

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan wilayah generalisasi yang terdiri dari objek atau subjek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah daun lamtoro (*Leucaena glauca* Bth.) yang diambil dari daerah Ngawi, Jawa Timur.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian dari jumlah populasi yang digunakan pada saat penelitian. Sampel dalam penelitian ini adalah daun lamtoro segar berwarna hijau tua dengan permukaan bagian atas daun yang berambut halus dan permukaan bawah daun berwarna hijau muda. Daun lamtoro berbentuk lanset dengan ujung runcing dan pangkal miring serta tepinya berjumbai. Daun lamtoro (*Leucaena glauca* Bth.) ini diambil dari daerah Ngawi, Jawa Timur.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah perbandingan metode ekstraksi dan konsentrasi pelarut etanol terhadap ekstrak daun lamtoro.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah uji skrining fitokimia dan pengujian kadar menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid total ekstrak daun lamtoro.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan menjadi variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang diubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perbandingan metode ekstraksi dan konsentrasi pelarut etanol terhadap ekstrak etanol daun lamtoro.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar memperoleh hasil yang tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah uji skrining fitokimia dan pengujian kadar flavonoid total terhadap ekstrak daun lamtoro menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar flavonoid total ekstrak daun lamtoro.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, perbandingan metode ekstraksi dan konsentrasi pelarut etanol. Metode ekstraksi adalah suatu metode yang dilakukan untuk mengambil senyawa tertentu pada suatu tanaman menggunakan pelarut. Metode ekstraksi yang digunakan adalah remaserasi dan perkolasi. Sedangkan pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi yaitu pelarut yang memiliki kepolaran untuk menarik zat aktif dari senyawa yang terkandung di dalam tanaman. Pelarut yang digunakan adalah variasi konsentrasi dari pelarut etanol yaitu 70% dan 96%

Kedua, pengujian skrining fitokimia adalah salah satu cara yang dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder pada daun lamtoro seperti uji alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin

Ketiga, kadar flavonoid total adalah kadar senyawa yang terkandung di dalam daun lamtoro yang dilakukan pengujian menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: daun lamtoro (*Leucaena glauca* Bth.), air suling, akuades, etanol 70% dan etanol 96%, kertas saring, toluen, kloroform (Merck), amoniak, H₂SO₄ 2 N, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, serbuk Mg, HCl, amil alkohol, FeCl₃, CH₃COOH, H₂SO₄ pekat, standar kuersetin BPFI (BPOM RI), AlCl₃ 10% (Merck), natrium asetat 1 M (Merck), dan etanol p.a (Merck).

2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (*Ohaus PA413®*), oven (*Memmert®*), blender (*Fomac®*), ayakan No. 60 mesh, kurs porselin, desikator, toples, *rotary evaporator* (*RE100-Pro®*), corong buchner, gelas beker (*Pyrex®*), tabung reaksi (*Pyrex®*), rak tabung reaksi, cawan porselen, corong pisah (*Pyrex®*), labu alas bulat (*Pyrex®*), bunsen, serangkaian alat *Sterling bidwell*, perkolator, Erlenmeyer (*Pyrex®*), labu takar 5 mL (*Pyrex®*), labu takar 25 mL (*Pyrex®*), pipet tetes, pipet volume (*Pyrex®*), batang pengaduk, penjepit kayu, spektrofotometri UV-Vis (*Shimadzu UV-1601®*).

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan sampel dan determinasi tanaman

Sampel yang digunakan adalah daun lamtoro segar berwarna hijau tua yang memiliki panjang 6–25 cm dengan ujung runcing dan tepi rata. Daun lamtoro ini diambil dari daerah Ngawi, Jawa Timur kemudian dilakukan determinasi. Determinasi tanaman lamtoro bertujuan untuk memastikan kebenaran sampel daun lamtoro dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman lamtoro terhadap kepustakaan dari Steenis, C.G.G.J.V, Bloembergen, H, Eyma, P.J, (1992). Determinasi dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pembuatan serbuk daun lamtoro

Daun lamtoro yang masih segar berwarna hijau tua sebanyak 5,0 kg dikumpulkan, disortasi basah untuk memisahkan antara daun lamtoro dengan kotoran-kotoran lainnya, kemudian dicuci bersih dengan air mengalir dan ditiriskan supaya air yang terkandung di permukaan daun menjadi berkurang. Daun lamtoro dilakukan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga kering supaya dapat dilakukan penyimpanan dalam jangka waktu yang lama. Daun lamtoro dilakukan sortasi kering agar tidak ada benda asing yang masuk. Selanjutnya, dilakukan penghalusan menggunakan blender untuk menjadi serbuk agar mempermudah dalam proses ekstraksi. Serbuk simplisia daun lamtoro yang sudah dihaluskan diayak menggunakan ayakan Mesh No. 60 ukuran 250 µm diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan halus kemudian ditimbang dengan neraca analitik (Kemenkes RI, 2017).

3. Pengujian kadar air serbuk daun lamtoro

Penetapan kadar air serbuk daun lamtoro dilakukan menggunakan alat *Sterling-bidwell* dengan pereaksi toluen jenuh air. Langkah pertama yang dilakukan yaitu penjenuhan toluen menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan cara sebanyak 10 mL akuades dan 100 mL toluen dicampurkan kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu dikocok hingga toluen kembali berwarna bening dan didiamkan sampai kedua larutan memisah. Pemisahan ini ditandai dengan toluen berada dibagian atas dan air berada dibagian bawah. Larutan toluen yang sudah jenuh diambil dan digunakan untuk pengujian kadar air.

Sebanyak 20 gram serbuk simplisia daun lamtoro dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan 200 mL toluen jenuh melalui pendingin sampai leher alat penampung, kemudian dilakukan pemanasan selama 15 menit. Kecepatan saat penyulingan diatur kurang

lebih 2 tetes tiap detik sampai sebagian besar air tersuling kemudian dinaikkan kecepatan hingga 4 tetes tiap detik. Pemanasan dilanjutkan selama 5 menit setelah semua air tersuling. Tabung penerima dibiarkan dalam keadaan dingin hingga mencapai suhu kamar, namun pemanasan dapat dihentikan apabila air sudah tidak menetes pada tabung berskala. Pengujian kadar air ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali dan kadar air dapat dilihat dari volume air yang terukur pada alat dan ditetapkan dalam satuan % v/b. Persyaratan kadar air yaitu tidak lebih dari 10% (Kemenkes RI, 2017).

4. Pembuatan ekstrak

Suatu ekstraksi dilakukan melalui sebuah proses yang bertujuan untuk mengambil senyawa kimia yang terkandung di dalam sampel (Harborne, 1987; Aminah *et al.*, 2017). Metode ekstraksi pertama yang dilakukan adalah maserasi. Maserasi menggunakan pelarut etanol konsentrasi 70% dan 96%. Sejumlah 50,0 gram serbuk simplisia daun lamtoro dimasukkan ke dalam masing-masing toples maserasi yang sudah ditentukan kemudian direndam menggunakan 500 mL etanol sampai permukaan serbuk terendam seluruhnya. Toples maserasi ditutup rapat dan ditempatkan pada tempat yang terlindung cahaya, direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam untuk meratakan pelarut yang sudah jenuh oleh komponen terlarut. Hasil maserasi yang diperoleh dipisahkan dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring. Hasil penyaringan dilakukan remaserasi selama 24 jam dengan penambahan pelarut yang jumlahnya setengah dari maserasi pertama. Semua filtrat yang diperoleh disaring menggunakan kain flanel dilanjutkan dengan corong buchner yang sudah dilapisi kertas saring. Hasil penyaringan diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan tekanan 70 rpm pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak yang kental (Kemenkes RI, 2017).

Metode ekstraksi kedua yang dilakukan adalah perkolasi. Perkolasi menggunakan pelarut etanol konsentrasi 70% dan 96%. Proses perkolasi terdiri dari tahap pengembangan simplisia, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstrak). Langkah pertama yang dilakukan adalah maserasi awal dengan cara ditimbang serbuk daun lamtoro sebanyak 10 bagian simplisia atau 40 gram dimasukkan ke dalam gelas beker kemudian dibasahi dengan 5 bagian atau sebanyak 20 mL pelarut etanol. Dilakukan pengadukan sampai rata kemudian didiamkan selama kurang lebih 3 jam ke dalam

gelas beker dan ditutup rapat. Kapas dimasukkan ke dalam alat perkolator dan di bagian atas kapas diberikan kertas saring. Serbuk yang sudah dilakukan pembasahan kemudian dimasukkan ke dalam alat perkolator sedikit demi sedikit sambil ditekan hati-hati. Selanjutnya, dituang dengan cairan penyari sampai cairan mulai menetes dan di atas simplisia masih terdapat selapis cairan penyari. Perkolator ditutup dan dibiarkan 24 jam. Lalu cairan dibiarkan menetes dengan kecepatan 1 mL per menit dan ditambahkan berulang-ulang cairan penyari hingga selalu terdapat selapis cairan penyari di atas simplisia. Perkulasi dihentikan setelah cairan mulai menetes tidak berwarna. Perkolat diuapkan dengan tekanan rendah pada suhu tidak lebih dari 50°C hingga konsistensi yang dikehendaki (Depkes RI, 2000). Ekstrak kental ditimbang dan dihitung rendemennya. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak (Kemenkes RI, 2017).

5. Pemeriksaan organoleptik serbuk dan ekstrak daun lamtoro

Pemeriksaan organoleptik merupakan pengenalan dan identifikasi awal seobjektif mungkin secara sederhana. Pemeriksaan ini menggunakan panca indera meliputi warna, bentuk, rasa, dan bau serbuk dan ekstrak yang diperoleh. Organoleptik merupakan parameter spesifik dari suatu serbuk dan ekstrak (Depkes RI, 2000).

6. Skrining fitokimia serbuk dan ekstrak daun lamtoro

Skrining fitokimia pada serbuk dan ekstrak daun lamtoro bertujuan untuk membuktikan bahwa daun lamtoro mengandung senyawa aktif berupa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Skrining fitokimia yang dilakukan terdiri dari uji alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin.

6.1. Uji alkaloid. Serbuk dan ekstrak daun lamtoro ditimbang sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 mL kloroform dan 5 tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan kemudian ditambahkan H₂SO₄ 2 N sebanyak 1,5 mL. Fraksi H₂SO₄ diambil dan dibagi dalam tiga tabung reaksi. Tabung I ditambahkan pereaksi Dragendorff jika sampel positif mengandung alkaloid maka akan terjadi adanya endapan berwarna merah. Tabung II ditambahkan pereaksi Meyer jika sampel positif mengandung alkaloid maka akan terjadi adanya endapan berwarna putih. Tabung III ditambahkan pereaksi Wagner jika sampel positif mengandung alkaloid maka akan terjadi adanya endapan berwarna coklat (Depkes RI, 1986).

6.2. Uji flavonoid. Serbuk dan ekstrak daun lamtoro ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian dilarutkan ke dalam 10 mL akuades panas. Larutan sampel disaring dan diperoleh filtrat. Filtrat diambil sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium, ditambahkan 1 mL HCl pekat, dan ditambahkan 1 mL amil alkohol. Kocok kuat dan didiamkan selama beberapa saat hingga larutan memisah. Sampel positif mengandung flavonoid jika ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah hingga jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1987).

6.3. Uji tanin. Serbuk dan ekstrak daun lamtoro ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian dilarutkan ke dalam 10 mL akuades yang telah dipanaskan. Sampel ditambahkan 1 tetes larutan FeCl_3 . Sampel positif mengandung tanin jika ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehitaman (Depkes RI, 1979).

6.4. Uji saponin. Serbuk dan ekstrak daun lamtoro ditimbang sebanyak 0,5 gram dilarutkan ke dalam 10 mL akuades panas kemudian digojok kuat sampai 10 detik. Sampel positif mengandung saponin jika ditunjukkan adanya buih setinggi 1-10 cm dan dilakukan penambahan HCl 2 N sebanyak 1 tetes buih tidak hilang (Depkes RI, 1979).

7. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun lamtoro

Susut pengeringan dilakukan untuk memberikan batasan maksimal atau rentang banyaknya senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan sehingga dapat menjamin keseragaman mutu simplisia agar memenuhi persyaratan standar ekstrak. Susut pengeringan pada ekstrak daun lamtoro dilakukan dengan cara menimbang saksama sebanyak 2,00 gram ekstrak dalam kurs porselin dangkal tertutup. Sebelumnya, kurs porselin tersebut dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 105°C dan ditara. Bahan dimasukkan ke dalam kurs porselin kemudian diratakan dengan menggoyangkan botol. Kurs porselin yang berisi ekstrak daun lamtoro dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C dan dibuka tutupnya hingga bobot tetap. Sebelum dimasukkan oven, botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam desikator hingga suhu ruang (Kemenkes RI, 2017).

8. Pengujian bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk mengetahui masih ada atau tidaknya etanol yang terkandung di dalam ekstrak daun lamtoro dengan cara esterifikasi etanol. Sebanyak 1 mL ekstrak kental ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 dan 2 tetes CH_3COOH kemudian dipanaskan. Reaksi positif bebas etanol ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari

etanol. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapatnya etanol dalam sampel (Depkes RI, 1995).

9. Preparasi larutan

9.1. Pembuatan larutan baku standar kuersetin. Senyawa kuersetin ditimbang saksama sebanyak 10,0 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL, dilarutkan dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas (Kemenkes RI, 2017).

9.2. Pembuatan larutan blanko. Sebanyak 0,1 mL natrium asetat 1 M, 2,8 mL akuades, dan 1,5 mL etanol p.a dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL (Kemenkes RI, 2017).

9.3. Penentuan panjang gelombang. Larutan baku standar kuersetin diambil sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL kemudian ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, 2,8 mL akuades, dan 1,5 mL etanol p.a. Dilakukan pengocokan dan didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang. Serapan dengan spektrofotometer UV-Vis diukur pada rentang panjang gelombang 400-800 nm (Kemenkes RI, 2017).

9.4. Penentuan *operating time*. Larutan baku standar kuersetin diambil sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL kemudian ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, 2,8 mL akuades, dan 1,5 mL etanol p.a. Dilakukan pengocokan kemudian dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-800 nm (Kemenkes RI, 2017).

9.5. Pembuatan kurva baku. Larutan baku standar kuersetin 1000 ppm, kemudian dipipet sebanyak 4 mL; 6 mL; 8 mL; 10 mL; 12 mL; dan 14 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi yaitu 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm, dan 140 ppm. Masing-masing konsentrasi tersebut dipipet sebanyak 0,5 mL ke dalam labu ukur 5,0 mL, kemudian ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, 2,8 mL akuades, dan 1,5 mL etanol p.a, didiamkan selama *operating time*. Nilai absorbansi ditentukan pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada spektrofotometri UV-Vis (Kemenkes RI, 2017).

10. Validasi metode analisis

10.1. Linearitas. Linearitas dilakukan dengan penambahan larutan standar baku kuersetin menggunakan enam konsentrasi yaitu 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm, dan 140 ppm yang dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu takar 5 mL sampai tanda batas. Masing-

masing konsentrasi tersebut dipipet sebanyak 0,5 mL ke dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, 2,8 mL akuades, dan 1,5 mL etanol p.a. Campuran larutan dilakukan pengocokan dan didiamkan selama *operating time* kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Kemenkes RI, 2017). Selanjutnya, dibuat kurva hubungan antara kadar dan serapan kemudian ditentukan persamaan regresi linier serta koefisien kolerasi. Koefisien kolerasi dikatakan baik apabila $r \geq 0,98$ (ICH, 2005).

10.2. Akurasi. Akurasi dilakukan dengan penambahan standar baku dan sampel. Ekstrak etanol 70% dan 96% daun lamtoro masing-masing ditimbang sebanyak 5 mg kemudian ditambahkan standar kuersetin persentase 30%, 40%, dan 50% dari salah satu konsentrasi yaitu 40 ppm, dilarutkan dalam labu takar 5 mL dengan etanol p.a. sampai tanda batas. Masing-masing larutan sampel dipipet sebanyak 0,5 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, 2,8 mL akuades, dan 1,5 mL etanol p.a (Kemenkes RI, 2017). Masing-masing konsentrasi dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Campuran larutan dilakukan pengocokan dan didiamkan selama *operating time* kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Hasil yang didapat dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear kemudian kadar yang diperoleh dilanjutkan perhitungan persentase *recovery* dengan rumus sebagai berikut (ICH, 2005).

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_f - C_a}{C^*a} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

C_f = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_a = konsentrasi sampel sebenarnya

C^*a = konsentrasi analit yang ditambahkan

10.3. Presisi. Presisi dilakukan dengan penambahan standar baku dan sampel. Ekstrak etanol 70% dan 96% daun lamtoro masing-masing ditimbang sebanyak 5 mg kemudian ditambahkan standar kuersetin persentase 40% dari salah satu konsentrasi yaitu 40 ppm, dilarutkan dalam labu takar 5 mL dengan etanol p.a. sampai tanda batas. Masing-masing larutan sampel dipipet sebanyak 0,5 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, 2,8 mL akuades, dan 1,5 mL etanol p.a

(Kemenkes RI, 2017). Dilakukan proses replikasi sebanyak 6 kali. Campuran larutan dilakukan pengocokan dan didiamkan selama *operating time* kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Presisi dinyatakan dalam nilai simpangan baku relatif (SBR) dengan syarat penerimaan adalah $< 2\%$ (ICH, 2005).

10.4. Batas deteksi (LOD). Batas deteksi atau *Limit of Detection* (LOD) dapat dihitung dengan menggunakan intersep dari kurva kalibrasi (S) dan standar deviasi (SD). LOD dapat dinyatakan dalam satuan ppm dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \text{SD}}{s} \quad (2)$$

10.5. Batas kuantitasi (LOQ). Batas kuantitasi atau *Limit of Quantification* (LOQ) dapat dihitung dengan menggunakan intersep dari kurva kalibrasi (S) dan standar deviasi (SD). LOQ dapat dinyatakan dalam satuan ppm dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{s} \quad (3)$$

11. Penetapan kadar flavonoid total

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan dengan metode kolorimetri. Ekstrak daun lamtoro ditimbang sebanyak 5 mg dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu takar 5 mL sampai tanda batas kemudian disaring sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Dilakukan pengambilan sebanyak 0,5 mL larutan uji ekstrak daun lamtoro dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL ditambahkan 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, 2,8 mL akuades, dan 1,5 mL etanol p.a. Dilakukan pengocokan dan didiamkan selama *operating time* pada suhu ruang (Kemenkes RI, 2017). Serapan diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Kadar flavonoid dilakukan perhitungan dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{C \times V \times \text{Fp}}{W} \times 100\% \quad (4)$$

Keterangan:

C = Konsentrasi senyawa dalam larutan sampel (mg/liter)

V = Volume larutan sampel (liter)

Fp = Faktor Pengenceran

W = Berat sampel (mg)

12. Analisis Data

12.1. Secara teoritis. Data yang diperoleh dari hasil pengujian dibandingkan dengan parameter dari beberapa pustaka.

12.2. Secara statistik. Data yang diperoleh merupakan data primer yang didapatkan dari absorbansi larutan pembanding kuersetin kemudian dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan regresi linear. Kadar total dari senyawa dihitung dengan memasukkan ke dalam persamaan regresi linear $y = ax + b$ dan hasilnya dinyatakan dalam satuan mg dalam gram. Analisis statistik menggunakan program SPSS 26 dengan uji Shapiro-Wilk, apabila data terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji One Way ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan kedua metode ekstraksi dan konsentrasi pelarut etanol uji flavonoid total dalam ekstrak daun lamtoro. Hasil data uji One Way ANOVA yang mengalami perbedaan signifikan akan dilanjutkan dengan uji Post Hoc dengan tingkat kepercayaan sebesar 95% untuk mengetahui metode ekstraksi dan konsentrasi pelarut etanol manakah yang memberikan perbedaan signifikan.