

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan yaitu berjenis penelitian eksperimental laboratorium menggunakan metode analisis kuantitatif. Penelitian kuantitatif dilakukan bertujuan untuk mengetahui berapakah nilai aktivitas antioksidan pada sampel. Sampel yang digunakan adalah bunga krisan varietas *lamet* dan *sheena* bagian mahkota bunga. Dipilih bunga yang berumur 125 HST (mekar) serta masih segar dan dipetik pada pagi hari (Hana dkk., 2020). Penelitian ini meliputi pengumpulan bahan tumbuhan, determinasi tumbuhan, persiapan sampel (dilakukan disortasi basah dan kering), pembuatan ekstrak etanol pada sampel, fraksinasi ekstrak etanol pada sampel, uji organoleptik pada ekstrak, uji total kadar senyawa fenolik dan flavonoid dilakukan secara spektrofotometri UV-Vis, uji aktivitas antioksidan menggunakan metode uji radikal bebas DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) yang diukur secara spektrofotometri UV-Vis.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi (S-1) Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu

Waktu dilaksanakan dari bulan April sampai Juli tahun 2022.

C. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah bunga krisan varietas *lamet* dan *sheena* yang diambil dari daerah Kaliwinong, Banyukuning, Bandungan, Semarang, Jawa Tengah pada ketinggian 1073 mdpl. Dipilih bunga krisan yang berumur 125 HST (mekar) serta masih segar dan dipetik pada pagi hari.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah varietas bunga krisan dan pelarut pada fraksinasi.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas senyawa antioksidan yang dilihat dari IC_{50} , kadar total senyawa fenolik dan flavonoid.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah asal tanaman, umur bunga, waktu pengeringan, suhu pengeringan dan pelarut.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Kadar Total Senyawa Fenolik

Penentuan kadar total fenolik dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal (nm) dengan pereaksi *Folin-Ciocalteu*. Standar yang digunakan yaitu menggunakan standar asam galat. Parameter penentuan ini yaitu nilai kadar senyawa fenolik.

2. Kadar Total Senyawa Flavonoid

Penentuan kadar total flavonoid pada ekstrak dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal (nm) dengan pereaksi kompleks $AlCl_3$. Standar yang digunakan yaitu menggunakan standar kuersetin. Parameter penentuan ini yaitu nilai kadar senyawa flavonoid.

3. Antioksidan

Penetapan antioksidan pada ekstrak dilakukan menggunakan metode radikal bebas DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) yang dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal (nm). Standar yang dipakai sebagai pembanding adalah vitamin C. Parameter penentuan ini yaitu berupa nilai IC_{50} .

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Beberapa alat yang akan dipakai antara lain: ayakan 40 mesh, bejana maserasi (toples), blender simplisia, botol ekstrak (vial), cawan porselin (*Pyrex*), corong pisah (*Pyrex*), gelas beaker (*Pyrex*), gelas ukur (*Pyrex*), kaca arloji, kompor listrik, labu ukur (*Pyrex*), lemari asam, *hotplate magnetic stirrer*, mikropipet (*Eppendorf*), *moisture balance*, neraca analitik (Ohaus), *oven*, pipet tetes, pipet ukur (*Pyrex*), propipet, rak tabung reaksi, sendok spatula, seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis, statif klem, tabung reaksi (*Pyrex*), termometer, *vortex mixer* dan *waterbath*.

2. Bahan

Sampel dalam penelitian ini adalah bunga krisan varietas *lamet* dan *sheena* yang diambil dari daerah Kaliwinong, Banyukuning, Bandungan, Semarang, Jawa Tengah. Bahan-bahan yang digunakan yaitu AlCl_3 10%, aluminium foil, *water for injection*, aquades, asam asetat 5%, asam galat, *blue tip*, DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), etanol 70% (teknis), etanol (p.a), etil asetat (p.a), kertas saring, kuersetin, metanol (p.a), Na_2CO_3 7%, n-heksan (p.a), pereaksi *Folin-Ciocalteu*, vitamin C dan *yellow tip*.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan Sampel dan Determinasi Tanaman

Bunga krisan diambil dari perkebunan di daerah Kaliwinong, Banyukuning, Bandungan, Semarang, Jawa Tengah. Determinasi tanaman bunga krisan dilakukan di Laboratorium Sistemika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

2. Persiapan Sampel

Bunga krisan yang telah dipetik, dipilih bunga yang masih bagus dan segar serta dipisahkan dari tangkainya. Ditimbang bunga krisan segar sebanyak 2 kg, kemudian bagian bunga yang digunakan yaitu bagian mahkota bunga. Sampel bunga krisan dibersihkan menggunakan air yang mengalir, guna mengurangi kotoran serta benda asing yang ada pada bagian mahkota bunga.

Bunga krisan ditiriskan untuk mengurangi air dan dirajang menjadi ukuran yang lebih kecil. Lalu, dikeringkan bunga krisan untuk menghilangkan sisa pengotor menggunakan oven pada suhu 50°C selama kurang lebih 72 jam. Simplisia yang sudah kering diukur kadar lembabnya, dikatakan memenuhi standar jika kadar lembabnya tidak lebih dari 10%. Pengukuran kadar lembab dapat dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Maka selanjutnya simplisia dihaluskan menggunakan blender sehingga didapatkan serbuk bunga krisan dan diayak menggunakan ayakan ukuran 40 mesh (Chen dkk., 2021; Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

3. Pembuatan Ekstrak Etanol Bunga Krisan

Metode yang digunakan untuk membuat ekstrak bunga krisan yaitu metode maserasi. Seluruh serbuk simplisia bunga krisan dimasukkan ke dalam toples (bejana maserasi). Pelarut etanol 70% ditambahkan untuk merendam serbuk simplisia bunga krisan hingga sebanyak 10 bagian. Etanol 70% digunakan karena termasuk pelarut yang efektif dalam menarik senyawa flavonoid (Chen dkk., 2021; Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Maserasi dilakukan selama 72 jam sesekali sambil diaduk serta disimpan ditempat gelap atau terhindar dari cahaya langsung dengan cara ditutup wadah menggunakan plastik hitam (Hana dkk., 2020). Hasil maserasi disaring untuk mendapatkan filtrat dan dilakukan remaserasi. Hasil filtrat yang didapatkan digabungkan serta dipekatkan menggunakan penangas pada suhu terkontrol 50-70°C hingga diperoleh ekstrak kental. Hasil ekstrak kental yang didapatkan, dilakukan penimbangan untuk mengetahui hasil rendemennya.

4. Fraksinasi Air, Etil Asetat dan n-Heksan Ekstrak Etanol Bunga Krisan

Fraksinasi air, etil asetat dan n-heksan mengacu dari prosedur Maravirnadita (2019), Irianti dkk. (2019) dan Hasanah dkk. (2017) dengan beberapa modifikasi. Ditimbang ekstrak kental sebanyak 10 gram. Dilarutkan ekstrak menggunakan air dengan suhu 60°C sebanyak 100 mL dan dihomogenkan. Kemudian dilanjutkan fraksinasi secara bertingkat menggunakan corong pisah. Fraksinasi pertama menggunakan n-heksan (2:1 v/v) digojog perlahan selama 5 menit sambil sesekali dibuka tutupnya untuk

mengeluarkan gas yang ada di dalam corong. Lalu, didiamkan campuran tadi hingga membentuk 2 lapisan. Dipisahkan lapisan tersebut ke dalam wadah yang berbeda. Lapisan air/fraksi yang tidak larut n-heksan dimasukkan kembali ke dalam corong pisah sehingga dilakukan refraksinasi sebanyak dua kali dengan jumlah n-heksan yang sama. Selanjutnya, dilakukan prosedur yang sama untuk fraksi etil asetat. Fraksi tidak larut n-heksan difraksinasi menggunakan etil asetat sama banyak. Kemudian, fraksi yang tidak larut dengan etil asetat direfraksinasi sebanyak dua kali dengan jumlah etil asetat yang sama. Hasil filtrat masing-masing fraksi dikumpulkan dan dipekatkan diatas *waterbath* dengan suhu 60°C. Sehingga diperoleh masing-masing ekstrak kental fraksi kental n-heksan, etil asetat dan n-heksan, hasil yang didapatkan ditimbang untuk mengetahui hasil rendemennya.

5. Uji Organoleptik

Pemeriksaan organoleptik tiap ekstrak kental pada bunga krisan meliputi bau, tekstur dan warna. Menurut (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017), pernyataan meliputi “*berbau khas lemah*”, “*praktis tidak berbau*”, “*tidak berbau*” atau yang lainnya, ditentukan dengan cara diamati setelah sampel terpapar udara selama 15 menit. Bau ekstrak tidak dianggap sebagai standar kemurnian, bau tersebut hanya bersifat deskriptif saja (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).

9. Penentuan Kadar Total Fenolik dengan Spektrofotometri UV-Vis

Dilakukan penetapan kadar fenolik dengan metode kolorimetri *Folin-Ciocalteu* mengacu dari prosedur Baba & Malik (2015) dan Djuleng (2021). Senyawa standar berupa asam galat dan metanol p.a sebagai pelarutnya.

a. Pembuatan Larutan Standar Asam Galat

Larutan standar asam galat dibuat dengan menimbang sebanyak 20 mg asam galat. Lalu dilarutkan asam galat dengan pelarut metanol p.a dicukupkan hingga 10 mL. Dari larutan stok konsentrasi 2000 ppm tersebut, diambil masing-masing 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mL dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga 10 mL. Maka diperoleh seri konsentrasi 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm.

b. Penetapan Panjang Gelombang Maksimal (nm) dan *Operating Time*

Dari seri larutan konsentrasi 500 ppm diambil sebanyak 0,1 mL, ditambahkan 0,1 mL pereaksi *Folin-Ciocalteu* dan didiamkan selama 4-8 menit. Setelah itu ditambahkan 1 mL Na_2CO_3 7% dan *water for injection* hingga 5 mL. Kemudian dilakukan *scanning* untuk mendapatkan panjang gelombang maksimal (nm) dengan interval 1 nm pada rentang panjang gelombang 600-800 nm. Untuk *operating time*, absorbansi larutan dibaca menggunakan panjang gelombang maksimal yang didapat sebelumnya yaitu 738 nm selama 0-2 jam dengan selang waktu 5 menit, sampai diperoleh nilai serapan yang stabil.

c. Pengukuran Larutan Standar Asam Galat

Larutan standar asam galat diambil sebanyak 0,1 mL dari tiap seri larutan pada konsentrasi 100, 200, 300, 400 dan 500 ppm serta ditambahkan pereaksi *Folin-Ciocalteu* sebanyak 0,1 mL dan didiamkan selama 4-8 menit. Kemudian ditambahkan 1 mL Na_2CO_3 7% dan *water for injection* hingga 5 mL. Campuran larutan tersebut didiamkan selama *operating time* yang diperoleh yaitu 1 jam 30 menit dan dibaca absorbansinya dengan panjang gelombang 738 nm.

d. Pembuatan Larutan Ekstrak Etanol dan Fraksi Bunga Krisan

Pembuatan larutan ekstrak etanol dan fraksi n-heksan, etil asetat dan air bunga krisan dilakukan dengan menimbang ekstrak kental dan melarutkannya menggunakan pelarut metanol p.a sebanyak 10 mL. Bunga krisan putih ekstrak etanol diambil 30 mg, fraksi air 80 mg, fraksi etil asetat 30 mg dan fraksi n-heksan 80 mg. Sedangkan bunga krisan kuning ekstrak etanol diambil 100 mg, fraksi air 100 mg, fraksi etil asetat 100 mg dan fraksi n-heksan 100 mg.

e. Penetapan Total Fenolik Ekstrak Etanol dan Fraksi Bunga Krisan

Masing-masing dipipet larutan ekstrak dan hasil fraksi n-heksan, etil asetat dan air sejumlah 0,1 mL, ditambahkan 0,1 mL pereaksi *Folin-Ciocalteu* dan didiamkan selama 4-8 menit. Setelah itu ditambahkan 1 mL Na_2CO_3 7% dan *water for injection* hingga 5 mL. Lalu, didiamkan selama

1 jam 30 menit dan absorbansinya dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 738 nm. Dilakukan prosedur ini sebanyak 4 kali pengulangan untuk tiap sampel.

10. Penentuan Kadar Total Flavonoid dengan Spektrofotometri UV-Vis

Penentuan kadar total flavonoid dengan metode kolorimetri menggunakan pereaksi kompleks $AlCl_3$ mengacu pada prosedur Chang dkk. (2002), Ahmad dkk. (2014) dan Ramadhan dkk (2021) dengan beberapa modifikasi. Senyawa standar yang digunakan adalah kuersetin dan etanol p.a sebagai pelarutnya.

a. Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Pembuatan larutan standar kuersetin konsentrasi 1000 ppm dilakukan dengan menimbang 10 mg kuersetin dan melarutkannya ke dalam etanol p.a serta dicukupkan hingga 10 mL. Diambil dari larutan konsentrasi 1000 ppm sejumlah masing-masing 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4 mL dan dicukupkan dengan pelarut etanol p.a sampai 10 mL. Maka didapatkan beberapa seri konsentrasi 40, 60, 80, 100, 120 dan 140 ppm.

b. Penetapan Panjang Gelombang Maksimal (nm) dan *Operating Time*

Diambil 1 mL dari seri larutan konsentrasi 100 ppm. Ditambahkan $AlCl_3$ 10% sejumlah 1 mL dan asam asetat 5% sejumlah 8 mL. Selanjutnya, dilakukan *scanning* untuk mendapatkan panjang gelombang maksimal (nm) dengan interval 1 nm pada rentang panjang gelombang 350-450 nm. Penentuan *operating time* dilakukan dengan membaca absorbansi larutan menggunakan panjang gelombang maksimal yang didapat sebelumnya yaitu 415 nm selama 0-1 jam dengan selang waktu 5 menit sampai diperoleh nilai serapan yang stabil.

c. Pengukuran Larutan Standar Kuersetin

Larutan standar kuersetin diambil 1 mL dari tiap seri larutan konsentrasi 40, 60, 80, 100, 120 dan 140 ppm. $AlCl_3$ 10% sejumlah 1 mL dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL ditambahkan. Larutan tersebut didiamkan selama *operating time* yang diperoleh yaitu 35 menit. Setelah

itu, dibaca dengan spektrofotometer UV-vis menggunakan panjang gelombang 415 nm.

d. Pembuatan Larutan Ekstrak dan Fraksi Bunga Krisan

Pembuatan larutan ekstrak etanol dan fraksi n-heksan, etil asetat dan air bunga krisan dilakukan dengan menimbang ekstrak kental dan melarutkannya menggunakan pelarut etanol p.a sebanyak 10 mL. Bunga krisan putih ekstrak etanol diambil 50 mg, fraksi air 90 mg, fraksi etil asetat 20 mg dan fraksi n-heksan 50 mg. Sedangkan bunga krisan kuning ekstrak etanol diambil 90 mg, fraksi air 100 mg, fraksi etil asetat 60 mg dan fraksi n-heksan 20 mg.

e. Pengukuran Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi Bunga Krisan

Larutan ekstrak dan hasil fraksi n-heksan, etil asetat dan air diambil 1 mL. AlCl_3 10% sebanyak 1 mL serta asam asetat 5% sebanyak 8 mL ditambahkan. Selanjutnya, didiamkan larutan tersebut selama 35 menit. Absorbansinya dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 415 nm. Dilakukan prosedur ini sebanyak 4 kali pengulangan untuk tiap sampel.

11. Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Pembuatan Stok Larutan DPPH

Ditimbang serbuk DPPH (BM 394,32) sebanyak 3,9 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Dilarutkan serbuk dengan metanol p.a hingga tanda batas dan dihomogenkan. Maka dihasilkan larutan DPPH dengan konsentrasi sebesar 0,1 mM (Hasanah dkk., 2017). Prosedur tersebut dilakukan pada wadah gelap dengan melapisi labu ukur menggunakan aluminium foil dan kondisi yang terhindar dari cahaya karena DPPH mudah bereaksi dengan cahaya sehingga dapat menimbulkan terjadinya degradasi.

b. Penetapan Panjang Gelombang Maksimal (nm) dan *Operating Time*

Diambil larutan DPPH konsentrasi 0,1 mM 4 mL, dimasukkan ke dalam kuvet untuk sampel dan kuvet blanko diisi dengan metanol p.a dengan jumlah yang sama. Selanjutnya, *discanning* menggunakan

spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang rentang 400-600 nm dengan interval 1 nm sampai didapatkan kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang. Dimana serapan tertinggi merupakan panjang gelombang maksimal (nm) yang didapatkan. Untuk *operating time* diukur absorbansinya dengan menggunakan panjang gelombang maksimal yang didapatkan yaitu sebesar 516 nm. Penentuan *operating time* dilakukan pada rentang waktu 0-40 menit, untuk memperoleh waktu serapan yang stabil (Purwasari, 2021).

c. Persiapan Larutan Pembanding (Vitamin C)

Dibuat larutan induk 100 ppm dengan menimbang vitamin C sejumlah 5 mg dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Lalu, dilarutkan dengan pelarut metanol p.a sebanyak 10 mL, dihomogenkan dan ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas. Selanjutnya dibuat seri larutan induk dengan berbagai konsentrasi. Dipipet dari larutan induk sejumlah 1, 2, 3, 4 dan 5 mL. Dimasukkan secara terpisah ke dalam labu takar 10 mL serta dicukupkan sampai tanda batas menggunakan pelarut metanol p.a. Maka didapatkan larutan uji seri konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm (Hasanah dkk., 2017).

d. Persiapan Larutan Uji Ekstrak dan Fraksi n-Heksan, Etil asetat dan Air

Ekstrak kental dari hasil masing-masing ekstrak dan fraksi ditimbang 250 mg. Kemudian melarutkannya menggunakan metanol p.a sebanyak 10 mL hingga homogen. Dimasukkan larutan tadi ke dalam labu takar 25 mL dan dicukupkan dengan pelarut metanol p.a hingga tanda batas. Maka dihasilkan larutan sampel dengan konsentrasi 10.000 ppm. Selanjutnya pada tiap larutan ekstrak dari fraksinasi air, etil asetat dan n-heksan dibuat berbagai larutan seri. Dipipet dari larutan induk 10.000 ppm sejumlah volume yang akan diencerkan menjadi beberapa seri konsentrasi dan dimasukkan ke labu takar 10 mL yang dilarutkan dengan pelarut metanol p.a hingga tanda batas (Hasanah dkk., 2017). Ekstrak etanol krisan putih dibuat seri konsentrasi 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm. Fraksi air krisan putih dibuat seri konsentrasi 500, 750, 1000, 1250 dan

1500 ppm. Fraksi etil asetat krisan putih dibuat seri konsentrasi 200, 400, 600, 800 dan 1000 ppm. Fraksi n-heksan krisan putih dibuat seri konsentrasi 100, 500, 1000, 1500 dan 2000 ppm. Ekstrak etanol krisan kuning dibuat seri konsentrasi 1000, 1500, 2000, 2500 dan 3000 ppm. Fraksi air, etil asetat dan n-heksan krisan kuning dibuat seri konsentrasi 1000, 2000, 3000, 4000 dan 5000 ppm.

- e. Pengukuran Absorbansi Sampel Ekstrak dan Fraksi n-heksan, Etil asetat, Air Serta Pembanding Vitamin C

Dipipet sebanyak 0,2 mL sampel (larutan ekstrak dan hasil fraksi n-heksan, etil asetat dan air) dan pembanding (larutan vitamin C). Lalu, secara berurutan tiap larutan ditambahkan DPPH 0,1 mM sejumlah 3,8 mL dan didiamkan pada *operating time* yaitu 25 menit. Prosedur tersebut dilakukan ditempat gelap yang terlindungi cahaya dengan melapisi wadah menggunakan aluminium foil. Absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 516 nm. Dilakukan prosedur ini pengulangan 4 kali tiap masing-masing seri konsentrasi sampel, serta pembanding vitamin C secara berurutan (Hasanah dkk., 2017).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Perhitungan rendemen

Perhitungan rendemen suatu ekstrak dilakukan untuk menentukan perbandingan jumlah ekstrak yang didapatkan dari suatu bahan terhadap berat awal bahan baku. Perhitungan rendemen pada ekstrak kental etanol dihitung dengan menggunakan persamaan:

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

Sedangkan, perhitungan rendemen pada ekstrak kental hasil fraksinasi etil asetat, n-heksan dan air dihitung dengan persamaan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat fraksi yang diperoleh}}{\text{Berat ekstrak yang digunakan untuk fraksinasi}} \times 100 \%$$

Menurut Senduk dkk. (2020), dapat dikatakan memiliki kualitas yang baik apabila hasil rendemen yang diperoleh semakin tinggi sehingga semakin

rendah pula pengotor dalam ekstrak atau fraksi. Sehingga, semakin tinggi perolehan rendemen menunjukkan semakin tinggi pula kandungan senyawa yang tertarik pada suatu sampel (Senduk dkk., 2020).

2. Analisis Data Total Kadar Senyawa Fenolik dan Flavonoid

Analisis data untuk penentuan total kadar senyawa fenolik dan flavonoid dilakukan dengan membuat kurva baku antara konsentrasi pembanding dengan absorbansi yang didapatkan menggunakan program Microsoft Excel. Setelah didapatkan persamaan regresi linier, ditentukan nilai kadar terhitung dan kadar total senyawa fenolik dan flavonoidnya dengan persamaan:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

y = Nilai absorbansi sampel

x = Konsentrasi larutan sampel

$$\% \text{ Kadar Total} = \frac{\text{Kadar terhitung} \times \text{volume total}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

Dari hasil kadar total senyawa yang diperoleh, dihitung presisinya meliputi nilai rata-rata (\bar{x}), *standard deviation* (SD), koefisien variasi (CV) dan *Standard Error of Mean* (SEM).

3. Analisis Data Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan pada sampel ditentukan berdasarkan seberapa besar hambatan serapan dari radikal bebas DPPH melalui perolehan persentase penghambatan. Persentase penghambatan/inhibisi dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \%$$

Keterangan:

A_{kontrol} = Nilai absorbansi DPPH pada panjang gelombang maksimal sebelum direaksikan dengan larutan sampel uji.

A_{sampel} = Nilai absorbansi DPPH pada panjang gelombang maksimal setelah direaksikan dengan larutan sampel uji, begitu pula dengan pembanding.

Hasil data yang diperoleh, dibuat persamaan regresi linier yang menggabungkan persentase penghambatan dengan konsentrasi dari setiap larutan sampel uji serta dan juga pembanding vitamin c untuk mendapatkan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ ditentukan melalui perhitungan konsentrasi larutan sampel yang dapat menghambat radikal bebas DPPH (persentase penghambatan)

sebesar 50, pada regresi linier dari korelasi persentase penghambatan dengan konsentrasi larutan sampel. Nilai IC_{50} dihitung menggunakan rumus:

$$y(50) = ax + b$$

Keterangan:

y = Nilai 50

a+b = Perolehan dari regresi linier

x = Hasil IC_{50}

Dilakukan analisis hasil data dengan membandingkan nilai IC_{50} pada masing-masing sampel (Hasanah dkk., 2017). Dari hasil nilai IC_{50} yang diperoleh, dihitung presisinya meliputi nilai rata-rata (\bar{x}), *standard deviation* (SD), koefisien variasi (CV) dan *Standard Error of Mean* (SEM).

4. Analisis Data Statistik

Seluruh data dianalisis secara statistik dengan software SPSS menggunakan metode uji *One-way ANOVA*. Sebelum itu, dilakukan uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk dan diuji homogenitasnya menggunakan uji Levene's. Hasil data dikatakan terdistribusi normal dan homogen apabila masing-masing nilai signifikansinya $>0,05$. Apabila data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen, maka dapat dilakukan uji *One-way ANOVA* menggunakan taraf kepercayaan sebesar 95%. Jika hasil data yang didapatkan signifikansinya $<0,05$ maka terdapat perbedaan yang signifikan antar sampel ekstrak dan fraksi dari bunga krisan. Apabila dari hasil uji terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui sampel mana yang berbeda signifikansinya. Namun apabila tidak terdapat perbedaan yang signifikan $>0,05$ atau salah satu dari kedua asumsi tidak terpenuhi maka analisis *One-way ANOVA* tidak bisa dilakukan, sehingga analisis lainnya menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *post Hoc Pairwise Comparisons* (Gio & Caraka, 2018; Hasanah dkk., 2017).