

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan model desain eksperimen dengan menggunakan analisis deskriptif untuk mengetahui karakteristik dan sifat fisik, uji aktivitas antioksidan, dan uji aktivitas antibakteri pada serbuk instan *golden latte*. Langkah awal pada penelitian ini adalah membuat serbuk instan *golden latte* yang kemudian diuji karakteristik dan sifat fisik. Setelah itu diuji aktivitas antioksidan dengan metode yang digunakan adalah metode DPPH, kemudian diuji aktivitas antibakteri dengan metode yang digunakan adalah metode difusi cakram.

#### **A. Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian**

##### 1. Lokasi Penelitian

- a. Uji kadar air, kadar abu, dan skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- b. Uji karakteristik dan stabilitas fisik dilakukan di Laboratorium Teknologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- c. Uji aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Instrument Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.
- d. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Farmasi Universitas Ngudi Waluyo.

##### 2. Waktu Penelitian

Proses penelitian dilakukan pada periode bulan November 2023-Desember 2023.

## **B. Subjek Penelitian**

Subjek penelitian ini yaitu sediaan serbuk instan *golden latte* yang dibuat dengan berbahan dasar tanaman obat seperti kunyit, jahe, cengkeh, sereh, kayu manis, daun pandan, dan susu sapi.

## **C. Definisi Operasional**

1. Serbuk instan *golden latte* adalah minuman susu yang dicampur kunyit, dan ditambah rempah-rempah seperti, jahe, cengkeh, sereh, kayu manis, dan daun pandan untuk membuat cita rasa menjadi khas dan nikmat.
2. Uji karakteristik dan sifat fisik serbuk merupakan kemampuan suatu produk untuk bertahan dalam batas waktu yang ditetapkan pada masa penyimpanan dan penggunaan dengan melakukan uji parameter yang meliputi uji organoleptis, waktu alir, sudut diam, dan waktu larut.
3. Uji aktivitas antioksidan adalah uji yang dilakukan terhadap serbuk instan *golden latte* dengan menggunakan metode DPPH dan dilihat % inhibisi dan nilai IC<sub>50</sub>.
4. Uji aktivitas antibakteri adalah uji yang dilakukan terhadap serbuk instan *golden latte* menggunakan metode difusi cakram untuk mengukur diameter zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

## **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadikan terjadinya sebab perubahan oleh variabel lainnya. Adapun variabel bebas dalam penelitian ini yaitu serbuk instan *golden latte* dengan berbagai komposisi seperti kunyit, jahe, cengkeh, sereh, kayu manis, daun pandan, dan susu sapi.

## 2. Variabel Terikat

Variabel terikat yaitu variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini meliputi:

- a. Karakteristik dan sifat fisik serbuk instan *golden latte*.
- b. Nilai  $IC_{50}$  serbuk instan *golden latte*.
- c. Diameter zona hambat serbuk instan *golden latte* terhadap bakteri *Escherichia coli*.

## E. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi inkubator (*Memmert*), LAF (*Laminar Air Flow*) (*Airtech*), *powder flow taster*, *muffle furnace* (Tanur), kompor gas (*Rinnai*), tabung gas, wajan, spatula, sendok tanduk, mesh 30, blender (*Philips*), baskom, batang pengaduk kaca, kertas saring, beaker glass (*Pyrex/Iwaki*), labu ukur, erlenmeyer (*Pyrex/Iwaki*), corong kaca, pipet ukur, filler, krus porselen, lampu bunsen, cawan petri, rak tabung aluminium, tabung reaksi (*Iwaki*), autoklaf (*Himaraya*), oven (*Memmert UN-30*), pinset, timbangan analitik (*Ohaus*), mikropipet, jarum ose, jangka sorong, kertas cakram steril (*Oxioid*), spektrofotometri UV-VIS (*Shimadzu*), filler, gelas ukur (*Iwaki*), cawan porselen.

### 2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi medium Nutrient Agar (NA), bakteri *Escherichia coli*, aquadest steril, paper disk, Mc. Farland 0,5, Reagen dragendrof, Reagen mayer, Reagen  $FeCl_3$  (besi klorida),  $H_2SO_4$  (asam sulfat), HCl pekat (asam klorida), serbuk Mg (magnesium), gram A (kristal violet), gram B (larutan lugol), gram C (alkohol aseton), gram D (larutan safranin), ethanol p.a, kuersetin, serbuk DPPH (*Aldrich*), aluminium foil, antibiotik ciprofloxacin, Nutrient Agar (NA),

NaCl 0,9%, jahe, kunyit, susu sapi, gula pasir, perisa susu, daun pandan, cengkeh, sereh, kayu manis, vanili, dan garam.

## **F. Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data**

### **1. Penyiapan bahan**

Langkah pertama dalam menyiapkan bahan adalah memilih varietas kunyit dan jahe dengan sifat fisik yang baik. Kunyit dan jahe yang dipilih memiliki kulit halus dan tidak terlalu kering, yang menandakan bahwa kunyit dan jahe memiliki bentuk fisik yang segar serta dalam kondisi yang baik. Kemudian pemilihan daun pandan dipilih yang masih segar daunnya berwarna hijau, sereh wangi dipilih dengan mengamati warna batang yang berwarna hijau dan putih segar hingga bagian tangkai bawah, cengkeh dipilih pada fisik yang kering karena semakin kering cengkeh maka semakin kuat aromanya, dan memilih kayu manis yang batangnya lurus dengan keutuhan batang kayu manis dan tidak berlubang atau bernoda hitam serta teksturnya masih cukup keras dan kering. Selanjutnya yaitu pemilihan susu sapi yang masih segar serta tidak menggumpal pada cairan susu sapi.

Setelah semua bahan sudah disiapkan, kemudian bahan kunyit, jahe yang sudah dikupas dicuci bersih dengan bahan sereh, cengkeh, kayu manis, dan daun pandan. Bahan yang sudah dicuci bersih kemudian ditimbang kunyit, jahe, dan gula pasir sesuai formula.

### **2. Formulasi serbuk instan *golden latte***

Formulasi serbuk instan *golden latte* merupakan formula baru yang dibuat oleh tim PPK Ormawa tahun 2023. Formulasi serbuk instan *golden latte* terdapat pada tabel 3.1.

**Tabel 3. 1 Formulasi serbuk instan *golden latte***

<b>Bahan</b>	<b>Formulasi</b>
Jahe	46 g
Kunyit	70 g
Cengkeh	4 biji
Sereh	2 batang
Kayu manis	1 ruas jari
Daun pandan	3 helai
Susu sapi	300 mL
Gula pasir	260 g
Perisa susu	3 tetes
Vanili	0.5 g
Garam	0.5 g

3. Pembuatan sampel serbuk instan *golden latte*

Tahapan pembuatan serbuk instan *golden latte* adalah sebagai berikut:

a. Tahapan filtrasi

Pertama, siapkan alat dan timbang bahan yang akan digunakan untuk membuat serbuk instan *golden latte*. Kunyit dan jahe yang sudah ditimbang dimasukkan ke dalam blender, kemudian tambahkan susu sapi hingga kunyit dan jahe terendam untuk mempermudah penghalusan pada saat proses di blender. Saring dan peras setelah proses penghalusan selesai.

b. Tahapan kristalisasi

Hasil penyaringan perasan kunyit dan jahe dimasukkan ke dalam wajan, lalu ditambahkan sisa susu sapi, kemudian tambahkan gula yang sudah ditimbang. Campurkan semua bahan dengan pemanasan api kecil, kemudian aduk semua bahan yang telah dimasukkan. Kemudian masukkan cengkeh, sereh, kayu manis, dan daun pandan untuk menambah keharuman aroma *golden latte*. Setelah sudah tercampur dan mendidih, tambahkan perisa susu dan bahan cengkeh, sereh, kayu manis, dan daun pandan yang dimasukkan dipisahkan untuk memudahkan pengadukan.

Diaduk perlahan dan terus-menerus hingga mengental dan berbentuk serbuk instan. Matikan kompor setelah sudah mulai kering dan ayak bahan dengan mesh ukuran 30 untuk didapatkan serbuk halus.

#### 4. Penetapan kadar air

Bobot cawan porselen kosong ditimbang menggunakan neraca analitik. Kemudian, 2 g serbuk instan *golden latte* ditimbang dan dimasukkan ke dalam cawan porselen yang telah diketahui bobotnya. Kemudian masukkan ke dalam oven dengan suhu 105°C selama 4 jam. Setelah pemanasan selesai, cawan porselen yang berisi sampel didinginkan selama ±30 menit, dan bobot cawan porselen yang berisi sampel setelah pemanasan ditimbang (Fikriyah & Nasution, 2021). Penurunan bobot pada sampel merupakan banyaknya air yang diuapkan dari bahan, dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{b-(c-a)}{b} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot cawan (g)

b = bobot sampel (g)

c = bobot cawan + sampel (g)

#### 5. Penetapan kadar abu

Bobot krus porselen kosong ditimbang dengan menggunakan neraca analitik. Selanjutnya, timbang 2 g serbuk instan *golden latte*. Tempatkan sampel ke dalam krus porselen. Masukkan krus porselen dan panaskan pada suhu 600°C selama 3 jam, kemudian dinginkan dan timbang hingga mendapatkan berat yang konstan. Timbang krus porselen dan sampel setelah diabukan, kemudian dihitung kadar abu dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu total} = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

W1 = bobot krus porselen + sampel sesudah diabukan (g)

W2 = bobot krus porselen kosong dalam (g)

W = bobot sampel (g)

6. Skrining Fitokimia Serbuk Instan *Golden latte*

a. Uji Flavonoid

500 mg sampel serbuk instan *golden latte* ditimbang lalu dilarutkan dalam 10 ml aquadest. Tambahkan 100 mg serbuk Mg dan 10 tetes HCl pekat dari samping tabung ke dalam 2 ml larutan sampel. Warna merah atau jingga yang terbentuk merupakan tanda adanya kandungan senyawa flavonoid (Komala *et al.*, 2020).

b. Uji Saponin

Serbuk instan *golden latte* sebanyak 500 mg dan ditempatkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 10 ml air mendidih dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Penambahan HCl 2N akan menimbulkan gelembung setinggi 1-10 cm selama minimal 10 menit, menunjukkan bahwa adanya kandungan senyawa saponin (Komala *et al.*, 2020).

c. Uji Tanin

500 mg serbuk instan *golden latte* dilarutkan ke dalam 10 ml air mendidih, kemudian direaksikan dengan  $\text{FeCl}_3$ . Hasil positif menunjukkan adanya perubahan warna menjadi hijau kehitaman (Rante *et al.*, 2020).

d. Uji Steroid dan Triterpenoid

Larutan serbuk instan *golden latte* sebanyak 2 ml direaksikan dengan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sebanyak 2-3 tetes. Hasil positif mengandung senyawa triterpenoid ditandai dengan adanya warna kecoklatan atau violet, sedangkan adanya steroid ditandai dengan adanya warna biru kehijauan (Khafid *et al.*, 2023).

e. Uji Alkaloid

3 tabung reaksi yang berisi larutan serbuk instan *golden latte* sebanyak 2 ml ditambahkan dengan 1 ml asam klorida 2N. Reagen Mayer, Reagen Bouchardat, dan Reagen Dragendorff kemudian ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi (Syamsul *et al.*, 2016).

f. Uji Fenolik

Larutan serbuk instan *golden latte* sebanyak 2 ml direaksikan dengan 2 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  1%. Hasil positif senyawa fenolik ditunjukkan dengan perubahan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat (Saputri & Sa'ad, 2023).

7. Uji stabilitas fisik serbuk instan *golden latte*

Uji stabilitas fisik serbuk instan jahe dilakukan perbandingan suhu penyimpanan pada suhu ruang dan *climatic chamber*. Serbuk instan *golden latte* ditimbang sebanyak 100 g kemudian dimasukkan ke dalam beaker glass dan ditutup dengan aluminium foil. Serbuk instan *golden latte* disimpan pada suhu ruang pada suhu  $20^\circ\text{C}$ - $28^\circ\text{C}$  selama 12 hari. Penyimpanan *climatic chamber* pada suhu  $40^\circ\text{C}$  selama 24 jam kemudian dipindahkan pada suhu  $4^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Pengujian stabilitas fisik dilakukan selama 6 siklus (12 hari) (Rahim *et al.*, 2022). Hasil evaluasi stabilitas fisik meliputi uji organoleptis, waktu alir, sudut diam dan waktu larut.

a. Organoleptis

Pengujian organoleptis serbuk instan *golden latte* dengan tujuan untuk mengevaluasi secara langsung terhadap bentuk, rasa, warna, dan aroma (Komala *et al.*, 2020).

b. Waktu alir

Pengujian waktu alir serbuk instan *golden latte* dilakukan dengan menimbang 100 g serbuk instan *golden latte* dan dimasukkan ke dalam alat *powder flow tester*.



Setelah serbuk instan *golden latte* telah dimasukkan semua, buka perlahan tutup di bagian bawah corong. Waktu laju alir serbuk instan *golden latte* diukur dengan menggunakan stopwatch. Hasil waktu dari pengujian laju alir serbuk instan *golden latte* kemudian dicatat. Pengujian dilakukan tiga kali replikasi untuk meminimalkan kesalahan pengujian (Cheiya *et al.*, 2023).

c. Sudut diam

Pengujian sudut diam dilakukan sesudah uji waktu alir. Serbuk instan *golden latte* yang membentuk kerucut diukur diameter serta tingginya (Rohmani & Rosyanti, 2019).

d. Waktu larut

Serbuk instan *golden latte* sebanyak 20 gram dilarutkan ke dalam 200 ml air, kemudian diukur kecepatan melarutnya dengan menggunakan stopwatch. Secara teori waktu yang diperlukan granul untuk melarut yaitu kurang dari 5 menit (Husni *et al.*, 2020).

8. Uji aktivitas antioksidan

a. Pembuatan larutan baku DPPH 40 ppm

Serbuk DPPH sebanyak 4 mg ditimbang dan dilarutkan dalam etanol p.a hingga 100 ml pada labu ukur. Kemudian larutan DPPH yang diperoleh selanjutnya diukur panjang gelombang maksimum dan *operating time* (Made *et al.*, 2021).

b. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH dilakukan dengan cara larutan DPPH 40 ppm dimasukkan ke dalam kuvet. Kemudian diinkubasi selama 30 menit ditempat tertutup dan gelap. Spektrum serapan diamati menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Iqbalunnajih *et al.*, 2023).

c. Penentuan *operating time* DPPH

Penentuan *operating time* dilakukan dengan mengisi kuvet larutan DPPH 40 ppm. Absorbansi larutan pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dibaca pada interval waktu menit pertama sampai menit ke-30.

d. Penentuan absorbansi blanko

Penentuan absorbansi blanko ditentukan dengan memipet 4 ml dari larutan stok DPPH 40 ppm dan ditambahkan 1 ml etanol p.a kemudian dimasukkan ke dalam kuvet (Susiloningrum & Sari, 2021).

e. Pembuatan larutan stok kuersetin sebagai kontrol pembanding

Larutan stok kuersetin dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dibuat larutan stok kuersetin dari konsentrasi 1000 ppm ke konsentrasi 100 ppm dan dibuat larutan seri konsentrasi kuersetin diambil masing-masing 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 ml dari larutan induk kuersetin kemudian ditambahkan dengan etanol p.a pada labu ukur 10 ml sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar kersetin sebesar 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Kemudian dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada suhu ruang berdasarkan penentuan *operating time*. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang yang telah didapatkan dari penentuan panjang gelombang optimum DPPH (Agustiarini *et al.*, 2022).

f. Penentuan aktivitas antioksidan kuersetin sebagai pembanding

1 ml larutan standar kuersetin masing-masing konsentrasi dipipet ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 4 ml larutan DPPH 40 pmm. Setelah itu dikocok hingga homogen. Larutan diinkubasi sesuai *operating time* dalam ruangan gelap agar terlindung dari cahaya, kemudian ditutup dengan aluminium foil (Pratiwi *et al.*, 2023).

g. Pembuatan larutan induk dan seri konsentrasi serbuk instan *golden latte*

Larutan induk serbuk instan *golden latte* dibuat konsentrasi 1000 ppm. Sebanyak 50 mg serbuk instan *golden latte* dilarutkan dalam etanol p.a pada labu ukur 50 ml. Larutan tersebut diambil sebanyak 1; 2; 3; 4; dan 5 ml lalu ditambah dengan etanol p.a pada labu ukur 10 ml sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar sebesar 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm (Iqbalunnajih *et al.*, 2023).

h. Penentuan aktivitas antioksidan serbuk instan *golden latte*

Masing-masing konsentrasi larutan seri dipipet sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 4 ml larutan DPPH 40 ppm. Larutan diinkubasi dalam ruangan gelap dan terlindung dari cahaya selama operating time yang telah diperoleh, kemudian ditutup dengan aluminium foil (Pratiwi *et al.*, 2023). Hasil absorbansi dibaca pada masing-masing konsentrasi dengan spektrofotometri UV-Vis.

9. Uji aktivitas antibakteri

a. Identifikasi Bakteri

Pewarnaan Gram bakteri *Escherichia coli* yang digunakan untuk uji aktivitas bakteri pada pengujian ini yaitu untuk memastikan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri Gram negatif yaitu bakteri *Escherichia coli*. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* dilakukan dengan pewarnaan gram. Langkah pertama yaitu mengambil kultur bakteri sebanyak satu ose koloni pada gelas objek yang sudah ditetesi dengan aquadest steril kemudian digerakkan hingga membentuk lingkaran seperti koin. Kering anginkan kemudian fiksasi dengan cara melewatkan di atas api 3 kali. Selanjutnya, teteskan pewarna dasar kristal violet di dalam kultur bakteri yang telah dibuat, biarkan selama 1-2 menit, lalu bilas sisa pewarna dengan air mengalir secara perlahan. Tambahkan dengan lugol atau iodine sebanyak 1-2 tetes

ke dalam kultur bakteri, diamkan selama 1-2 menit, cuci biakan bakteri dengan air mengalir secara perlahan. Tambahkan alkohol biarkan selama 30 detik, lalu cuci dengan air secara perlahan. Bakteri *Escherichia coli* dilakukan pewarnaan dengan safranin sebagai perwarna pembanding dan didiamkan selama 1-2 menit, kemudian dicuci kembali warna yang berlebihan dengan air mengalir secara perlahan. Kultur bakteri yang sudah dicuci dan dikeringkan, kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x, 40, dan 100x (Prasetya *et al.*, 2019). Bakteri diklasifikasikan sebagai bakteri Gram positif jika berwarna ungu dan bakteri Gram negatif jika berwarna merah muda (Pelt *et al.*, 2016).

b. Sterilisasi alat

Alat dan media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu sesuai dengan praktik terbaik ini untuk mencegah pertumbuhan dan kontaminasi mikroorganisme lain yang tidak diinginkan. Metode sterilisasi ada tiga cara yaitu sterilisasi udara kering, sterilisasi uap panas bertekanan, dan sterilisasi uap air panas. Sterilisasi udara kering dilakukan dengan menggunakan alat oven. Sterilisasi udara kering digunakan untuk mensterilkan peralatan gelas seperti labu erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, dan peralatan gelas lainnya. Suhu yang digunakan sterilisasi kering umumnya berkisar pada suhu 170-180°C selama 2 jam atau lebih. Bahan cair yang tidak dapat disterilkan dengan oven, tetap menggunakan uap panas. Alat untuk sterilisasi uap panas menggunakan *Arnold steam sterilizer* dengan suhu 100°C selama 30 menit. Sterilisasi dengan uap bersuhu tinggi dan bertekanan menggunakan alat autoklaf dengan katup pengaman yang digunakan sebagai bantuan tambahan. Autoklaf umumnya memiliki tekanan 2 atmosfer. Sterilisasi bahan menggunakan autoklaf dilakukan dengan suhu 121°C selama 15 menit dan sterilisasi alat dengan suhu 121°C selama 20 menit. Cara ini dapat mematikan bakteri yang ada (Azizah *et al.*, 2020).

c. Pembuatan kontrol negatif dan penyiapan kontrol positif

Antibiotik ciprofloxacin digunakan sebagai kontrol positif dan aquadest steril digunakan sebagai kontrol negatif

d. Pembuatan larutan uji

Metode difusi cakram pada uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan lima konsentrasi larutan uji. Sampel serbuk instan *golden latte* dibuat dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%.

e. Pembuatan media NA

5 g Nutrien Agar (NA) dilarutkan dalam aquadest menggunakan Erlenmeyer 250 ml dan dipanaskan hingga larut. Media NA kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama  $\pm 30$  menit (Dima *et al.*, 2016).

f. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri hasil inokulasi yang diambil dengan kawat ose steril disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 10 ml larutan NaCl 0,9%. Larutan suspensi bakteri dilakukan homogenisasi dengan vortex sampai tingkat kekeruhannya setara dengan pembanding McFarland 0,5.

g. Pembuatan media kontrol

Suspensi *Escherichia coli* diambil menggunakan mikropipet sebanyak 1 ml, kemudian media NA dituang ke dalam cawan petri menggunakan metode tuang (*pour plate*). Inkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C (Dima *et al.*, 2016).

h. Uji aktivitas antibakteri metode kertas cakram

Suspensi bakteri *Escherichia coli* dituang ke dalam cawan petri menggunakan mikropipet. Media NA secara merata dituang ke permukaan cawan

petri dengan metode tuang (*pour plate*). Cawan Petri diputar searah angka delapan agar media NA tersebar secara merata (R. Fauziah *et al.*, 2022). Langkah selanjutnya adalah merendam paper disk pada masing-masing konsentrasi serbuk instan *golden latte*, kontrol positif, dan kontrol negatif selama 15 menit. Paper disk kemudian ditempatkan pada media NA dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Cawan petri kemudian ditutup dan dipanaskan dengan cara memutar sisi cawan dengan api bunsen agar cawan petri lebih steril. Cawan petri yang berisi paper disk kontrol positif, kontrol negatif, dan konsentrasi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Ariyani *et al.*, 2018). Hasil zona hambat yang terbentuk setelah diinkubasi selama 24 jam dilakukan pengukuran menggunakan jangka sorong dan diinterpretasikan kekuatan zona hambatnya (Adiningsih *et al.*, 2021).

## G. Analisis data

### 1. Analisis nilai IC<sub>50</sub>

Metode DPPH digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan. Reaksi antara DPPH dengan antioksidan setelah diinkubasi memberikan perubahan warna setiap sampel. Kemudian dari nilai absorbansi dilakukan perhitungan persentase peredaman dengan rumus :

$$\% \text{ peredaman} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel uji}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100 \%$$

Dari persentase inhibisi masing-masing konsentrasi, digunakan untuk membuat kurva regresi linier dengan persamaan  $y = bx + a$  dan nilai IC<sub>50</sub>. Hasil perhitungan % inhibisi digunakan untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub> (Made *et al.*, 2021).

### 2. Analisis data zona hambat

Diameter zona hambat yang terbentuk dianalisis menggunakan SPSS for Windows. Normalitas data diuji menggunakan *Saphiro-Wilk*, dan homogenitas data diuji menggunakan *Levene test*. Data yang terdistribusi normal dan mempunyai varian

yang homogen dilanjutkan uji lanjutan menggunakan statistik *One Way Anova* (*Analysis Of Varians*) dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil data yang terdistribusi normal tetapi tidak homogen dilanjutkan uji lanjutan menggunakan uji non parametrik (Adiningsih *et al.*, 2021).