

## **BAB 5**

# **ANALISIS HASIL PENELITIAN**

## BAB 5

### ANALISIS HASIL PENELITIAN

Data penelitian tentang pengaruh imunomodulator Andrographolide terhadap kemampuan daya bunuh intraseluler makrofag pada *Mycobacterium tuberculosis* pada kultur in vitro diperoleh dengan cara menghitung jumlah koloni karakteristik *Mycobacterium tuberculosis* yang masih dapat tumbuh pada media padat Middlebrook 7H10 yang dilaporkan sebagai CFU / ml. Selain CFU / ml juga dihitung makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* (berwarna orange) per 100 makrofag pada *coverslip* yang dicat dengan Acridine Orange pada pengamatan dengan mikroskop fluorescein.

#### 5.1 Hasil pengaruh Andrographolide pada Daya Bunuh Intraseluler Makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis*.

Tahap awal dalam penelitian ini adalah isolasi PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) dari darah vena cubiti relawan sehat.

##### 5.1.1 Hasil isolasi PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) dari darah vena metode sentrifugasi dengan Ficoll Histopaque.

Darah dari relawan sehat diambil PBMCnya (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) dengan metode *density gradient centrifugation* dengan menggunakan sentrifuse *swinging bucket rotor*.

Darah vena cubiti sebanyak 20 ml setelah dilakukan defibrinasi dan pemisahan dengan metode sentrifugasi dalam ficoll histopaque didapatkan

lapisan *buffy coat* yang berada diantara lapisan atas (plasma) dan lapisan bawah (sedimen eritrosit dan granulosit).

### 5.1.2 Hasil maturasi monosit-monosit menjadi menjadi makrofag.

Proses maturasi monosit-monosit menjadi makrofag dilakukan diatas *coverslip* dalam *24 well tissue culture* dalam media RPMI-1640 yang telah ditambah 10 % serum donor golongan darah AB dari PMI- UTD Surabaya. Serum yang ditambahkan sebelumnya telah diinaktifasi / HI-PHS ( *Heat Inactivated Pooled Human Serum*) dengan pemanasan pada suhu 56<sup>o</sup>C selama 30 menit.

.Proses maturasi monocyte menjadi makrofag dilakukan dalam inkubator CO<sub>2</sub> dengan kadar 5 % dan suhu 37<sup>o</sup>C, setiap hari medianya diganti.

Hasil kultur monocytt saat 2 kali optimasi pada sumuran-sumuran *24-wells tissue culture plate* ternyata matur / *confluen* pada hari kelima dan keenam . Sel monocytt yang matur menjadi makrofag setelah dilakukan pengecatan dengan Giemsa tampak pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Gambaran sel monosit yang mature manjadi makrofag pada hari keenam dengan pengecatan Giemsa. Tampak pula limposit disamping makrofag.

Pada Gambar 5.1 berdasarkan hasil pengamatan dengan menggunakan pengecatan Giemsa pada kultur sel-sel makrofag yang telah *mature* tampak bahwa sel-sel makrofag berukuran besar dengan tonjolan-tonjolan dinding sel.

### 5.1.3 Stimulasi kultur makrofag dengan Andrographolide dan infeksi kultur makrofag dengan *Mycobacterium tuberculosis*.

Stimulasi kultur makrofag dengan Andrographolide dilakukan selama 24 jam. Andrographolidenya disiapkan dengan konsentrasi 100 µg tiap 50 µL larutan. Pelarutan Andrographolide dengan ethanol menjadi lebih mudah setelah ditambah DMSO.

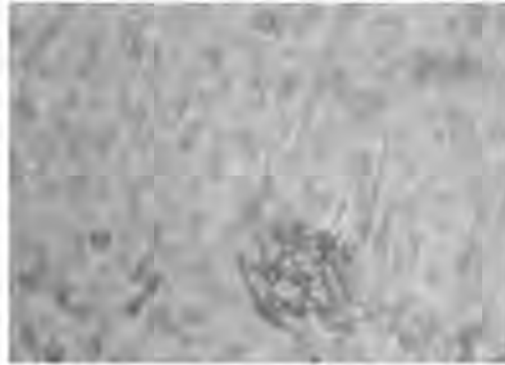
*Mycobacterium tuberculosis* yang digunakan adalah *Mycobacterium tuberculosis* H37rv yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga. Koloni *Mycobacterium tuberculosis* diambil dari media Lowenstein Jensen dan diencerkan dalam media cair Middlebrook 7H9 hingga setara dengan estimasi konsentrasi setara  $10^5$  / ml.

Suspensi *Mycobacterium tuberculosis* dengan konsentrasi  $1,5 \times 10^5$  /ml disentrifuge 3500 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Peletnya dibilas dengan PBS steril ,vortex dan sentrifuge lagi pada 3500 rpm 10 menit suhu 4°C. Pelet kemudian diopsonisasi dengan *Fresh pooled human serum* dan PBS (1:1) kemudian dieramkan selama 20 menit dalam inkubator 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5%. Setelah diopsonisasi, pelet dicuci dengan PBS, lalu diresuspensi dengan medium RPMI agar suspensi kuman tersebar rata suspensi dilewatkan melalui jarum tuberkulin.

Kultur makrofag yang telah diaktifasi kemudian dibilas dengan PBS dan medianya diganti. Setelah media diganti kultur diinfeksi dengan *Mycobacterium*

*tuberculosis* sebanyak 200 mikro liter dan diinkubasi selama 1 jam .Kultur dibilas lagi dengan PBS . Setelah kultur dibilas dengan PBS medianya diganti baru.

Adapun hasil pengecatan dengan Ziehl Neelsen pada hasil lisis makrofag tampak pada gambar 5.2.



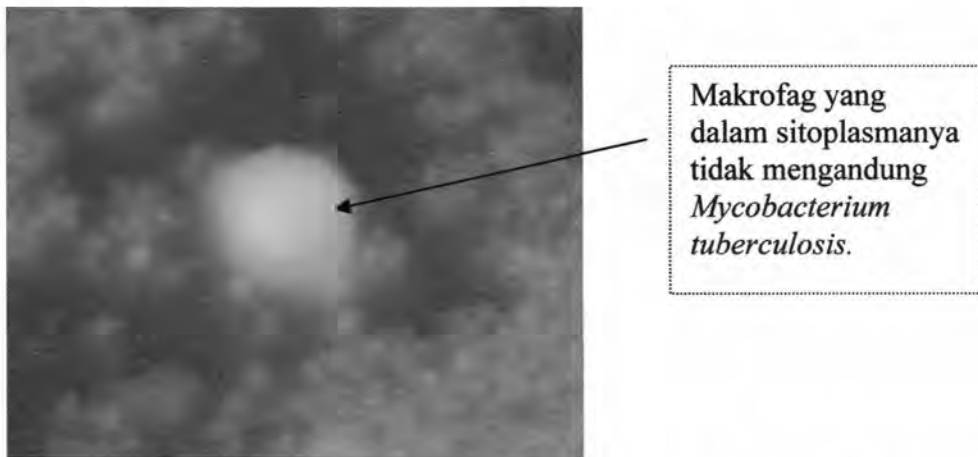
Gambar 5.2 Hasil pengecatan *Mycobacterium tuberculosis* dari lisis makrofag setelah dicuci dengan PBS dengan pengecatan Ziehl Neelsen.

Kultur makrofag yang telah diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* diamati daya bunuh intraselulernya pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam.

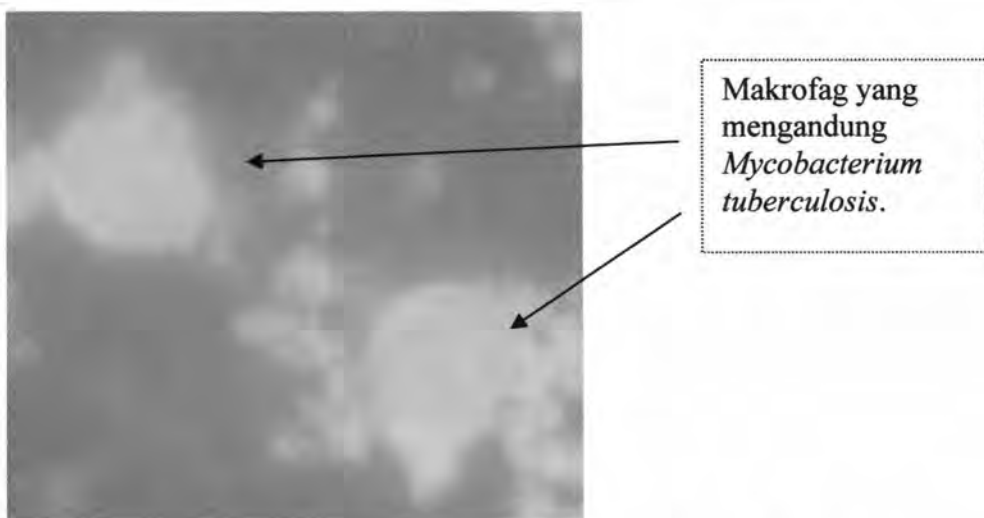
#### **5.1.4 Hasil pengaruh Andrographolide pada Daya Bunuh Intraseluler makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis* pada pengamatan dengan pengecatan Acridine Orange.**

Kultur makrofag baik kelompok eksperimen maupun kelompok kontrol setelah dilakukan infeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* dieramkan selama 1 jam untuk memberi kesempatan fagositosis. Setelah itu semua kultur dibilas dengan PBS . Untuk pengamatan pasca ingesti *coverslip* diambil dan diletakkan dalam obyek gelas dan dicat dengan acridine orange. Untuk pengamatan 24 jam dan 72 jam, kultur dieramkan dalam inkubator pada suhu 37<sup>0</sup>C dan kadar CO<sub>2</sub> 5

% dan dilakukan pengecatan seperti pasca ingesti. Hasil pengecatan dengan Acridine Orange seperti terlihat pada Gambar 5.3 dan 5.4.



Gambar 5.3 Makrofag berwarna hijau yang tidak mengandung *Mycobacterium tuberculosis* dalam sitoplasmanya. Hasil pengecatan dengan Acridine Orange yang diamati menggunakan mikroskop fluorescein.

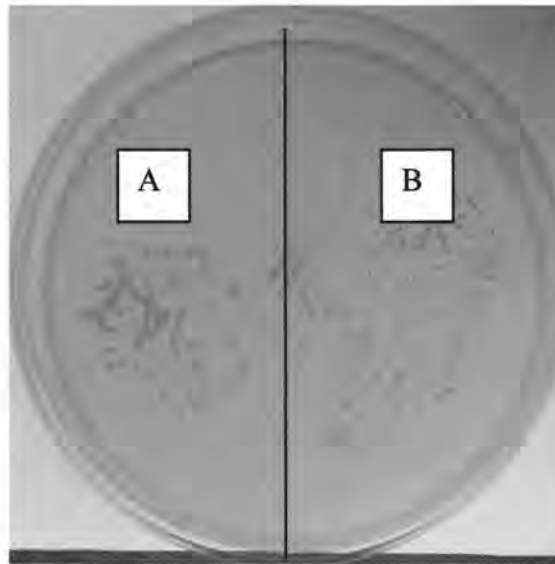


Gambar 5.4 Makrofag berwarna merah yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* dalam sitoplasmanya. Hasil pengecatan dengan Acridine Orange yang diamati menggunakan mikroskop fluorescein.

### 5.1.5 Hasil pengaruh Andrographolide pada Daya Bunuh Intraseluler makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis* pada pengamatan di media padat Middlebrook 7H10.

Kultur makrofag baik kelompok eksperimen dan kelompok kontrol setelah dilakukan infeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* dieramkan selama 1 jam

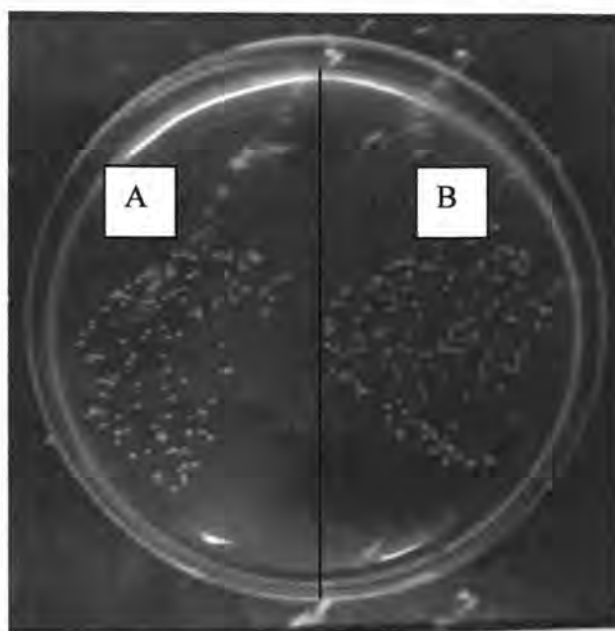
untuk memberi kesempatan fagositosis. Kemudian semua kultur dibilas dengan PBS . Setelah dilakukan lisis sel kemudian dikultur pada media Middlebrook 7H10. Pertumbuhan koloni karakteristik setelah 7 hari dalam media Middlebrook 7H10 tampak pada gambar 5.5.



**Gambar 5.5** Tampak koloni *Mycobacterium tuberculosis* hasil kultur makrofag yang dilisis langsung setelah diinfeksi pada media agar padat Middlebrook 7H10 . A kelompok eksperimen dan B adalah kelompok kontrol. Tampak jumlah koloni kelompok eksperimen lebih sedikit dibanding kelompok kontrol.

Gambar 5.5 menunjukkan hasil kultur lisis makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pada media agar padat Middlebrook 7H10 langsung setelah diinfeksi. Bagian kiri (A) merupakan pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang berasal dari kultur lisis makrofag kelompok eksperimen (dengan Andrographolide) lebih sedikit dibandingkan jumlah pertumbuhan koloni pada bagian kanan (B) yang berasal dari makrofag kelompok kontrol (tanpa Andrographolide).

Adapun pertumbuhan koloni karakteristik setelah 7 hari dalam media Middlebrook 7H10 setelah waktu inkubasi 24 untuk memberi kesempatan bekerjanya daya bunuh intraseluler makrofag tampak pada gambar 5.6.



Gambar 5.6. Tampak koloni *Mycobacterium tuberculosis* hasil kultur makrofag yang dilisis setelah waktu inkubasi 24 jam untuk memberi kesempatan daya bunuh intraseluler pada media padat Middlebrook 7H10 . A kelompok eksperimen dan B adalah kelompok kontrol. Tampak jumlah koloni kelompok eksperimen lebih sedikit dibanding kelompok kontrol.

Gambar 5.6 menunjukkan hasil kultur setelah daya bunuh intraseluler selama 24 jam. Bagian kiri (A) merupakan pertumbuhan koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang berasal dari kultur makrofag kelompok eksperimen (dengan Andrographolide) tampak lebih sedikit dibandingkan jumlah pertumbuhan koloni bagian kanan (B) yang berasal dari makrofag kelompok kontrol (tanpa Andrographolide).



### 5.1.6 Hasil pengaruh Andrographolide pada Daya Bunuh Intraseluler makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan menghitung makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis*.

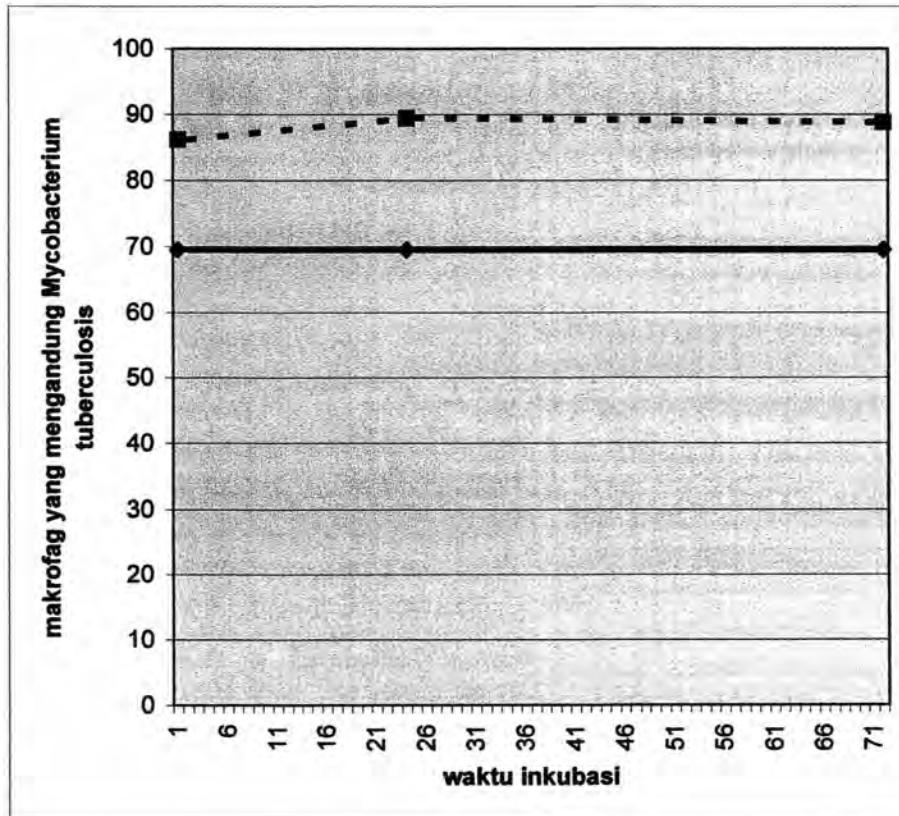
Hasil perhitungan makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* dengan pengecatan Acridine Orange tertera pada Tabel 5.1

Tabel. 5.1 Rerata % makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* dengan pengecatan Acridine Orange antara kelompok eksperimen dan kelompok kontrol, pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam.

Ulangan	Rerata % makrofag yang mengandung <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pasca ingesti		Rerata % makrofag yang mengandung <i>Mycobacterium tuberculosis</i> waktu inkubasi 24 jam*		Rerata % makrofag yang mengandung <i>Mycobacterium tuberculosis</i> waktu inkubasi 72 jam*	
	Kel. Eksp.	Kel. Kontrol	Kel. Eksp	Kel. Kontrol	Kel. Eksp	Kel. Kontrol
1	90	70	94	70	94	72
2	87	71	90	69	90	70
3	89	73	90	75	91	74
4	89	72	93	70	92	70
5	92	71	94	72	91	70
6	70	60	76	61	75	61
mean	86,2	69,5	89,5	69,5	88,83	69

Tanda (\*) menunjukkan waktu inkubasi untuk memberi kesempatan proses daya bunuh intraseluler.

Dari Tabel 5.1 dapat dibuat grafik seperti tampak pada Gambar 5.8.



Gambar 5.8 Grafik pengaruh Andrographolide pada uji daya bunuh intraseluler makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis* berdasar data rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam.

Keterangan : Garis merah putus-putus adalah kelompok eksperimen (dengan Andrographolide)  
Garis hitam adalah kelompok kontrol (tanpa Andrographolide).

Dari Tabel 5.1 makrofag yang dicat pasca ingesti pada kelompok eksperimen (dengan Andrographolide) didapatkan rerata % makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* sebanyak 86,2 % dan kelompok kontrol (tanpa Andrographolide) 69,5 %. Dari pengamatan pasca ingesti rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* pada kelompok eksperimen lebih banyak dibanding kelompok kontrol, artinya jumlah makrofag yang

memfagositosis *Mycobacterium tuberculosis* ternyata lebih besar pada kultur makrofag yang distimulasi dengan imunomodulator Andrographolide.

Setelah inkubasi 24 jam didapatkan rerata % makrofag pada kelompok eksperimen (dengan Andrographolide) 89,5 % dan kelompok kontrol (tanpa Andrographolide) 69,5 %. Dari pengamatan 24 jam inkubasi rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* kelompok eksperimen lebih besar dibanding kelompok kontrol, artinya jumlah makrofag yang memfagositosis *Mycobacterium tuberculosis* ternyata lebih besar pada kultur makrofag yang distimulasi dengan imunomodulator Andrographolide.

Rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* pada kelompok eksperimen waktu inkubasi 24 jam (kesempatan daya bunuh intraseluler) 89,5 %, lebih besar dibanding rerata pasca ingesti 86,2 %. Sedangkan pada kelompok kontrol pasca ingesti sama dengan kelompok kontrol waktu inkubasi 24 jam. Dapat disimpulkan bahwa kemampuan memfagositosis pada kelompok eksperimen meningkat setelah waktu inkubasi 24 jam.

Setelah inkubasi 72 jam didapatkan rerata prosentase makrofag pada kelompok eksperimen (dengan Andrographolide) 88,3 % dan kelompok kontrol (tanpa Andrographolide) 69,5 %. Dari pengamatan 72 jam inkubasi rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* kelompok eksperimen lebih besar dibanding kelompok kontrol, artinya jumlah makrofag yang memfagositosis *Mycobacterium tuberculosis* ternyata lebih besar pada kultur makrofag yang distimulasi dengan imunomodulator Andrographolide.

Rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* pada kelompok eksperimen waktu inkubasi 72 jam 88,83 %, lebih kecil dibanding

rerata pada waktu inkubasi 24 jam (segera setelah ingesti) 89,5 %. Pada kelompok kontrol waktu inkubasi 72 jam sama dengan kelompok kontrol waktu inkubasi 24 jam.

Dari Gambar 5.8 terlihat bahwa rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam pada kelompok eksperimen lebih besar daripada kelompok kontrol. Pada kelompok eksperimen (dengan Andrographolide) dengan bertambahnya waktu inkubasi tampak ada sedikit peningkatan rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis*.

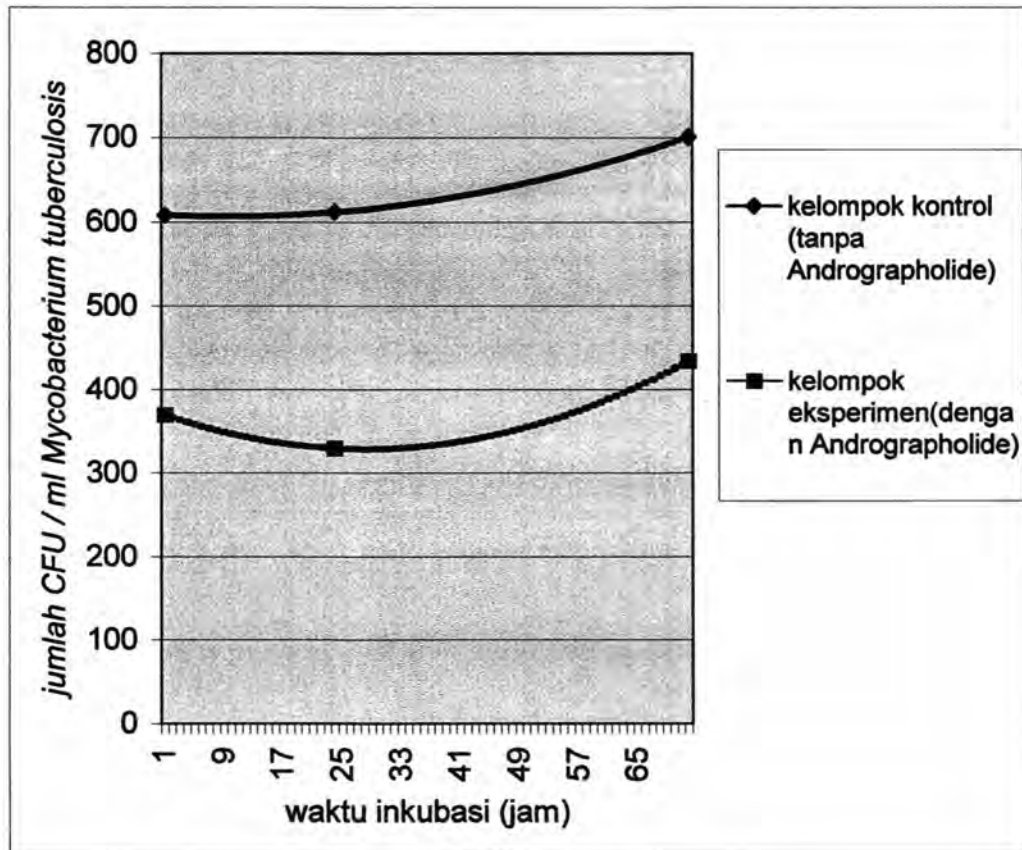
#### 5.1.7 Hasil pengaruh Andrographolide pada Daya Bunuh Intraseluler makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan metode CFU/ml.

Hasil perhitungan CFU / ml *Mycobacterium tuberculosis* yang masih dapat tumbuh pada media Middlebrook 7H10 tertera pada Tabel 5.2.

Tabel. 5.2 Rerata CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* yang tumbuh di media Middlebrook 7H10 hasil lisis makrofag pasca ingesti, setelah inkubasi 24 jam dan 72 jam.

Ulangan	Rerata CFU / ml <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pasca ingesti		Rerata CFU / ml <i>Mycobacterium tuberculosis</i> waktu inkubasi 24 jam		Rerata CFU / ml <i>Mycobacterium tuberculosis</i> waktu inkubasi 72 jam	
	Kel. Eksp.	Kel. Kontrol	Kel. Eksp	Kel. Kontrol	Kel. Eksp	Kel. Kontrol
1	365	602,5	322,5	615	390	655
2	375	605	332,5	617,5	447,5	740
3	367,5	617,5	332,5	602,5	465	707,5
mean	369,17	608,33	329,17	611,67	434,17	700,83

Dari Tabel 5.2 dapat dibuat grafik seperti tampak pada Gambar 5.9.



Gambar 5.9 Grafik pengaruh Andrographolide pada uji daya bunuh intraseluler makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis* berdasar data rerata jumlah CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat tumbuh pada media Middlebrook 7H10 pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam.

Dari Tabel 5.2 dan pasca ingesti didapatkan rerata jumlah CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* pada kelompok eksperimen (dengan Andrographolide) 369,17 dan kelompok kontrol (tanpa Andrographolide) 608,83. Dari pengamatan pasca ingesti rerata CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* kelompok eksperimen lebih kecil dibanding kelompok kontrol. Dari pengamatan pasca ingesti, CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* kelompok eksperimen lebih

kecil dibanding kelompok kontrol artinya daya bunuh intraseluler makrofag meningkat setelah distimulasi dengan imunomodulator Andrographolide.

Setelah inkubasi 24 jam didapatkan rerata CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* kelompok eksperimen (dengan Andrographolide) 329,17 dan kelompok kontrol (tanpa Andrographolide) 611,67. Dari pengamatan 24 jam waktu inkubasi (waktu untuk kesempatan daya bunuh intraseluler) rerata jumlah CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* kelompok eksperimen lebih kecil dibanding kelompok kontrol artinya daya bunuh intraseluler makrofag meningkat setelah distimulasi dengan imunomodulator Andrographolide.

Rerata jumlah CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* pada kelompok eksperimen waktu inkubasi 24 jam (kesempatan daya bunuh intraseluler) 329,17, ada penurunan dibanding rerata pasca ingesti 369,17. Pada kelompok kontrol pada inkubasi 24 jam rerata jumlah CFU/ml 611,67 sedikit bertambah dibanding dengan kelompok kontrol dengan rerata CFU/ml 608,33. Dapat disimpulkan bahwa kemampuan daya bunuh intraseluler makrofag setelah distimulasi dengan Andrographolide meningkat setelah inkubasi 24 jam .

Setelah inkubasi 72 jam didapatkan rerata CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* pada kelompok eksperimen (dengan Andrographolide) 434,17 dan kelompok kontrol (tanpa Andrographolide) 700,83. Dari pengamatan 72 jam inkubasi rerata jumlah CFU/ml *Mycobacterium tuberculsis* kelompok eksperimen lebih kecil dibanding kelompok kontrol, artinya kemampuan daya bunuh intraseluler makrofag meningkat setelah distimulasi dengan imunomodulator Andrographolide.

Rerata CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* pada kelompok eksperimen waktu inkubasi 72 jam (kesempatan daya bunuh intraseluler) 434,17 CFU/ml, lebih besar dibanding rerata pada waktu inkubasi 24 jam 329,17 CFU/ml. Pada kelompok kontrol waktu inkubasi 72 jam reratanya 707,5 CFU/ml, lebih besar jika dibanding dengan kelompok kontrol waktu inkubasi 24 jam dengan rerata 602,5 CFU/ml. Pada pengamatan waktu inkubasi 72 jam didapatkan rerata pada kelompok eksperimen 434,17 CFU/ml, angka tersebut lebih tinggi dibanding makrofag kelompok eksperimen waktu inkubasi 24 jam dengan rerata 329,17 CFU / ml . Hal tersebut berarti pada inkubasi 72 jam, daya bunuh intraseluler makrofag yang diaktifasi dengan Andrographolide dan yang tidak diaktifasi dengan Andrographolide mulai menurun tetapi daya bunuh intraseluler makrofag yang diaktifasi dengan Anadrographolide tetap lebih besar daripada makrofag yang tidak diaktifasi dengan Andrographolide.

Dari Gambar 5.9 terlihat bahwa rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam pada kelompok eksperimen lebih besar daripada kelompok kontrol. Pada kelompok eksperimen (dengan Andrographolide) dengan bertambahnya waktu inkubasi tampak ada sedikit peningkatan rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis*.

## 5.2 Analisis Statistik

Hasil analisis statistik menggunakan uji statistik *Univariate Analysis of Variance* dengan uji F pada taraf nyata 5 % dan dilanjutkan dengan uji HSD menggunakan SPSS for Windows rel. 13 tampak pada tabel 5.3 dan 5.4

Tabel. 5.3 Rerata % makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* pada pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam antara kelompok eksperimen dibanding kelompok kontrol.

Waktu inkubasi	Trial	Mean	Standard deviasi	N	Nilai p	
Pasca ingesti	Kontrol	69,50	4,76	6	p=0,000	p=0,771
	Eksperimen	86,17	8,08	6		
24 jam	Kontrol	69,50	4,68	6	p=0,000	
	Eksperimen	89,50	6,86	6		
72 jam	Kontrol	69,50	4,46	6	p=0,000	
	Eksperimen	88,83	6,91	6		
Total	Kontrol	69,50	4,35	18		
	Eksperimen	88,17	7,02	18		

Pada uji pengaruh Andrographolide pada daya bunuh intraseluler makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis* antara kelompok eksperimen (dengan andrographolide) dan kelompok kontrol (tanpa andrographolide) pada pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam digunakan ( $p < 0,005$ ), hasilnya lebih kecil berarti pada pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam, kemampuan makrofag memfagositosis *Mycobacterium tuberculosis* pada kultur makrofag yang distimulasi dengan imunomodulator Andrographolide lebih tinggi daripada makrofag yang tidak distimulasi dengan Andrographolide.

Tabel. 5.4 Rerata CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* yang tumbuh di media Middlebrook 7H10 hasil lisis makrofag pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam antara kelompok eksperimen dibanding kelompok kontrol.



Waktu inkubasi	Trial	Mean	Standard deviasi	N	Nilai P	
Pasca ingesti	Kontrol	608,33	8,03	3	p=0,000	P=0,331
	Eksperimen	369,16	5,20	3		
24 jam	Kontrol	611,66	8,03	3	p=0,000	
	Eksperimen	329,16	5,77	3		
72 jam	Kontrol	700,83	42,89	3	p=0,000	
	Eksperimen	434,16	39,23	3		
Total	Kontrol	640,27	50,56	9		
	Eksperimen	377,50	50,06	9		

Pada uji pengaruh Andrographolide pada daya bunuh intraseluler makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis* antara kelompok eksperimen (dengan andrographolide) dan kelompok kontrol (tanpa andrographolide) pada pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam digunakan ( $p < 0,005$ ), hasilnya lebih kecil berarti pada pasca ingesti, waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam, daya bunuh intraseluler makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis* pada kultur makrofag yang distimulasi dengan imunomodulator Andrographolide lebih tinggi dibanding dengan kultur makrofag yang tidak distimulasi dengan Andrographolide. Apabila rerata CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* antara kelompok eksperimen pasca ingesti, dibanding dengan waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam digunakan ( $p < 0,005$ ) hasilnya lebih besar berarti tidak ada interaksi hal tersebut dapat disimpulkan bahwa waktu untuk membunuh *Mycobacterium tuberculosis* antara kelompok eksperimen dan kelompok kontrol tidak berbeda.