa darah tikus.

Setelah tikus mengalami DM tipe 2 (kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL), maka induksi pakan diet tinggi lemak dan fruktosa dihentikan dan dilanjutkan pemberian ekstrak etanol daun ketepeng cina. Pemberian pakan ini dikelompokkan menjadi 5 kelompok perlakuan, dimana pada kelompok kontrol normal tidak diberikan perlakuan tersebut.

Setelah tikus dinyatakan menderita DM tipe 2, kelompok diberikan 5 perlakuan berbeda selama 15 hari. Pengujian kelompok negatif hanya diberikan plasebo nanosuspensi secara oral. Pengujian kelompok kontrol positif diberikan metformin 150 mg/kg BB/hari. Pengujian kelompok terbagi dua yakni pengujian dengan ekstrak daun ketepeng cina dosis 522,4 mg/kgBB dan sediaan nanosuspensi ekstrak daun ketepeng cina dengan dosis 522,4 mg/kgBB.

Pengukuran glukosa darah tikus dilakukan pada hari ke-35, 40 dan 45 dengan cara hewan uji dipuasakan selama 12 jam sebelum pengujian dilakukan (kadar glukosa preprandial). Setelah didapatkan nilai kadar glukosa darah puasa, kemudian dilakukan analisa perhitungan persen penurunan kadar glukosa darah. Perhitungan persen kadar glukosa darah tiap kelompok dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\text{Rumus \%PKGD} = \frac{\text{KGD sesudah induksi} - \text{KGD setelah perlakuan}}{\text{KGD sesudah induksi}} \times 100\% \dots \dots \dots (6)$$

3.11 Analisis Data

Semua data yang diperoleh dari perhitungan penurunan kadar glukosa darah, dilakukan analisis kuantitatif dengan membandingkan data penurunan kadar glukosa darah kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol positif. Data penurunan kadar glukosa darah dianalisis dengan uji normalitas deskriptif (Shapiro-

Wilk) digunakan untuk mengetahui distribusi data dan apabila data terbukti terdistribusi normal, maka dilakukan analisis statistik parametrik dengan ANOVA satu arah dengan taraf kepercayaan 95%. Apabila dari data yang didapat terbukti ada perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan uji post hoc LSD. Data yang tidak terdistribusi normal, maka digunakan metode statistik non-parametrik Kruskal-Wallis. Uji Mann-Whitney dapat dilakukan jika hasil uji Kruskal-Wallis terbukti ada perbedaan yang signifikan. Menggunakan piranti lunak SPSS® (*for windows*) versi 26.0 untuk pengolahan data.