

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau objek yang diteliti (Notoatmodjo, 2002). Populasi dalam penelitian ini adalah biji kopi Arabika (*Coffea arabica* L.).

Sampel adalah bagian kecil dari populasi yang dianggap mewakili seluruh populasi dalam penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah biji kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) hitam yang siap panen berumur sekitar 6-8 bulan, telah dikeringkan, dijemur, dan digiling menjadi serbuk yang diambil dari pulau Flores.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Penelitian ini melibatkan tiga jenis variabel utama, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas merupakan variabel yang dirancang secara khusus untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel lain dalam penelitian. Dalam studi ini, variabel bebas meliputi fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air yang diperoleh dari ekstrak biji kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) yang berasal dari Pulau Flores.

Variabel tergantung adalah variabel yang diukur untuk menilai dampak atau efek dari perlakuan yang diberikan oleh variabel bebas. Pada penelitian ini, variabel tergantung mencakup kadar total fenolik, kadar total flavonoid, serta nilai IC₅₀ yang digunakan untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan dalam menghambat aktivitas radikal bebas.

Variabel terkendali merupakan faktor yang berpotensi mempengaruhi hasil pengukuran variabel tergantung dan harus dijaga dalam kondisi konstan. Dalam penelitian ini, variabel terkendali mencakup durasi reaksi DPPH dengan ekstrak, suhu, dan waktu inkubasi.

3. Definisi operasional dan variabel utama

Pertama, biji kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) adalah biji kopi yang diperoleh dari Pulau Flores, Provinsi Nusa Tenggara Timur pada Agustus 2023.

Kedua, serbuk biji kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) ini adalah serbuk dari biji kopi yang telah dibersihkan, kemudian digiling untuk melepas kulitnya, lalu disortasi untuk mendapat biji kopi pilihan. Setelah itu, biji kopi hasil sortasi disangrai hingga tingkat matang pada level tertentu. Biji kopi yang telah disangrai dan dalam keadaan dingin digiling menggunakan mesin penggiling kopi hingga halus.

Ketiga, ekstrak etanol biji kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) diperoleh melalui proses maserasi terhadap serbuk biji kopi menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak hasil maserasi selanjutnya diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu sekitar 50°C hingga menghasilkan ekstrak kental.

Keempat, fraksi *n*-heksana merupakan fraksi yang diperoleh dari ekstrak etanol menggunakan pelarut nonpolar *n*-heksana. Fraksi etil asetat diperoleh dari residu fraksi *n*-heksana dengan pelarut semipolar etil asetat. Sementara itu, fraksi air dihasilkan dari sisa fraksi etil asetat menggunakan pelarut polar berupa air.

Kelima, DPPH adalah senyawa radikal bebas sintetik yang stabil dalam pelarut metanol, dan umum digunakan dalam pengukuran aktivitas antioksidan.

Keenam, aktivitas antioksidan didefinisikan sebagai kemampuan dari fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dalam menangkap radikal bebas DPPH yang dinyatakan dengan nilai IC₅₀.

Ketujuh, nilai IC₅₀ adalah nilai yang mengimplementasikan besarnya konsentrasi sampel (ppm) yang mampu meredam radikal bebas sebesar 50%, semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin tinggi aktivitas antioksidan dari sampel yang diuji.

Kedelapan, kadar fenolik total adalah suatu nilai yang menggambarkan banyaknya senyawa fenolik yang terkandung di dalam sampel fraksi tanaman yang diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan baku pembanding berupa asam galat.

Kesembilan, kadar flavonoid total adalah suatu nilai yang menunjukkan jumlah senyawa fenolik yang terkandung di dalam sampel fraksi tanaman yang diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan baku pembanding berupa kuersetin.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat penelitian yang digunakan meliputi timbangan analitik, botol kaca gelap, *rotary evaporator*, spektrofotometer UV-Vis, labu

ukur, corong pisah, gelas ukur, *Beaker glass*, Erlenmeyer corong kaca, mikropipet, pipet tetes, wadah kaca, stopwatch, dan batang pengaduk.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah biji kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) yang tumbuh di pulau Flores, etil asetat, aquades, *n*-heksana, asam galat, natrium hidroksida (NaOH) 1%, kuersetin, natrium asetat (CH_3COONa) 1 M, aluminium (III) klorida (AlCl_3) 10%, vitamin C, etanol 96% teknis, etanol pro analisa, serbuk 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), metanol, dan aluminium foil.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Identifikasi tanaman dilakukan untuk menentukan posisi dan jenis tanaman dalam sistem klasifikasi botani. Selain itu, identifikasi ini juga bertujuan untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian memang sesuai dengan spesies yang dimaksud, sehingga dapat mencegah kesalahan dalam pemilihan bahan uji. Proses verifikasi tanaman biji kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) dilakukan berdasarkan karakteristik morfologis yang dibandingkan dengan referensi pustaka, dan pelaksanaannya dilakukan di Balai Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Preparasi sampel

Biji kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) segar yang digunakan sebagai bahan baku terlebih dahulu dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran yang menempel. Selanjutnya, biji kopi digiling untuk melepaskan kulitnya. Proses penggilingan kemudian dilanjutkan menggunakan mesin penghalus hingga diperoleh serbuk dengan tingkat kehalusan yang sesuai, menghasilkan sebanyak 1000 gram serbuk biji kopi Arabika.

3. Pembuatan ekstrak etanol biji kopi Arabika (*Coffea arabica* L.)

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Sampel biji kopi yang telah dikeringkan dan dihaluskan terlebih dahulu ditimbang sebanyak 750 gram, lalu direndam dalam pelarut etanol selama 24 jam sambil sesekali diaduk untuk membantu pelarut menembus sel tanaman. Setelah proses perendaman selesai, campuran disaring menggunakan kertas saring, kemudian ampas diseduh kembali dengan pelarut yang sama dengan

volume setengah dari awal selama 24 jam hingga didapatkan filtrat jernih dan maksimal. Semua filtrat kemudian dikumpulkan dan diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40–50°C hingga menghasilkan ekstrak pekat.

4. Penetapan kadar air ekstrak biji kopi Arabika (*Coffea arabica L.*)

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode pengeringan hingga bobot tetap. Sekitar 10 gram ekstrak ditimbang dengan teliti lalu dimasukkan ke dalam wadah yang telah diketahui bobot kosongnya. Sampel dikeringkan dalam oven bersuhu 105°C selama satu jam, kemudian ditimbang kembali. Proses pengeringan dan penimbangan diulang sampai diperoleh bobot yang konstan, yaitu ketika dua hasil penimbangan berturut-turut memiliki selisih kurang dari 0,25% atau tidak lebih dari 0,5 mg berdasarkan hasil timbangan analitik.

5. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol biji kopi Arabika (*Coffea arabica L.*)

Pengujian kandungan kimia dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol biji kopi Arabika. Identifikasi senyawa dilakukan di Laboratorium Analisis Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

5.1 Identifikasi flavonoid. Uji identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan melarutkan sebanyak 0,5 gram ekstrak sampel ke dalam 100 mL air, kemudian dipanaskan hingga mendidih selama sekitar 5 menit. Setelah direbus, larutan disaring dan filtrat yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ke dalam tabung tersebut ditambahkan serbuk magnesium dalam jumlah secukupnya, diikuti oleh 1 mL larutan asam klorida pekat serta 2 mL amil alkohol. Campuran dikocok kuat-kuat dan dibiarkan hingga terbentuk dua lapisan. Kehadiran senyawa flavonoid ditandai dengan munculnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Sarker *et al.*, 2006).

5.2 Identifikasi alkaloid. Untuk mendeteksi adanya alkaloid, sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam campuran 1 mL larutan HCl 2N dan 9 mL air. Campuran tersebut kemudian dipanaskan selama kurang lebih 2 menit lalu disaring. Filtrat hasil penyaringan dibagi ke dalam dua tabung reaksi, masing-masing sebanyak 3 mL. Selanjutnya ditambahkan dua tetes dari masing-masing pereaksi alkaloid yaitu Mayer, Bouchardat, dan Dragendorff. Hasil positif uji alkaloid

ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih atau kuning saat ditetesi pereaksi Mayer, endapan berwarna coklat kehitaman pada pereaksi Bouchardat, dan endapan kuning pada pereaksi Dragendorff (Kementerian Kesehatan RI, 1995).

5.3 Identifikasi saponin. Uji saponin dilakukan dengan menambahkan 10 mL air panas ke dalam 0,5 gram ekstrak dalam tabung reaksi. Setelah didinginkan, larutan dikocok secara intens selama sekitar 10 detik. Untuk sampel yang berupa larutan, dilakukan pengenceran 1 mL dengan 10 mL air sebelum pengocokan. Terbentuknya busa yang stabil, padat, dan bertahan minimal selama 30 detik dengan tinggi busa antara 1-10 cm merupakan indikator positif adanya saponin. Selanjutnya, 1 tetes larutan HCl 2N ditambahkan untuk mengamati apakah busa tetap stabil sebagai penegas adanya saponin (Kementerian Kesehatan RI, 1979).

5.4 Identifikasi tanin. Pengujian keberadaan senyawa tanin dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak sampel yang telah dihaluskan dalam aquadest, kemudian larutan tersebut dipanaskan dan dibiarkan selama sekitar 3 menit. Setelah itu, sebanyak 1 mL larutan disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan sebanyak 2-3 tetes larutan besi(III) klorida (FeCl_3). Hasil uji dianggap positif apabila larutan menunjukkan perubahan warna menjadi hitam kebiruan atau hijau, yang menandakan adanya senyawa tanin dalam sampel (Kementerian Kesehatan RI, 1995).

5.5 Identifikasi triterpenoid/steroid. Untuk mendeteksi senyawa golongan triterpenoid dan steroid, sebanyak 0,5 gram ekstrak dicampur dengan 2 mL kloroform dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan 10 tetes asam asetat anhidrat, diikuti dengan penambahan 3 tetes asam sulfat pekat (H_2SO_4) yang diteteskan secara perlahan melalui dinding tabung. Reaksi positif terhadap triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya cincin berwarna coklat atau ungu di batas kedua pelarut, sedangkan warna hijau yang muncul menunjukkan keberadaan senyawa steroid (Nugrahani *et al.*, 2016).

6. Pembuatan fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air

Ekstrak etanol pekat sebesar 30 g dilarutkan dalam 100 mL akuades, lalu dimasukkan ke dalam corong pisah dengan kran tertutup. Selanjutnya, campuran diekstraksi secara cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana sebanyak 100 mL untuk memisahkan senyawa nonpolar. Proses ini diulang hingga fraksi nonpolar sudah tidak tersisa atau ekstraksi dinilai lengkap. Hasilnya, fraksi *n*-heksana dikeluarkan

dan dikonsentrasi menggunakan penangas air hingga menjadi pekat. Lapisan aquades sebagai fase polar kemudian diekstraksi ulang dengan 100 mL etil asetat untuk menarik senyawa semipolar. Prosedurnya sama seperti sebelumnya yaitu campuran dikocok, dipisahkan, lalu fraksi etil asetat dikumpulkan dan diuapkan menjadi fraksi pekat. Akhirnya, lapisan tersisa berupa fraksi air yang mengandung senyawa polar diekstraksi dan dikumpulkan sebagai fraksi terakhir (Abubakar *et al.*, 2020). Penggunaan pelarut berdasarkan polaritas seperti ini terbukti efektif dalam mendapatkan fraksi yang diperkaya senyawa fenolik dan flavonoid, di mana fraksi etil asetat biasanya menunjukkan kandungan bioaktif tertinggi dibanding *n*-heksana atau air (Butar-Butar & Sinaga, 2023; Mariadoss *et al.*, 2021).

7. Uji aktivitas antioksidan fraksi dari ekstrak etanol biji kopi Arabika (*Coffea arabica L.*)

7.1 Pembuatan larutan stok DPPH. Sebanyak 15,8 mg serbuk DPPH ditimbang secara akurat, kemudian dilarutkan dalam etanol p.a hingga volume 100 mL dalam labu takar. Larutan ini menghasilkan konsentrasi akhir 0,4 mM. Setelah homogen, larutan disimpan dalam wadah tertutup yang dibungkus aluminium foil untuk mencegah degradasi akibat paparan cahaya, mengingat DPPH bersifat sensitif terhadap cahaya (Molyneux, 2004; Abubakar *et al.*, 2020).

7.2 Pembuatan larutan blanko. Sebagai pembanding, dibuat larutan blanko dengan cara memipet 1 mL larutan DPPH 0,4 mM, kemudian diencerkan menggunakan etanol p.a hingga mencapai volume 5 mL. Larutan ini diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dalam kondisi terlindung dari cahaya menggunakan pembungkus aluminium foil, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 515–517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Molyneux, 2004).

7.3 Pembuatan larutan induk fraksi konsentrasi 1000 ppm. Untuk masing-masing fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air, sebanyak 25 mg sampel ditimbang lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Kemudian, fraksi dilarutkan menggunakan etanol p.a hingga mencapai volume penuh, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan ini nantinya akan digunakan untuk membuat seri pengenceran dalam uji aktivitas antioksidan (Mariadoss *et al.*, 2021).

7.4 Larutan standar induk vitamin C 50 ppm. Sebanyak 2,5 mg vitamin C ditimbang, lalu dilarutkan dalam etanol p.a dan dimasukkan ke dalam labu takar 50 mL. Larutan ini diencerkan hingga

mencapai batas tanda untuk memperoleh konsentrasi 50 ppm. Vitamin C digunakan sebagai pembanding standar karena aktivitas antioksidan yang tinggi serta kestabilannya dalam media pelarut organik (Prakash *et al.*, 2001).

7.5 Penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan stok DPPH 0,5 mM diambil sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL kemudian tambahkan etanol p.a sampai tanda batas dan kocok campuran hingga homogen. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500-600 nm.

7.6 Penentuan *operating time* (OT). Untuk mengetahui waktu reaksi optimal antara senyawa antioksidan dan radikal bebas DPPH, dilakukan pengamatan terhadap kestabilan absorbansi dalam rentang waktu tertentu. Sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,4 mM dicampur dengan 1 mL larutan seri vitamin C dan diencerkan menggunakan etanol p.a hingga mencapai volume 5 mL. Campuran ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH yang telah ditentukan sebelumnya. Pengamatan dilakukan mulai dari menit ke-0 hingga absorbansi menunjukkan kondisi stabil tanpa fluktuasi yang signifikan. Titik ini dianggap sebagai waktu operasi optimal (Sasmita *et al.*, 2014; Molyneux, 2004).

7.7 Pembuatan seri larutan vitamin C. Serangkaian larutan vitamin C dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm yang dibuat dari larutan induk vitamin C 50 ppm. Setiap 1 mL larutan vitamin C ditambahkan ke dalam 1 mL larutan DPPH, kemudian diencerkan menggunakan etanol p.a hingga 5 mL. Campuran ini diinkubasi selama waktu operasi yang telah ditentukan, lalu absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515-517 nm (Sasmita *et al.*, 2014).

7.8 Pembuatan seri larutan uji. Seri larutan uji disiapkan dalam konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm, menggunakan larutan induk fraksi 1000 ppm. Masing-masing larutan uji sebanyak 1 mL dicampur dengan 1 mL larutan DPPH 0,4 mM, lalu diencerkan menggunakan etanol p.a hingga 5 mL. Campuran kemudian diinkubasi selama operating time yang telah ditetapkan. Setelah inkubasi, absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515–517 nm (Gasc *et al.*, 2018).

7.9 Pengukuran absorbansi. Absorbansi dari seluruh larutan uji, kontrol positif vitamin C, dan blanko diukur menggunakan

spektrofotometer UV-Vis. Hasil pengukuran ini digunakan untuk menghitung persen inhibisi radikal DPPH oleh masing-masing konsentrasi sampel. Nilai IC₅₀ dimana merupakan konsentrasi yang menyebabkan 50% hambatan aktivitas radikal bebas, dihitung menggunakan persamaan regresi linear ($y = bx + a$), dengan nilai $y = 50$. Nilai x yang diperoleh dari perpotongan garis merupakan konsentrasi IC₅₀ (Molyneux, 2004).

8. Penetapan kadar fenolik total

8.1 Pembuatan larutan induk asam galat 500 ppm.

Sebanyak 0,05 gram serbuk asam galat dilarutkan dengan 100 mL aquabides. Kemudian dibuat variasi konsentrasi 100, 120, 140, 160, dan 180 ppm dengan cara dipipet larutan induk asam galat 500 ppm dan dilarutkan dengan etanol p.a pada labu takar 10 mL.

8.2 Penentuan panjang gelombang maksimum.

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan mencampurkan 1 mL larutan standar asam galat dicampur dengan 5 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, kemudian didiamkan selama 8 menit. Selanjutnya ditambahkan 4 mL larutan NaOH 1% dan larutan divortex hingga homogen. Larutan diinkubasi pada suhu ruang sesuai waktu operasi yang telah ditentukan sebelumnya. Absorbansi campuran tersebut kemudian diukur pada rentang panjang gelombang 400 hingga 800 nm untuk mengidentifikasi puncak absorbansi tertinggi, yang akan digunakan sebagai panjang gelombang maksimum pengukuran total fenol (Alfian & Susanti, 2012).

8.3 Penentuan operating time (OT).

Operating time ditentukan dengan mencampurkan 1 mL larutan standar asam galat dengan 5 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, kemudian larutan tersebut divortex dan didiamkan selama 8 menit. Setelah itu, ditambahkan 4 mL larutan NaOH 1% dan larutan divortex kembali hingga homogen. Campuran lalu diinkubasi pada suhu ruang, dan absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah didapat setiap interval waktu selama 60 menit. *Operating time* ditetapkan berdasarkan titik waktu di mana absorbansi mulai stabil tanpa mengalami perubahan signifikan dari menit ke menit, yang menandakan reaksi telah mencapai kondisi optimum (Alfian & Susanti, 2012; Singleton *et al.*, 1999).

8.4 Penentuan kadar fenolik total.

Penetapan kadar fenolik total dilakukan dengan menimbang sebanyak 10 mg fraksi ekstrak etanol biji kopi Arabika (*Coffea arabica* L.), lalu dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Larutan

ini kemudian direaksikan dengan 5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* dan didiamkan selama 8 menit, kemudian ditambahkan 4 mL NaOH 1% dan divortex hingga tercampur homogen. Selanjutnya, campuran diinkubasi pada suhu ruang selama operating time, lalu absorbansinya diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan sebelumnya. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Nilai absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung kadar total fenolik yang dinyatakan dalam mg GAE/g sampel berdasarkan kurva standar asam galat (Singleton & Rossi, 1965; Velioglu *et al.*, 1998). Kadar fenolik total sampel dihitung dengan rumus (Chaithada *et al.*, 2018):

$$TPC = \frac{C \times V \times fp}{g}$$

9. Penetapan kadar flavonoid total

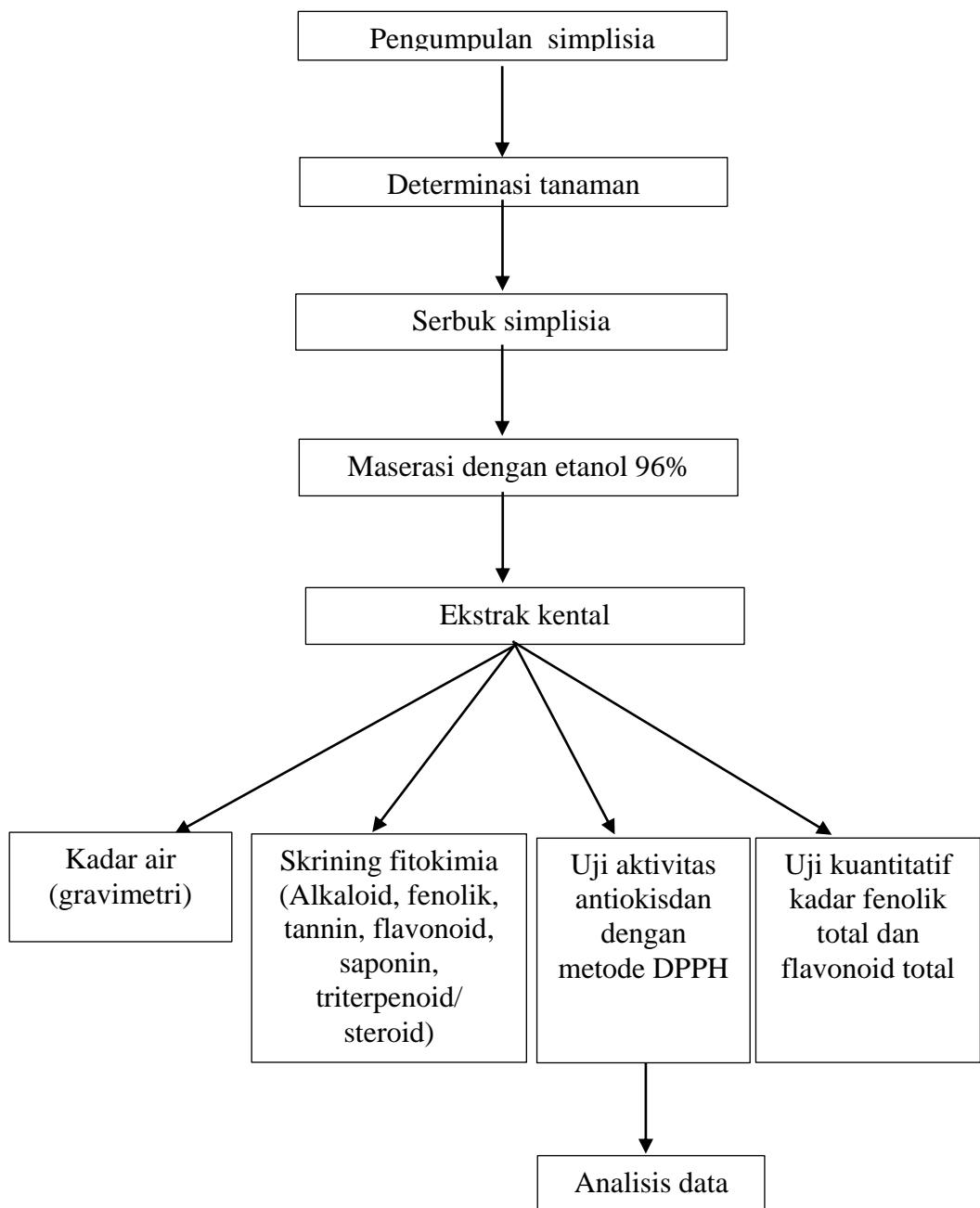
9.1 Penentuan kurva kalibrasi standar kuersetin. Sebanyak 10 mg kuersetin ditimbang secara cermat, kemudian dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Larutan ini selanjutnya diencerkan menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 60, 90, 120, 150, dan 180 ppm. Setiap larutan standar dipipet sebanyak 1 mL ke dalam labu ukur 10 mL, lalu ditambahkan 0,1 mL larutan AlCl₃ 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, dan 2,8 mL aquadest. Volume kemudian dilengkapi hingga tanda batas menggunakan etanol p.a. Setelah diinkubasi selama waktu operasi tertentu, absorbansi larutan diukur pada rentang panjang gelombang 400-500 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data yang diperoleh digunakan untuk menyusun kurva kalibrasi dan menentukan persamaan regresi linear antara konsentrasi kuersetin dan nilai absorbansinya (Chang *et al.*, 2002).

9.2 Pengujian sampel. Sampel fraksi ekstrak etanol biji kopi Arabika ditimbang sebanyak 25 mg dan dilarutkan dalam 10 mL etanol p.a. Sebanyak 1 mL larutan ini dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, lalu ditambahkan 0,1 mL larutan AlCl₃ 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, serta 2,8 mL aquadest. Setelah ditambah etanol p.a hingga tanda batas, larutan diinkubasi sesuai waktu operasi yang ditentukan. Absorbansi larutan kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran dilakukan dalam tiga kali replikasi untuk meningkatkan akurasi. Hasil pengujian dihitung sebagai kadar flavonoid total dan dinyatakan dalam satuan ekuivalen kuersetin (QE) (Alfian & Susanti, 2012).

E. Analisis Hasil

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan menghitung nilai IC₅₀ (*Inhibitor Concentration 50*), yaitu konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menghambat aktivitas radikal bebas sebesar 50%. Nilai ini diperoleh dari pemotongan garis antara 50% inhibisi dan sumbu konsentrasi berdasarkan persamaan regresi linear ($y = bx + a$), di mana nilai y ditetapkan sebesar 50 untuk menentukan nilai x sebagai IC₅₀. Perhitungan dilakukan secara manual dan juga menggunakan bantuan perangkat lunak Microsoft Excel untuk mempercepat perolehan data numerik yang akurat. Selanjutnya, data hasil percobaan dianalisis secara statistik menggunakan aplikasi SPSS versi 26. Uji statistik yang digunakan adalah *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok data. Apabila ditemukan perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji lanjut (*post hoc test*). Jika data memenuhi asumsi homogenitas, maka digunakan uji *Tukey*. Namun, jika data tidak homogen, maka digunakan uji *Games-Howell* untuk mengetahui perbedaan spesifik antar kelompok (Field, 2013).

F. Skema Penelitian



Gambar 6. Skema Penelitian