

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian kuantitatif yang bersifat eksperimental. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Prodi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Daun bayam hijau (*A. hybridus* L.) di ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol selama 72 jam lalu dilakukan penyaringan. Filtrat yang didapatkan kemudian diuapkan dengan kompor listrik sehingga didapat ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak kental diuji dengan menggunakan beberapa uji yaitu uji organoleptik, uji fitokimia menggunakan pereaksi, identifikasi senyawa fenolik dengan KLT, penentuan kadar fenolik total sampel, dan uji peredaman radikal bebas untuk mengetahui nilai IC_{50} yang diamati pada spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 516 nm.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2022, yang bertempat di Laboratorium Kimia Prodi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

C. Populasi Sampel

1. Populasi

Daun bayam hijau (*A. hybridus* L.) yang diambil dari petani di Desa Berdaya Candibinangun, Kecamatan Pakem, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

2. Sampel

Sampel uji adalah bagian daun berupa daun hijau tua dengan kriteria berwarna hijau tua yang masih segar (urutan kedua hingga keempat) tidak layu dan tidak busuk (Sungkawa & Sugito, 2019) dan memiliki ukuran yang

sama (Lebar \pm 0,5-3,2 cm dan panjang 1,5-6,0 cm) dengan usia panen 21 hari sampai 1 bulan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel utama
 - a. Variabel bebas: ekstrak daun bayam hijau (*A. hybridus* L.) dengan menggunakan pelarut metanol.
 - b. Variabel terikat: kadar total senyawa fenolik, nilai *Inhibitory Concentration* IC₅₀ aktivitas peredaman radikal bebas pada ekstrak metanol daun bayam hijau.
2. Variabel pengacu
 - a. Variabel terkontrol: waktu panen, waktu pengambilan sampel tanaman, waktu pengeringan.
 - b. Variabel tak terkontrol: suhu, kelembapan dan cuaca lingkungan

E. Definisi Operasional

1. Sampel daun bayam hijau yang digunakan adalah daun berwarna hijau tua diambil pada pagi hari pukul 08.00-12.00 WIB dengan waktu panen sekitar 21 hari sampai 1 bulan. Daun bayam hijau didapat dari petani Desa Berdaya Candibinangun, Kecamatan Pakem, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.
2. Daun bayam hijau yang berwarna hijau tua memiliki senyawa metabolit sekunder sebagai aktivitas antioksidan karena mengandung fenol, beta-karoten, likopen, antosianin, flavonid, saponin dan tanin.
3. Kadar fenolik total yang didapatkan dari jumlah total kandungan senyawa fenolik yang terdapat pada ekstrak metanol daun bayam hijau yang diukur dengan panjang gelombang maksimum (nm).
4. *Inhibitory concentration* (IC₅₀) yaitu nilai ekstrak metanol daun bayam hijau yang mampu menangkap radikal DPPH sebesar 50%.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Toples maserasi, wajan, ayakan 40 mesh, batang pengaduk, gelas beaker (*pyrex*), botol semprot, *grinder* (*Fomac*), corong *buchner*, cawan petri, gunting, kompor listrik, erlenmeyer (*pyrex*), gelas ukur (*pyrex*), *hotplate*, kaca arloji, labu ukur (*pyrex*), lemari asam, mikropipet (*Eppendorf*), *moisture content balance*, timbangan analitik (*Ohaus*), oven, pipet tetes, pipet ukur (*pyrex*), pompa vakum, lemari asam, propipet, bejana KLT, sendok tanduk, spatula, rak tabung reaksi, spatel kayu, spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis*), tabung reaksi (*Iwaki*), termometer, *vortex* (*Ohaus*).

2. Bahan

Aquadest, AlCl_3 , aluminium foil, air panas, asam asetat, HCl pekat, blue tip, white tip, etanol *p.a.*, eter, FeCl_3 , kain, kertas saring, metanol teknis, metanol *p.a.*, kloroform, n-heksan, natrium karbonat 7%, n-butanol, pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, pereaksi wagner, plat silika gel GF₂₅₄ (*Gypsum fluoresens 254*) (*Merck Germany*), reagen *Folin-Fiocalteu*, serbuk magnesium, simplisia daun bayam hijau, vitamin C, asam galat (*Sigma-aldrich*), standar DPPH *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (*Himedia*), kuersetin (*Sigma-aldrich*)

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan Bahan dan Determinasi Tanaman

Daun bayam hijau (*A. hybridus* L.) yang diambil dari petani Desa Berdaya Candibinangun, Kecamatan Pakem, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Daun bayam hijau diambil pada bulan Juli 2022 dengan kriteria sampel yaitu daun yang segar (urutan ke-dua sampai empat karena menurut penelitian pada urutan ke-2 sampai 4 daunnya sudah cukup tua sehingga lebih banyak mengandung antioksidan seperti (fenol, flavonoid, tanin) berwarna hijau tua, tidak layu dan tidak busuk (Sungkawa & Sugito, 2019). Tanaman daun bayam hijau kemudian determinasi di Laboratorium Pembelajaran Biologi Fakultas Terapan dan Teknologi

Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Determinasi bertujuan untuk mendapatkan kebenaran identitas dari tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan utama dalam penelitian (Diniatik, 2015).

2. Penyiapan Simplisia

Sampel daun bayam hijau yang telah diperoleh disortasi basah untuk memisahkan pengotor yang menempel pada sampel, lalu dicuci bersih menggunakan air mengalir, selanjutnya dikeringkan daun bayam hijau menggunakan oven dengan suhu 45°C. Alasan penggunaan suhu 45°C karena zat aktif (fenolik) dari sampel daun bayam hijau dapat bertahan pada suhu tersebut. Daun kering ditandai dengan mudah rapuh saat digenggam, pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air terikat pada sampel yang dapat menghambat penarikan zat aktif, banyaknya kadar air yang terkandung dalam sampel dapat menyebabkan rusaknya sampel karena terdapat jamur. Daun bayam hijau yang telah kering kemudian ditimbang dan dihaluskan menggunakan *grinder* dengan tujuannya adalah untuk mempermudah proses ekstraksi/pemisahan bahan aktif oleh pelarut yang terdapat dalam sel tumbuhan, selanjutnya diayak dengan saringan ukuran 40 mesh (Guntarti & Ruliyani, 2020). Pengayakan dilakukan agar memperoleh ukuran partikel yang sama atau seragam dan juga untuk memperbesar kontak dengan pelarut.

3. Ekstraksi Sampel

Proses ekstraksi sampel serbuk simplisia daun bayam hijau dilakukan dengan metode maserasi. Diambil serbuk sebanyak 250 gram lalu masukkan dalam wadah maserasi, dan tambahkan dengan pelarut metanol 2,5 liter dengan perbandingan 1:10 sampai semua sampel terendam, kemudian diamkan selama 72 jam sambil dilakukan pengadukan (setiap 6 jam sekali diaduk selama 5 menit) dan simpan ditempat yang gelap atau terhindar dari sinar langsung dengan tujuan untuk mencegah kerusakan perubahan warna akibat adanya dikatalisasi oleh cahaya. Hasil maserasi kemudian disaring dengan tujuan memisahkan ampas dengan filtrat. Kemudian diremaserasi dan didiamkan kurang lebih 2 hari (Nurhaeni *et al.*, 2014), bertujuan untuk

menarik kandungan pada senyawa yang masih tertinggal pada maserasi pertama. Kemudian dipekatkan dengan cara diuapkan menggunakan kompor listrik pada suhu 45°C hingga diperoleh ekstrak kental, penggunaan suhu 45°C dimaksudkan agar zat aktif senyawa fenolik yang terdapat didalam sampel tidak rusak (Guntarti & Ruliyani, 2020). Setelah itu, ekstrak kental ditimbang dan nilai rendemennya dihitung menggunakan rumus:

$$\%Rendemen = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat serbuk simplisia}} \times 100\%$$

4. Uji Kelembapan

Ditimbang simplisia kering daun bayam hijau sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam *moisture content balance* yang bertujuan untuk mengetahui kadar kelembapan pada ekstrak yang digunakan (Trinovita, Y *et al.*, 2019).

5. Uji Organoleptik

Dilakukan dengan pengamatan fisik yaitu dengan mengamati warna sampel, rasa, aroma/bau, dan tekstur yang tujuan untuk mengidentifikasi ciri khas dari ekstrak daun bayam hijau.

6. Skrining Fitokimia

Uji skrining fitokimia digunakan untuk menentukan keberadaan metabolit sekunder dalam ekstrak metanol daun bayam hijau. Di bawah ini adalah beberapa metabolit sekunder yang dilakukan dalam uji skrining fitokimia:

- a. Uji alkaloid. Dilakukan tiga kali pengujian dengan menggunakan pereaksi yang berbeda yaitu pereaksi *wagner*, pereaksi *mayer*, dan pereaksi *dragendorf*. Ekstrak diambil sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan dalam 5 mL HCl pekat yang dibagi menjadi tiga bagian pada plat tetes, kemudian ditambahkan 5-7 tetes reagen *wagner*, *mayer*, *dragendorf* pada masing-masing tabung sampai menunjukkan perubahan warna. Hasil dari uji *wagner* yaitu perubahan warna menjadi coklat kemerahan, uji *mayer* berupa endapan putih, dan uji *dragendorf* terbentuk endapan jingga (Nurjanah L., 2021).

- b. Uji fenolik. Diambil 2 mg ekstrak di masukkan dalam gelas beaker, lalu dilarutkan dengan 1 mL eter. Setelah itu, diambil lapisan eter lalu ditempatkan di atas plat tetes kemudian ditambah dengan 2-3 tetes FeCl_3 sehingga terjadi perubahan warna hijau kehitaman yang menunjukkan adanya senyawa fenolik (Djuleng A *et al.*, 2021).
 - c. Uji flavonoid. Diambil 2 mg sampel ekstrak, tambahkan air panas sebanyak 1-2 mL dan masukkan serbuk magnesium 2 mg, kemudian homogenkan. Ditambahkan HCl pekat 4-5 tetes dan etanol 4-5 tetes lalu kocok hingga merata. Jika terjadi perubahan warna merah, orange atau kuning positif mengandung flavonoid (Djuleng A *et al.*, 2021).
 - d. Uji saponin. Diambil 5 mg gram ekstrak dicampur dengan 5 mL aquadest dan kocok kuat hingga membentuk busa atau buih (Purwasari F *et al.*, 2021).
 - e. Uji tanin. Diambil 2 mg ekstrak lalu ditambahkan dengan FeCl_3 2-3 tetes lalu apabila terbentuk warna hijau/biru kehitaman menandakan positif mengandung tanin (Purwasari F *et al.*, 2021).
7. Identifikasi Senyawa fenolik Dengan KLT
- a. Penjenuhan bejana

Fase gerak dibuat menggunakan beberapa kali optimasi hingga diperoleh pelarut yang baik proses elusinya yaitu metanol: kloroform: aquadest pada perbandingan (1 mL; 9 mL; 1 mL) lalu diikuti dengan memasukan kertas saring kira-kira berukuran 18 cm ke dalam bejana dan ditutup rapat. Bejana berisi fase gerak yang telah jenuh dapat dilihat dari kertas saring yang terelusi fase gerak yang menandakan bahwa bejana telah jenuh.
 - b. Pembuatan larutan uji

Ditimbang ekstrak daun bayam hijau sebanyak 50 mg dilarutkan menggunakan metanol *p.a* 1 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 50.000 ppm, kemudian divortex hingga homogen. Digunakan standar kuersetin konsentrasi 2.000 ppm (2 mg/1 mL metanol

p.a) sebagai pembanding pada uji KLT ekstrak metanol daun bayam hijau.

c. Prosedur KLT

Uji kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ 10 x 2 cm, dengan garis tanda sekitar 1 cm di bagian atas dan bawah plat. Lalu fase diam di oven kurang lebih selama 3 menit pada suhu 100°C dengan tujuan mengurangi kadar air pada plat. Fase diam yang telah ditotolkan ekstrak daun bayam hijau dan standar kuersetin lalu dimasukkan dalam bejana yang sebelumnya sudah dijenuhkan dan ditutup kemudian ditunggu hingga terelusi (\pm 20 menit). Lalu plat (fase diam) diangin-anginkan pada suhu ruang. Diamati bercak kromatogram (noda) pada sinar ultraviolet panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya disemprotkan dengan menggunakan AlCl₃ dan diamati kembali. Bercak fluoresensi warna kuning menunjukkan adanya fenol/flavonoid. Dihitung nilai Rf plat KLT (Annegowda *et al.*, 2012).

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh solut}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

8. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Daun Bayam Hijau

Pengukuran kadar fenol total menggunakan metode *Folin-Ciocalteu*. Hal ini didasarkan pada metode (Chun *et al.*, 2003) dalam (Djuleng A *et al.*, 2021) dengan menggunakan asam galat sebagai standar.

a. Pembuatan larutan standar asam galat

Ditimbang 5 mg asam galat dilarutkan dalam metanol *p.a* 10 mL dengan diperoleh konsentrasasi 500 ppm. Selanjutnya diambil larutan stok 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; dan 0,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL lalu di ad dengan metanol *p.a* sehingga diperoleh konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm.

b. Penentuan Panjang gelombang maksimum (λ maks)

Diambil reagen *Folin-Ciocalteu* 0,1 mL, ditambahkan dengan larutan asam galat 0,1 mL (konsentrasi 30 ppm), larutan natrium karbonat 7% 1 mL dan di ad aquadest 5 mL lalu di *scanning* pada panjang

gelombang maksimum 600-800 nm. Tujuan dilakukan penentuan panjang λ maks agar dapat mengetahui kepekaan sampel pada nilai absorbansi yang maksimal/optimum.

c. Penentuan waktu (OT)

Diambil 0,1 mL larutan standar stok (konsentrasi 30 ppm) dan tambahkan 0,1 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, 1 mL natrium bikarbonat 7%, dan aquadest ad 5 mL. Lalu di *scanning* menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada waktu 0-2 jam dengan selang waktu 2 menit sampai diperoleh waktu pengukuran maksimum larutan telah selesai bereaksi yang ditandai dengan nilai absorbansi yang stabil. *Operating time* dimaksudkan untuk menentukan waktu pengukuran ketika larutan telah bereaksi sempurna atau ketika reaksi telah selesai, yang ditandai dengan nilai absorbansi yang stabil, untuk memaksimalkan pengukuran.

d. Pembuatan kurva baku standar asam galat

Diambil 0,1 mL masing-masing konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm, kemudian ditambahkan 0,1 mL pereaksi *Folin-Ciocalteu*, kocok, dan diamkan selama kurang lebih 4 menit, kemudian tambahkan 1 mL natrium karbonat 7% dan kocok sampai homogen. Lalu tambahkan aquadest ad 5 mL dan biarkan selama 60 menit pada suhu ruang. Kemudian lakukan pengukuran absorbansi panjang gelombang 748 nm. Dilakukan 3 kali replikasi.

e. Penetapan kadar fenolik total

Diambil sampel 40 mg dilarutkan 10 mL metanol *p.a.* Lalu diambil 0,1 mL, tambahkan 0,1 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, kocok dan diamkan selama kurang lebih 4 menit, kemudian dihomogenkan dengan 1 mL larutan natrium karbonat 7% dan aquadest ad 5 mL dikocok homogen. Diamkan selama 60 menit pada suhu ruang. Lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 748 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Dilakukan 3 kali replikasi.

9. Uji Peredaman Radikal Bebas DPPH (*1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil*)

a. Pembuatan larutan DPPH (0,1 mM)

Dibuat larutan DPPH (BM 394,32) dengan ditimbang sebanyak 3,9 gram dan larutkan menggunakan 100 mL metanol *p.a* dalam labu ukur dan di ad sampai tanda batas (Fauzi *et al.*, 2021).

b. Pembuatan kurva baku standar vitamin C

1) Larutan induk dengan konsentrasi 10 ppm dibuat dengan menimbang 1 mg vitamin C dilarutkan dalam 100 mL metanol dan dihomogenkan.

2) Dibuat larutan seri kadar konsentrasi yaitu disiapkan larutan vitamin C pada konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 ppm. Kemudian diambil menggunakan mikropipet, pindahkan larutan induk dalam labu ukur 5 mL yang masing-masing berisi 20, 40, 60, atau 80 μ L, dan ad 5 mL metanol *p.a* ke masing-masing tabung, dihomogenkan (Wulandari *et al.*, 2015).

c. Penentuan panjang gelombang maksimum dan *operating time*

Diambil sebanyak 3 mL larutan DPPH dan dimasukkan dalam kuvet yang bersamaan dengan metanol *p.a* (blanko). Kuvet tersebut kemudian ditempatkan kedalam spektrofotometer UV-Vis dan dilakukan skrining pada panjang gelombang 400 nm hingga 600 nm (rentang serapan \pm 0,2-0,8) dengan interval waktu 5 menit. Penentuan panjang gelombang bertujuan untuk mengetahui nilai serapan yang optimal pada larutan DPPH (Fauzi *et al.*, 2021).

Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui waktu stabil reaksi radikal bebas DPPH. Diambil larutan vitamin C 50 μ L, ditambahkan larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 4.000 μ L, lalu di *scanning* absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan waktu 0-40 menit pada interval 5 menit, dibaca nilai absorbansi maksimum dengan panjang gelombang 516 nm (Fauzi *et al.*, 2021).

d. Pembuatan presisi standar vitamin C. Dibuat dengan mengambil 4 mL larutan vitamin C (konsentrasi 8 ppm) lalu di ad dengan metanol *p.a*

dalam labu ukur 5 mL dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm, dilakukan 6 kali replikasi. Uji presisi bertujuan untuk mengukur kedekatan antara hasil pengujian yang satu dengan yang lainnya dalam rangkaian pengujian yang berulang pada konsentrasi yang sama

e. Pengujian DPPH dan pembanding Vitamin C

Diambil larutan seri vitamin C dari masing-masing konsentrasi 50 μL dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan DPPH sebanyak 4.000 μL , sehingga diperoleh konsentrasi 0,024; 0,049; 0,074; 0,098 ppm. Kemudian ditutup menggunakan aluminium foil dan didiamkan selama 20 menit, lalu diukur serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang diperoleh pada panjang gelombang 516 nm.

f. Persiapan larutan uji ekstrak

- 1) Pembuatan larutan induk (konsentrasi 500 ppm). Ditimbang 5 mg ekstrak daun bayam hijau dan dilarutkan menggunakan metanol *p.a* 10 mL dan dikocok homogen.
- 2) Pembuatan larutan seri. Dibuat larutan ekstrak metanol daun bayam hijau dengan konsentrasi 5, 10, 25, 50, dan 100 ppm. Dipipet larutan induk sebanyak 50 μL , 100 μL , 250 μL , 500 μL , dan 1.000 μL . Dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL dan di ad dengan metanol *p.a* lalu dihomogenkan.
- 3) Pengujian ekstrak dan DPPH.

Diambil larutan sampel ekstrak daun bayam hijau sebanyak 50 μL dari masing-masing konsentrasi dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 4.000 μL DPPH, sehingga diperoleh konsentrasi 0,016; 0,123; 0,308; 0,617; dan 1,123 ppm lalu dikocok homogen. Kemudian diamkan selama 20 menit, lalu di ukur serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 516 nm (Wulandari *et al.*, 2015).

g. Perhitungan nilai konsentrasi IC_{50}

Nilai konsentrasi IC_{50} merupakan laju penghambatan radikal bebas DPPH pada berbagai konsentrasi. Sehingga dapat dinyatakan dalam persamaan regresi linier $y = a + bx$. Nilai y adalah 50 dan nilai x adalah nilai IC_{50} .

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Penentuan Kadar

Penentuan kadar senyawa fenolik total dihitung dengan mensubstitusikan kedalam persamaan regresi linier $y = bx + a$ yang diperoleh dari kurva kalibrasi larutan asam galat yaitu absorbansi vs konsentrasi (ppm). Persamaan regresi linier yang dihitung dengan menggunakan program Microsoft Excel diperoleh berdasarkan persamaan regresi linier standar dari kurva absorbansi (y) vs konsentrasi (x) (Djuleng A *et al.*, 2021).

2. Pengujian DPPH

Uji peredaman radikal bebas dengan metode DPPH. Hal ini ditunjukkan dengan konsentrasi hambat 50% (IC_{50}). Dalam metode DPPH, nilai IC_{50} merupakan konsentrasi sampel yang dapat menangkap 50% radikal bebas. Berikut adalah rumus untuk inhibisi persentase (Ghosal M & Mandal P, 2012).

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Setelah menghitung nilai persen inhibisi, selanjutnya dihitung nilai regresi linier dimana konsentrasi sebagai nilai x dan presentasi aktivitas sebagai nilai y , dari perhitungan regresi linier diperoleh rumus $y = bx + a$. Dimana nilai y diganti menjadi 50 sehingga akan diperoleh nilai x . Dapat diketahui bahwa semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidan.

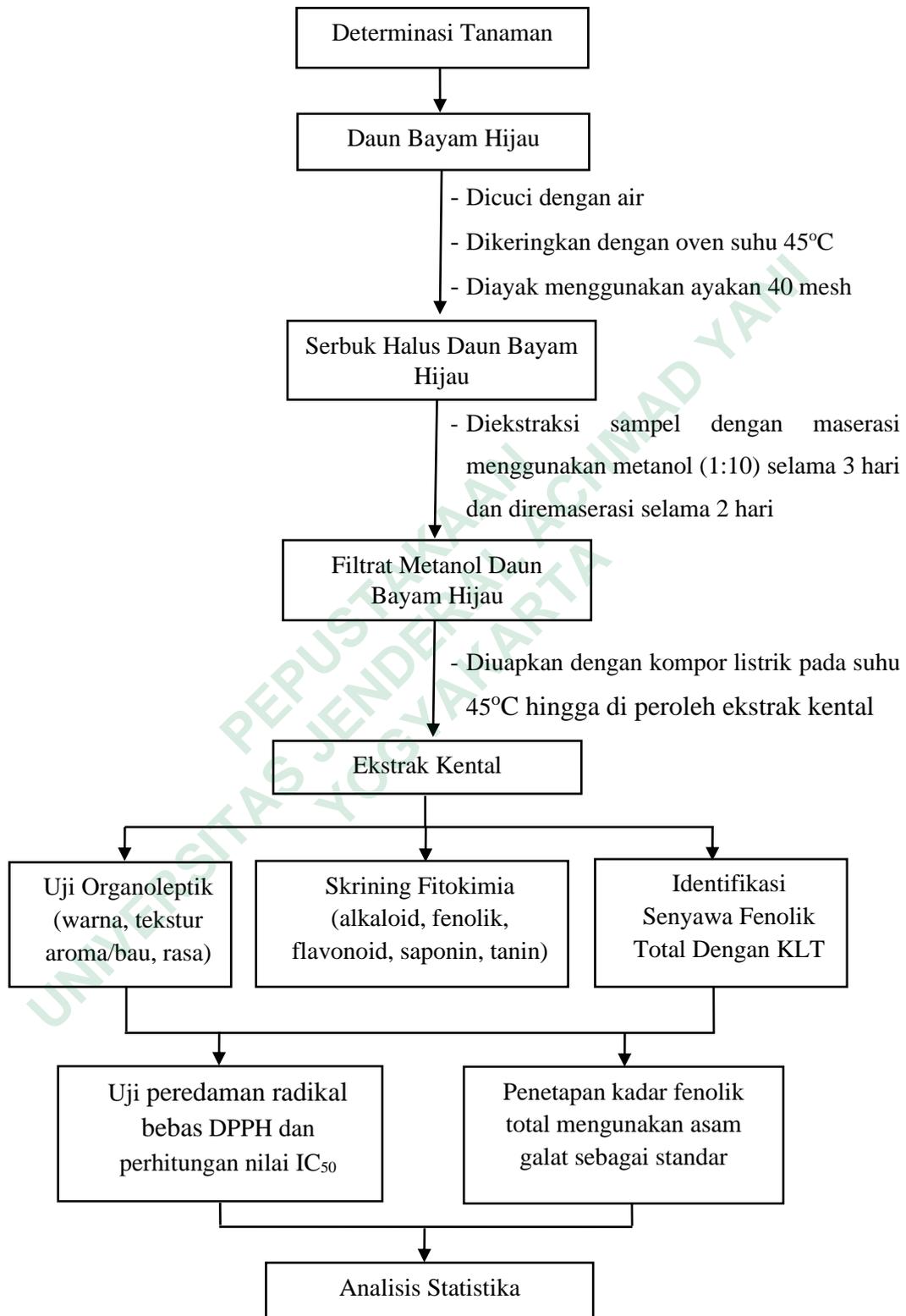
Klasifikasi antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} yaitu sebagai berikut (Rosidah & Tjitraresmi A, 2018).

Tabel 2. Tingkat Kekuatan Antioksidan

Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Antioksidan
< 50	Sangat kuat
50 – 100	Kuat
101 – 250	Sedang
250 – 500	Lemah
> 500	Tidak aktif

3. Analisis Statistika

Analisis data statistik yaitu nilai IC_{50} yang diperoleh dari analisis data yang diuji secara statistik menggunakan software SPSS (*Statistical Analysis Software*) berfungsi untuk mengetahui data yang diperoleh dari distribusi normal dengan melakukan uji normalitas atau homogenitas. Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* digunakan untuk mengidentifikasi suatu variabel acak terdistribusi normal atau tidak, yang dapat dilihat dari nilai IC_{50} ekstrak daun bayam hijau, dimana vitamin C signifikan ($p > 0,05$), menunjukkan bahwa data berdistribusi normal. Uji homogenitas *Levene's test* dilakukan yang bertujuan untuk mengetahui variasi dari beberapa data populasi yang memiliki varian yang sama atau tidak sama. Jika nilai sig < 0,05 berarti data tersebut tidak homogen sedangkan sig > 0,05 artinya data homogen. Kemudian dilakukan uji *T-test Independent* yang berfungsi untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan antara sampel dan standar (Purwasari F *et al.*, 2021).

Bagan Alur Penelitian**Gambar 9. Bagan Alur Penelitian**