

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

A. Desain Skripsi

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan metode bersifat eksperimental laboratorium dengan rancangan acak lengkap pola searah. Rancangan acak karena pengambilan sampel herba seledri (*Apium graveolens L.*) dilakukan secara acak, tidak ada pemilihan secara khusus. Rancangan lengkap karena terdapat kontrol positif, kontrol negatif, dan kelompok perlakuan. Penelitian ini bertujuan untuk menjelaskan hubungan sebab-akibat (kausalitas) antara satu variabel dengan variabel lainnya dengan melakukan kontrol dan pengukuran dengan sangat cermat terhadap variabel-variabel penelitian. Pelaksanaan penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu persiapan sampel, ekstraksi dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan FRAP.

B. Lokasi Dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian dilakukan sejak Maret - Juli.

C. Populasi Dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah herba seledri (*Apium graveolens L.*) diambil dari Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah

2. Sampel

Sampel penelitian dikumpulkan dengan cara random sampling dilakukan secara acak, herba seledri dipilih yang masih segar, berwarna hijau dan usia panen ± 2 bulan.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak herba seledri (*Apium graveolens L.*)
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan pada ekstrak herba seledri (*Apium graveolens L.*)
3. Variabel pengacau terkendali dalam penelitian ini adalah waktu pemanenan, waktu inkubasi, suhu pada saat inkubasi
4. Variabel pengacau tak terkendali dalam penelitian ini adalah usia tumbuhan yang dipanen, cuaca, kelembaban.

E. Definisi Operasional

Tabel 1 Definisi Operasional

| Variabel | Definisi operasional | Cara pengukuran | Skala pengukuran |
|---------------------|--|--|------------------|
| Ekstrak seledri | Ekstrak seledri adalah ekstrak hasil maserasi herba seledri menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan larutan 1:10. | observasi | - |
| Antioksidan | Antioksidan merupakan senyawa yang mendonorkan elektron (elektron donor) atau reduktan kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga dapat mencegah terjadinya oksidasi tersebut | Pemeriksaan laboratorium dengan metode DPPH dan FRAP menggunakan larutan standar vitamin C secara spektrofotometri | Nominal |
| Skruining fitokimia | Skruining fitokimia adalah metode analisi untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dari herba seledri. | Pengujian dilakukan dengan uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, terpenoid (steroid) | - |

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis), Timbangan analitik (Ohaus), rotary evaporator, *grinder* simplisia (Fomac), Pipet tetes, mikropipet, pipet ukur (Iwaki), propipet, batang pengaduk, toples kaca, tabung reaksi (Iwaki), rak tabung reaksi, lemari asam, gelas beker (Iwaki), erlenmeyer (Iwaki), gelas ukur (Iwaki), labu ukur (Iwaki), waterbath, cawan porselin, sendok tandu, sendok spatula, lemari pengering, botol ekstrak (vial), kaca arloji, Vortex, Oven, Kulkas.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba seledri (*Apium graveolens L.*), DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil), pereaksi dragondorf, pereaksi mayer, pereaksi wagner, magnesium, akuades, FeCl₃, TPTZ (2,4,-*tripyridyl-s-triazine*), natrium asetat trihidrat, FeCl₃.6H₂O, HCl, etanol 70%, asam asetat, metanol, vitamin C, kertas / kain saring, alummunium foil, metanol pa, etanol pa, AlCl₃, Plat KLT, n-butanol, aquades, white tip, yellow tip, blue tip, asam asetat, kuersetin.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengumpulan bahan dan determinasi tanaman

Herba Seledri di ambil bagian daun, batang, dan akar pada pagi hari, dipilih seledri yang masih segar, berwarna hijau dan usia panen \pm 2 bulan. Herba seledri diambil pada pagi hari karena kandungan zat aktifnya masih banyak tersimpan dalam tanaman karena belum mengalami metabolisme (Kurniawan, 2011; Hal. 37). Kemudian dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Determinasi tanaman pada herba seledri berfungsi untuk mengetahui kebenaran bahan herba seledri yang digunakan pada penelitian.

2. Persiapan sampel

Herba seledri diambil bagian daun, batang dan akar, kemudian disortasi basah untuk menghilangkan kotoran-kotoran dan bahan asing lainnya. Setelah

itu sampel dicuci dengan menggunakan air mengalir hingga bersih, lalu sampel ditiriskan. Herba seledri kemudian disortasi kering untuk memisahkan dengan pengotor yang masih tertinggal. Selanjutnya sampel dipotong kecil-kecil (± 5 cm) dan dikeringkan di lemari pengering pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$, selama 3 hari, hingga nilai susut pengeringan mencapai $< 10\%$ (Kusumadewi & Widiyastuti, 2010; Hal. 62), kemudian di haluskan dengan ayakan 40 mesh, hal ni dilakukan untuk memperkecil ukuran partikel dan memperbesar kontak dengan pelarut (Saragih, 2019; Hal. 6). Selanjutnya serbuk ditimbang sebanyak ± 180 gram.

3. Penetapan susut pengeringan

Dimasukan 2 gram serbuk herba seledri ke dalam alat *Moisture balance* menggunakan wadah berlapis aluminium foil yang telah ditandai, kemudian diamati susut pengeringannya pada suhu 105°C hingga alat menunjukkan angka konstan. (Suhardiman et al., 2019; Hal. 4)

4. Pembuatan ekstrak dari herba seledri

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi dengan perbandingan 1:10 (Kemenkes RI, 2017; Hal. 531) yaitu Herba seledri yang telah di haluskan ditimbang sebanyak 180 gram, kemudian dimasukkan ke bejana maserasi dan ditambahkan pelarut etanol 70% (1,8 liter) hingga seluruh sampel terendam oleh pelarut lalu ditutup rapat dan di simpan di tempat yang gelap. Sampel harus disimpan ditempat yang gelap untuk mencegah terjadinya kerusakan akibat reaksi dikatalisis oleh cahaya atau terjadinya perubahan warna (Supomo et al., 2019; Hal. 34). Bejana di simpan hingga 24 jam agar pelarut tidak jenuh, pada 6 jam pertama dilakukan pengadukan 3 kali dan selanjutnya didiamkan selama 18 jam (Kemenkes RI, 2017; Hal. 531). Kemudian disaring dengan kertas atau kain sehingga di peroleh filtrat etanol serta residu, dan dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali. Filtrat pertama, kedua dan ketiga dicampurkan dan di uapkan dengan rotary evaporator pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ hingga larutan menjadi kental. (Wulandari et al., 2015; Hal. 7)

5. Uji organoleptik

Uji organoleptik adalah suatu pengujian yang dilakukan dengan menggunakan pancaindra terhadap ekstrak dengan mengamati bentuk,

konsistensi, bau, warna, dan rasa dari ekstrak. Pengujian ini bertujuan untuk mengidentifikasi ciri khas dari ekstrak. (Gangga et al., 2017; Hal. 240)

6. Uji aktivitas fitokimia (Djamil & Wijastuti, 2015)

Tujuan dilakukannya pengujian ini adalah untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dari herba seledri. Serbuk herba seledri (*Apium graveolus L.*) dilakukan pengujian kandungan senyawa kimia yang meliputi pengujian alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, terpenoid (steroid).

a. Identifikasi Alkaloid

Sebanyak 0,25 g ekstrak diencerkan dengan 5 ml HCl 2N, dibagi menjadi 3 tabung. Kemudian ditambahkan pereaksi Dragendorff (Merah atau jingga), pereaksi Mayer (endapan putih) dan pereaksi Wagner (endapan coklat).

b. Identifikasi flavonoid

Sebanyak 0,25 g ekstrak dididihkan dengan 50 ml air panas selama 5 menit. Sebanyak 5 ml filtrat tambahkan serbuk magnesium secukupnya, dan ditambah 1 ml HCl 2N. Dalam uji flavonoid penambahan HCl pekat dapat digunakan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya. Flavonoid merupakan senyawa yang mengandung dua cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari satu. Adanya reduksi antara magnesium dan HCl dapat menimbulkan warna merah, kuning dan jingga pada flavonoid. (Putri, 2014)

c. Identifikasi saponin

Sebanyak 0,25 g ekstrak dididihkan dengan 50 ml air panas selama 5 menit. Sebanyak 10 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dikocok kuat secara vertikal selama 10 menit. Terbentuknya busa setinggi 1-10 cm yang stabil dalam waktu tidak hilang setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2N menunjukkan adanya saponin.

d. Identifikasi tanin

Sebanyak 0,25 g ekstrak ditambahkan 50 ml air, dididihkan selama 15 menit, kemudian didinginkan dan disaring dengan kertas saring, diambil 5 ml ditambahkan larutan besi (III) klorida 1% biru tua atau hijau kehitam-hitaman menunjukkan adanya senyawa tanin.

e. Identifikasi golongan Steroid dan Triterpenoid

Sebanyak 0,25 g ekstrak ditambahkan 2 tetes asam asetat glasial dan di tambahkan 1 tetes asam sulat pekat. Terbentuknya warna merah atau hijau menunjukkan adanya senyawa steroid dan triterpenoid.

7. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk menganalisis senyawa flavonoid

a. Penjenuhan bejana

Di buat fase gerak dengan menggunakan Butanol : asam asetat : air (4:1:5) (Kusnadi & Devi, 2017; Hal. 62). Di masukkan ke dalam sebuah chamber. Kertas saring 10 cm di masukkan ke dalam chamber. Tutup rapat dan biarkan kertas saring terbatas oleh fase gerak untuk menandakan chamber telah jenuh (Kusnadi & Devi, 2017; Hal. 62-63)

b. Pembuatan larutan uji

Ekstrak herba seledri ditimbang sebanyak 500 mg kemudian di larutkan menggunakan etanol 70 % dan di tambahkan hingga tanda batas 5 mL. Larutasn di vortex hingga larut kemudian di saring dengan kertas saring. (Kemenkes RI, 2017; Hal. 407-408)

c. Prosedur KLT

Plat KLT di oven selama 30 menit pada suhu sekitar 100⁰C, untuk menghilangkan kandungan air yang terdapat pada plat sehingga daya serap lebih maksimal. Kemudian plat KLT diberi garis atas bawah sekitar 1 cm. Plat KLT di totolkan ekstrak herba seledri dan standar kuersetin pada garis bawah dengan jarak keduanya 1 cm. Setelah chamber yang berisi fase gerak jenuh, di masukkan plat KLT tutup di tunggu hingga eluen naik. Di ambil lalu di keringkan plat KLT kemudian di amati noda dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365. Hitung nilai Rf (*Retardation Factor*) (Kusnadi & Devi, 2017; Hal. 62-63)

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh analit}}{\text{Jarak tempuh pelarut}}$$

d. Orientasi penggunaan berbagai macam fase gerak

Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini

- 1) Butanol : asam asetat: air (4:1:5)
- 2) Kloroform : metanol : air (7:2:1)
- 3) Kloroform : metanol (9,5:0,5)

8. Uji aktivitas antioksidan DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH (0,1 mM)

Sejumlah 4 mg DPPH (BM 394,32) di timbang seksama dan di larutkan dalam 100 mL metanol pro analisis (sebagai pelarut) lalu di masukkan ke dalam labu ukur. Pengerjaan di lakukan pada wadah gelap dan kondisi yang terhindar dari cahaya. (Fauzi et al., 2021; Hal 4)

b. Penentuan panjang gelombang maksimum dan operating time

Larutan yang digunakan adalah 3 mL DPPH di masukkan ke dalam kuvet, dengan menggunakan blanko metanol pa., kuvet di masukkan ke dalam spektrofotometri UV-Vis. Kemudian dilakukan skrinning panjang gelombang pada rentang 400-600 nm, amati hingga diperoleh nilai absorbansi maksimal, yaitu pada panjang gelombang 515 nm. Penentuan operating time dilakukan selama 40 menit, DPPH stabil pada waktu inkubasi 30 menit.

c. Pembuatan Kurva Baku vitamin C

Di timbang dengan seksama vitamin C 1 mg dan di larutkan dalam 100 ml metanol pro analisis kemudian di kocok hingga homogen. Dari larutan induk vitamin C, kemudian dibuat dengan konsentrasi yaitu 2, 4, 6, dan 8 ppm. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL dan dicukupkan volumenya dengan metanol pro analisis hingga 5 mL lalu dihomogenkan. Masing-masing larutan uji dipipet 50 μ L di masukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 4 mL DPPH dikocok hingga homogen lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Vitamin C digunakan untuk pembanding karena vitamin C memiliki aktivitas yang sangat kuat, serta salah satu antioksidan alami yang relatif aman dan tidak

menimbulkan toksisitas.(Fauzi et al., 2021; Hal. 4) (Lung & Destiani, 2018; Hal. 54)

d. Persiapan Larutan Uji (Wulandari et al., 2015; Hal. 7-8)

1) Pembuatan larutan Induk (Konsentrasi 500 ppm)

Sejumlah 5 mg ekstrak ditimbang saksama dan dilarutkan dalam 10 mL metanol pro analisis kemudian dikocok hingga homogen.

2) Pembuatan Larutan Seri

Larutan ekstrak etanol dibuat dengan konsentrasi 5, 10, 25, 50, dan 100 ppm. Kemudian di masukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan di cukupkan volumenya dengan metanol pro analisis hingga 5 mL lalu di homogenkan.

3) Pengujian (Sami et al., 2017; Hal. 108) (Wulandari et al., 2015; Hal. 8)

Masing-masing larutan uji dipipet 50 μ L dimasukkan ke dalam tabung reaksi di tambahkan 4 mL DPPH dikocok hingga homogen lalu di inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan di ukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm.

e. Orientasi penentuan konsentrasi induk DPPH

Pembuatan larutan DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM, dilakukan penimbangan DPPH sebanyak 7,9 mg dan dilarutkan dengan 50 ml ad metanol pa. Pada konsentrasi 0,4 mM absorbansi larutan DPPH sebesar > 3,00.

f. Orientasi penentuan seri konsentrasi vitamin C

Seri konsentrasi vitamin C dilakukan mulai dari konsentrasi induk 500 ppm, pengujian dilakukan dengan mencampurkan 1 ml Vit C ditambah 1 ml DPPH lalu di ad 5 ml metanol pa., selanjutnya dilakukan juga dengan konsentrasi induk 10 ppm pada konsentrasi 2,4,6, dan 8 ppm pengujian dilakukan dengan pengambilan sampel sebanyak 50 μ l dan ditambah DPPH 4 ml.

9. Uji aktivitas antioksidan *FRAP* (Safitri et al., 2020; Hal. 46)

a. Penyiapan Larutan Pereaksi

1) Buffer Asetat pH 3,6

Di timbang 3,7 mL natrium asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ditambahkan dengan 46,3 mL asam asetat P, dilarutkan dengan akuades hingga tepat 100 mL dalam labu tentu ukur.

2) TPTZ

Di buat dengan melarutkan 380 μL HCl pekat dalam 100 mL aquadest. Di timbang 31 mg TPTZ kemudian di larutkan dengan HCl dalam labu 50 mL, hingga sampai tanda batas.

3) $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Di timbang 32,44 mg $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ di larutkan dengan buffer asetat dalam labu takar hingga 10 mL

4) Reagent FRAP

Di buat dengan cara mencampurkan buffer asetat 25 mL, TPTZ 2,5 mL dan $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mL atau dengan perbandingan 10:1:1.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum dan operating time

Larutan yang digunakan adalah 3 mL reagen FRAP dimasukkan ke dalam kuvet, dengan menggunakan blanko akuades, kuvet dimasukkan ke dalam spektrofotometri UV-Vis. Kemudian dilakukan skrining panjang gelombang pada rentang 400-800 nm, amati hingga diperoleh nilai absorbansi maksimal, yaitu pada panjang gelombang 600 nm. Penentuan operating time dilakukan selama 40 menit, sampel FRAP stabil pada waktu inkubasi 30 menit.

c. Pembuatan Kurva Baku vitamin C (400 ppm) sebagai pembanding (Munadiah, 2017; Hal. 42-43) (Safitri et al., 2020; Hal. 47)

Ditimbang dengan seksama vitamin C 2 mg dan dilarutkan dalam 5 mL etanol pro analisis kemudian dikocok hingga homogen dan diukur absorbansinya. Kemudian dibuat seri konsentrasi 2 ppm, 10 ppm, 18 ppm, 24 ppm, dan 32 ppm. Masukkan 5 mL kedalam labu tukur dan dicukupkan volumenya dengan etanol pro analisis hingga 5 mL lalu di homogenkan. Masing-masing larutan uji dipipet 150 μL di masukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 3 mL FRAP lalu ditutup dengan aluminium foil dikocok hingga homogen. Di inkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan.

Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 600 nm.

- d. Pengukuran Kapasitas Antioksidan Ekstrak herba seledri (Safitri et al., 2020; Hal. 47)

Sejumlah 1 g ekstrak ditimbang saksama dan dilarutkan dalam 10 mL etanol pro analisis kemudian dikocok hingga homogen. Larutan ekstrak etanol dibuat dengan seri konsentrasi 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL dan dicukupkan volumenya dengan etanol pro analisis hingga 5 mL lalu dihomogenkan. Masing-masing larutan uji dipipet 150 μ L dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan 3 mL FRAP dikocok hingga homogen lalu diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Sampel dibuat dalam tiga replikasi.

- e. Orientasi penentuan seri konsentrasi Vitamin C dan ekstrak

Penentuan seri konsentrasi vitamin C dilakukan dengan pembuatan larutan induk sebesar 400 ppm. Dilakukan beberapa kali optimasi mulai dari konsentrasi 2 ppm; 3,2 ppm ; 10 ppm; 25 ppm; 55 ppm; 70 ppm; dll. Penentuan seri konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2 ppm, 10 ppm, 18 ppm, 24 ppm dan 32 ppm. Penentuan konsentrasi ekstrak dimulai dari pembuatan induk yaitu mulai dari konsentrasi 2000 ppm, 5000 ppm dan 10.000 ppm. Pengujian ekstrak dilakukan dengan konsentrasi 10.000 ppm dengan seri konsentrasi 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm dan 1000 ppm.

Tabel 2 Pelaksanaan penelitian

| No. | Penelitian | Januari | Februari | Maret | April | Mei | Juni | Juli | agustus |
|------------|---------------------|----------------|-----------------|--------------|--------------|------------|-------------|-------------|----------------|
| 1. | Pembuatan Proposal | | | | | | | | |
| 2. | Ujian Proposal | | | | | | | | |
| 3. | Persiapan Sampel | | | | | | | | |
| 4. | Proses Ekstraksi | | | | | | | | |
| 5. | Pengujian Fitokimia | | | | | | | | |
| 6. | Uji KLT | | | | | | | | |

| No. | Penelitian | Januari | Februari | Maret | April | Mei | Juni | Juli | Agustus |
|-----|-----------------------|---------|----------|-------|-------|-----|------|------|---------|
| 7 | Pengujian Antioksidan | | | | | | | | |
| 8 | Laporan Hasil | | | | | | | | |

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan Metode FRAP dinyatakan dengan *inhibisi concentration* 50% atau IC₅₀. Nilai IC₅₀ pada metode DPPH adalah konsentrasi sampel yang dapat menangkap 50% radikal bebas. Sedangkan pada metode FRAP IC₅₀ adalah konsentrasi sampel yang dapat mereduksi ion Fe sebanyak 50%.

$$\% \text{ IC DPPH} = \frac{\text{absorbansi larutan blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi larutan blanko}} \times 100\%$$

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

Setelah diperoleh presentase inhibisi dari masing - masing konsentrasi, selanjutnya dilakukan perhitungan regresi linier (x,y), dimana x sebagai konsentrasi (µg/ml) dan y sebagai presentasi aktivitas (%) dari perhitungan ini akan diperoleh rumus $y = bx+a$. Kemudian pada rumus $y = bx+a$, untuk nilai y diganti menjadi 50 maka akan diperoleh nilai x. Apabila nilai IC₅₀ kecil, maka aktivitas antioksidan semakin tinggi.

Menurut Blois dalam Rosida & Ra, (2015) klasifikasi antioksidan berdasarkan nilai IC₅₀:

Tabel 3 Klasifikasi Antioksidan

| Nilai IC ₅₀ | Antioksidan |
|------------------------|-------------|
| < 50 ppm | Sangat kuat |
| 50-100 ppm | Kuat |
| 100-150 ppm | Sedang |
| 151-200 ppm | Lemah |

Setelah itu dilakukan perhitungan analisis statistika ekstrak herba seledri menggunakan program SPSS. Data yang dimasukkan adalah nilai persen penangkapan radikal bebas ekstrak seledri dan vitamin C menggunakan metode DPPH dan FRAP dengan berbagai konsentrasi. Tahap awal yang dilakukan adalah

uji normalitas. Uji normalitas dilakukan untuk menentukan data yang terkumpul terdistribusi normal atau tidak. Berdasarkan hasil uji normalitas dengan menggunakan metode Shapiro-Wilk dapat diamati apakah nilai IC_{50} ekstrak herba seledri (DPPH & FRAP) dan vitamin C signifikan ($p > 0,05$) yang artinya data terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan metode Levene's, uji homogenitas bertujuan untuk mengetahui variasi beberapa data dari populasi memiliki varian sama atau tidak. Uji homogenitas digunakan sebagai salah satu syarat, walaupun bukan syarat mutlak artinya jika data tidak homogen uji independen t test tetap dapat digunakan, namun pengambilan keputusan mengacu pada hasil equal variance not assumed. Jika nilai $sig < 0,05$ maka dikatakan bahwa data tidak homogen sedangkan jika $sig > 0,05$ maka dapat dikatakan bahwa data homogen, sehingga dapat dilanjutkan menggunakan uji statistik *T-Test Independent*. Uji statistik *T-test* merupakan salah satu uji untuk mengetahui perbedaan antara dua sampel yang berbeda. Interpretasi data dapat dilihat dari nilai signifikan ($p < 0,05$) berarti ada perbedaan yang signifikan antara dua variabel yang berbeda dan sebaliknya. Uji *T-Test* dilakukan terhadap nilai IC_{50} dari metode DPPH dan FRAP. Hal ini dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan aktivitas antioksidan yang signifikan dari kedua metode tersebut. (Raharjo, 2021)