

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dari penelitian ini adalah biji pinang (*Areca catechu* L.) yang diperoleh dari daerah Desa Jepalo, Kecamatan Gunungwungkal, Kabupaten Pati, Jawa Tengah.

Sampel uji dalam penelitian ini berupa biji dari buah pinang (*Areca catechu* L.) yang telah mencapai tingkat kematangan penuh. Biji yang digunakan dipilih berdasarkan visual dan fisik yaitu berwarna cokelat kemerahan hingga cokelat tua, kulit luar kuning kecokelatan, dan bagian dalam masih segar. Biji pinang tua memiliki tekstur yang lebih keras dibandingkan biji muda, mengandung serat dalam jumlah lebih tinggi sehingga lebih sulit dikunyah dan memiliki cita rasa yang cenderung lebih pahit, tanaman ini diambil pada bulan Juli 2025.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama pada penelitian yang pertama ini adalah ekstrak etanol 96% dari biji pinang (*Areca catechu* L.) yang dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut air, etil asetat dan *n*-heksana.

Variabel utama pada penelitian yang kedua ini adalah aktivitas tonikum ekstral dan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari biji pinang (*Areca catechu* L.) terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*) dengan metode uji gelantung dan *natatory exhaustion*.

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel utama dilakukan setelah proses identifikasi, sehingga variabel ini dikelompokkan menjadi tiga kategori yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan terkontrol.

**2.1 Variabel bebas.** Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau menjadi penyebab perubahan, sehingga untuk mengetahui efek yang terjadi terhadap variabel tergantung (Sugiyono, 2013). Variabel bebas dalam penelitian ini meliputi pemberian ekstrak biji pinang serta fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan fraksi air dari biji pinang dalam dosis tertentu.

**2.2 Variabel tergantung.** Variabel tergantung adalah variabel yang mengalami perubahan akibat pengaruh dari variabel bebas (Sugiyono, 2013). Variabel tergantung yang diamati dalam penelitian ini

adalah aktivitas tonikum pada ekstrak biji pinang serta fraksi air, etil asetat dan *n*-heksana yang dinilai berdasarkan durasi mencit jantan putih (*Mus musculus*) bertahan pada uji gelantung dan uji *natatory exhaustion*, baik sebelum maupun sesudah perlakuan.

**2.3 Variabel terkendali.** Variabel terkendali adalah variabel yang merujuk pada variabel-variabel yang dijaga tetap agar tidak memengaruhi hubungan antara variabel bebas dan variabel tergantung (Sugiyono, 2103). Variabel terkendali pada penelitian ini mencakup kondisi fisik mencit seperti berat badan, jenis kelamin, kondisi lingkungan, kondisi kandang, pakan yang diberikan, metode pengamatan, peralatan uji gelantung, keadaan laboratorium, serta prosedur ekstraksi dan fraksinasi.

### 3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, biji pinang (*Clitoria ternatea L.*) adalah biji buah pinang yang telah mencapai tingkat kematangan penuh, dalam kondisi masih segar, berwarna cokelat kemerahan hingga cokelat tua, yang diambil dari daerah Desa Jepalo, Kecamatan Gunungwungkal, Kabupaten Pati, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk biji pinang merupakan bahan kering yang diperoleh melalui tahapan proses pengambilan bahan, sortasi basah untuk memisahkan kotoran dengan sampel, pencucian, sortasi kering, setelah kering dihaluskan dengan blender dan diayak dengan saringan mesh nomor 40.

Ketiga, hasil ekstrak biji pinang yaitu melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% yang dilakukan untuk memperoleh senyawa aktif dari tanaman tersebut, kemudian hasil ekstrak kental dipekatkan dengan menggunakan alat *rotary evaporator*.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah fraksi dari ekstrak biji pinang yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksana sebagai pelarut non polar.

Kelima, fraksi etil asetat adalah hasil fraksinasi lanjutan dari residu fraksi *n*-heksana, dari ekstrak biji pinang yang difraksinasi dengan pelarut etil asetat sebagai pelarut semi polar.

Keenam, fraksi air diperoleh dari sisa fraksinasi etil asetat dari ekstrak biji pinang, yang selanjutnya diuapkan menggunakan *waterbath* untuk memperoleh fraksi polar.

Ketujuh, uji aktivitas tonikum merupakan pengujian yang menggunakan metode gelantung dengan melihat waktu ketahanan mencit dalam bergelantung, kemudian untuk metode *Natatory*

*exhaustion* dilakukan dengan akuarium yang berisi air dengan melihat waktu lelah mencit saat berenang. Durasi ketahanan mencit saat bergelantung dan waktu bertahan dalam wadah air untuk menentukan fraksi teraktif terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus*).

Kedelapan, fraksi yang paling efektif adalah fraksi yang memberikan aktivitas tonikum sebanding dengan kontrol positif.

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *stopwatch*, mesin penggiling (*grinder*), pisau/parang, ayakan mesh no 40, timbangan analitik, bejana maserasi, kertas saring, kain flannel, corong pisah, Erlenmeyer, lumpang dan alu, batang pengaduk, seperangkat alat *vacum rotary evaporator*, waterbath, pipet tetes, besi gelantung, aquarium kaca (wadah uji renang), spuit dengan jarum tumpul, beaker glass, gelas ukur, tabung reaksi, cawan penguap, rak tabung, aluminium foil, *chamber*, lempeng KLT, pipa kapiler, lampu UV 254 dan 366 nm, krus porselen, tang krus, oven, desikator, vial, timbangan hewan, corong pisah, kandang mencit, *moisture balance*.

#### 2. Bahan

Penelitian ini menggunakan sampel biji pinang (*Areca catechu* L.) yang diperoleh dari daerah yaitu Desa Jepalo, Kecamatan Gunungwungkal, Kabupaten Pati, Jawa Tengah, kondisi biji pinang yaitu masih segar, sudah matang dengan warna coklat kemerahan hingga coklat tua, dan tidak cacat. Hewan uji yang digunakan adalah mencit putih jantan (*Mus musculus*) dengan berat 20-30 gram dan berumur 2-3 bulan, yang didapat dari Laboratorium Universitas Setia Budi. Bahan pelarut yang digunakan meliputi pelarut etanol 96%, *n*-heksana, aquadest (air), etil asetat. Kontrol negatif menggunakan suspensi Na CMC 0,5%, sedangkan kontrol positif menggunakan kafein. Dragendorff, Sudan III, Wagner, Mayer, amonia, sitroborat, etil asetat, FeCl<sub>3</sub>, amil alkohol, asam klorida (HCL) 2 N, serbuk magnesium, pereaksi iodin-naftol, asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Libermann-Baurchard (asam asetat glasial, HCl pekat dan kloroform), saponin murni, quersetin, asam galat, piperin, stigmasterol, (kloroform:*n*-butanol:air), (kloroform:*n*-aseton:asam format), (*n*-butanol:asam asetat). (*n*-heksana:etil asetat), (kloroform:metanol).

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Pembuatan *Ethical Clearance***

*Ethical Clearance* (EC) berfungsi sebagai pedoman dalam menjamin integritas, kejujuran, dan keadilan selama penelitian berlangsung. Pengurusan dokumen EC dilakukan di RSUD Dr. Moewardi, Surakarta. Langkah pertama dimulai dengan pengisian formular pendaftaran secara online. Peneliti wajib menyerahkan bukti pendaftaran, formulir yang telah diisi, serta proposal penelitian yang telah ditandatangani dosen pembimbing yang diserahkan ke bagian forensik dan medicolegal, proses dilanjutkan dengan pembayaran biaya administrasi. Dokumen EC diproses selama maksimal 14 hari. Pengambilan EC dilakukan secara mandiri dengan menunjukkan bukti pengajuan yang telah ditandatangani petugas.

### **2. Determinasi Tanaman**

Determinasi dilakukan untuk memastikan keakuratan sampel tanaman biji pinang yang berkaitan dengan karakteristik morfologi yang terdapat pada tumbuhan tersebut, yang dilakukan di UPT Laboratorium Universitas Setiabudi Surakarta, Jawa Tengah.

### **3. Pengambilan Bahan**

Biji pinang diperoleh dari wilayah Desa Jepalo, Kecamatan Gunungwungkal, Kabupaten Pati, Jawa Tengah. Tanaman yang dipilih dalam kondisi segar, berwarna coklat kemerahan hingga coklat tua, tidak rusak, bebas hama dan bahan kimia guna untuk menjamin mutu bahan baku yang diambil pada bulan Juli 2025.

### **4. Pembuatan Serbuk Biji Pinang**

Biji pinang tua dan matang dipetik, lalu dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Biji bersih dikeringkan dalam oven bersuhu 45°C selama 150 menit hingga berwarna kecokelatan. Biji kering dihaluskan dengan mesin penggiling atau penghalus (*grinder*) menjadi serbuk, kemudian diayak menggunakan mesh nomor 40 untuk memperoleh partikel seragam. Serbuk ditimbang dan disimpan dalam wadah tertutup guna menjaga mutu.

### **5. Uji Susut Pengeringan Serbuk Biji Pinang**

Penetapan susut pengeringan dilakukan untuk mengetahui jumlah kadar air yang hilang dari simplisia setelah proses pengeringan sesuai metode yang telah ditentukan. sebanyak 2 gram serbuk simplisia ditimbang dan dikeringkan pada suhu 105° menggunakan *moisture balance* hingga mencapai berat konstan yang ditandai dengan adanya

bunyi “bib”. Hasil dinyatakan dalam bentuk persen (%) (Setyawati, 2018). Penentuan susut dilakukan sebanyak tiga kali, dengan nilai susut yang memenuhi syarat adalah tidak lebih dari 10% (Kemenkes RI, 2022).

## 6. Pembuatan Ekstrak Biji Pinang

Ekstraksi serbuk biji pinang dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut. Sebanyak 800 gram serbuk dimasukkan ke dalam wadah tertutup dan ditambahkan 8 liter pelarut dengan rasio 1:10 hingga seluruh bahan terendam. Perendaman dilakukan selama 24 jam di tempat teduh terlindungi dari paparan sinar matahari secara langsung, dengan pengadukan sesekali selama 6 jam pertama dan didiamkan selama 18 jam berikutnya. Hasil maserasi kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan kain flanel untuk memisahkan filtrat dengan residu. Residu hasil maserasi kemudian dilakukan remaserasi dengan menggunakan setengah kali jumlah volume pelarut pada penyaringan pertama yaitu sebanyak 4 liter selama 24 jam dan disaring kembali. Filtrat hasil maserasi dan remaserasi digabung, kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 45°C dan kecepatan 60 rpm hingga diperoleh ekstrak kental. Rendemen dihitung untuk mengetahui efisiensi ekstraksi berdasarkan perbandingan berat ekstrak dengan berat awal bahan kering. Berikut rumus yang dapat digunakan untuk menghitung persentase rendemen: (Kemenkes RI, 2022).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot serbuk kering sebelum diekstraksi (g)}} \times 100\%$$

## 7. Kadar Air Ekstrak Biji Pinang

Penetapan kadar air pada ekstrak bertujuan menilai kandungan air yang tersisa sebagai parameter mutu (Adawiyah *et al.*, 2017). Pengujian dilakukan dengan metode gravimetri sebanyak tiga kali pengulangan. Metode ini dipilih karena sederhana dan tidak membutuhkan bahan pembanding. Sebanyak 10 gram ekstrak ditimbang dan dimasukkan ke dalam krus porselen yang telah ditara sebelumnya, kemudian krus dikeringkan dalam oven bersuhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang kembali. Penimbangan dilakukan setiap satu jam hingga selisih antara dua penimbangan berturut-turut tidak melebihi 0,25%, sehingga diperoleh bobot yang tetap (Kemenkes RI, 2022). Penentuan kadar air bertujuan memastikan ekstrak berada dalam batas kandungan air yang diizinkan untuk menjaga stabilitas fisik dan mikrobiologis.

Kadar air tinggi berisiko memicu pertumbuhan mikroorganisme dan menurunkan kualitas sediaan (Depkes RI, 2010).

$$\frac{\text{Bobot sampel sebelum dikeringkan} - \text{Bobot sampel setelah dikeringkan}}{\text{Bobot sampel sebelum dikeringkan}} \times 100\%$$

## 8. Pembuatan Fraksi Ekstrak Etanol Biji Pinang

Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair. Sebanyak 10 gram ekstrak biji pinang dilarutkan dalam 10 ml etanol 96% dan ditambahkan 65 ml akuades. Campuran dimasukkan ke corong pisah dan ditambah 75 ml *n*-heksana, lalu dikocok perlahan hingga terbentuk 2 lapisan yaitu fraksi *n*-heksana dan fraksi air, lalu dipisahkan dan ditampung fraksi *n*-heksana, direplikasi 3 kali, kemudian dipekatkan menggunakan *waterbath* untuk memperoleh fraksi *n*-heksana. Sisa fraksi air ditambahkan 75 ml etil asetat ke dalam corong pisah lalu dikocok secara perlahan sampai membentuk 2 lapisan yaitu fraksi fase etil asetat dan fraksi air, kemudian pisahkan dan tampung fraksi etil asetat, lakukan replikasi 3 kali dan dipekatkan menggunakan *waterbath* untuk mendapatkan fraksi etil asetat. Fraksi air diuapkan menggunakan *waterbath* hingga mengental. Kemudian timbang masing-masing fraksi untuk mengetahui persen rendemen (Agustia, 2019).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot fraksi}}{\text{Bobot ekstrak}} \times 100\%$$

## 9. Pengujian Kandungan Kimia Ekstrak dan Fraksi Biji Pinang Dengan Uji Tabung

Pemeriksaan kandungan senyawa dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi untuk mendeteksi:

**9.1 Alkaloid.** Sebanyak 2 gram sampel ekstrak dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat, air) ditimbang secara cermat dan dilarutkan dalam 20 tetes larutan HCl 2 N ke dalam tabung reaksi. Campuran dipanaskan dan didinginkan hingga suhu ruang, lalu larutan dibagi masing-masing 1 mL ke dalam tiga tabung reaksi. Reagen berbeda ditambahkan ke setiap tabung untuk menguji keberadaan senyawa alkaloid. Reagen Mayer menunjukkan hasil positif jika terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning berupa kalium alkaloida. Reagen Wagner menunjukkan keberadaan alkaloid dengan terbentuknya endapan cokelat akibat ikatan kompleks antara ion  $K^+$  dan nitrogen. Reagen Dragendorff memberikan hasil positif dengan terbentuknya endapan jingga coklat yang mengindikasikan kandungan alkaloid (Jamilah *et al.*, 2025).

**9.2 Flavonoid.** Sebanyak 0,5 gram sampel ekstrak dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat, air) ditimbang secara teliti dan dimasukkan ke dalam

tabung reaksi. Sebanyak 0,1 gram serbuk magnesium, 3 tetes HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol ditambahkan ke dalam tabung. Campuran dikocok hingga homogen, lalu diamati perubahan warna. Terbentuknya warna jingga sampai merah pada lapisan amil alkohol mengindikasikan keberadaan senyawa flavonoid dalam sampel (Jamilah *et al.*, 2025).

**9.3 Tanin.** Sebanyak 0,5 gram sampel ekstrak dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat, air) ditimbang dengan cermat dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditetesi tiga tetes larutan  $\text{FeCl}_3$ . Terbentuknya larutan hijau kehitaman atau biru kehitaman (biru tua) menunjukkan adanya senyawa tanin (Jamilah *et al.*, 2025).

**9.4 Saponin.** Sebanyak 1 gram sampel ekstrak dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat, air) dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas, lalu didinginkan dan dikocok kuat selama 30 detik. Buih setinggi 1–10 cm yang stabil selama minimal 30 detik menunjukkan indikasi positif adanya saponin. Penambahan satu tetes HCl 2 N menghasilkan buih yang tetap tidak hilang. Larutan HCl meningkatkan kepolaran gugus hidrofil sehingga buih lebih stabil. Buih terbentuk karena gugus hidrofil berikatan dengan air, sedangkan gugus hidrofob berikatan dengan udara (Jamilah *et al.*, 2025).

**9.5 Steroid/Triterpenoid.** Sebanyak 0,5 gram sampel ekstrak dan fraksi (*n*-heksana, etil asetat, air) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard yang terdiri atas asam asetat glasial, kloroform, dan HCl pekat. Larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diamati perubahan warnanya. Reaksi positif ditandai oleh terbentuknya cincin biru kehijauan untuk steroid, sedangkan terbentuknya cincin merah kecokelatan atau violet menandakan keberadaan triterpenoid (Jamilah *et al.*, 2025).

## 10. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk mengidentifikasi senyawa kimia dalam ekstrak tumbuhan, terutama pada fraksi yang menunjukkan aktivitas paling signifikan. Identifikasi didasarkan pada nilai  $R_f$  dan warna noda yang muncul pada plat KLT, yang mencerminkan karakteristik senyawa (Saifudin *et al.*, 2011). Nilai  $R_f$  dihitung dari rasio antara jarak tempuh senyawa dan jarak tempuh pelarut, dengan kisaran ideal 0,2–0,8. Pemisahan senyawa dilakukan berdasarkan perbedaan polaritas. Uji KLT dilakukan pada fraksi etil asetat sebagai fraksi paling aktif. Plat KLT diberi tanda 1 cm dari bawah dan 0,5 cm dari atas, lalu diletakkan tegak dalam chamber berisi eluen

sebagai fase gerak. Setelah pelarut mencapai batas atas, plat dikeringkan, disemprot dengan pereaksi, dikeringkan kembali pada suhu 100 °C selama 5–10 menit, dan diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Kemenkes RI, 2017). Analisis senyawa dilakukan berdasarkan perhitungan nilai Rf dengan rumus:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Identifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam fraksi teraktif pada ekstrak biji pinang untuk uji KLT:

**10.1 Identifikasi senyawa flavonoid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi etil asetat dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%. Larutan sebanyak 5 µL ditotolkan pada bagian bawah pelat KLT menggunakan pipet kapiler, dimulai dari titik kiri setelah diberi garis acuan. Pelat dimasukkan tegak ke dalam chamber kaca berisi eluen fase gerak berupa campuran kloroform:aseton:asam format (7:3:0,4) hingga proses pengembangan selesai. Pelat dikeringkan, disemprot pereaksi sitroborat dan diuapkan dengan uap amonia, kemudian dikeringkan kembali pada suhu 100°C selama 5–10 menit menggunakan kuersetin sebagai pembanding (Sari, 2018).

**10.2 Identifikasi senyawa alkaloid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi etil asetat dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%, dengan piperin sebagai baku pembanding. Sebanyak 5 µL larutan diambil menggunakan pipet kapiler dan ditotolkan pada bagian bawah pelat KLT, dimulai dari titik paling kiri setelah ditandai dengan garis acuan. Pelat KLT dimasukkan secara tegak ke dalam chamber kaca berisi eluen sebagai fase gerak, yaitu campuran kloroform:metanol (17:3), lalu dibiarkan hingga pengembangan selesai. Pelat dikeringkan, disemprot Dagendroff, kemudian dikeringkan kembali pada suhu 100°C selama 5–10 menit (Kemenkes RI, 2022; Hanani, 2015).

**10.3 Identifikasi senyawa Tanin.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi etil asetat dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%, dengan asam galat sebagai baku pembanding. Sebanyak 5 µL larutan diambil menggunakan pipet kapiler dan ditotolkan pada bagian bawah pelat KLT, dimulai dari titik paling kiri setelah ditandai dengan garis acuan. Pelat KLT dimasukkan secara tegak ke dalam chamber kaca berisi eluen sebagai fase gerak, yaitu campuran *n*-butanol:asam asetat (1:9), lalu dibiarkan hingga pengembangan selesai. Pelat dikeringkan, disemprot

$\text{FeCl}_3$ , kemudian dikeringkan kembali pada suhu  $100^\circ\text{C}$  selama 5–10 menit (Shofa, 2020).

**10.4 Identifikasi senyawa steroid/triterpenoid.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi etil asetat dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%, dengan stigmasterol sebagai baku pembanding. Sebanyak 5  $\mu\text{L}$  larutan diambil menggunakan pipet kapiler dan ditotolkan pada bagian bawah pelat KLT, dimulai dari titik paling kiri setelah ditandai dengan garis acuan. Pelat KLT dimasukkan secara tegak ke dalam chamber kaca berisi eluen sebagai fase gerak, yaitu campuran *n*-heksana:etil asetat (8:2), lalu dibiarkan hingga pengembangan selesai. Pelat dikeringkan, disemprot Libermann burchard, kemudian dikeringkan kembali pada suhu  $100^\circ\text{C}$  selama 5–10 menit (Shofa, 2020).

**10.5 Identifikasi senyawa saponin.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak dan fraksi etil asetat dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%, dengan saponin sebagai baku pembanding. Sebanyak 5  $\mu\text{L}$  larutan diambil menggunakan pipet kapiler dan ditotolkan pada bagian bawah pelat KLT, dimulai dari titik paling kiri setelah ditandai dengan garis acuan. Pelat KLT dimasukkan secara tegak ke dalam chamber kaca berisi eluen sebagai fase gerak, yaitu kloroform:*n*-butanol:air (6:3:1), lalu dibiarkan hingga pengembangan selesai. Pelat dikeringkan, disemprot  $\text{FeCl}_3$ , kemudian dikeringkan kembali pada suhu  $100^\circ\text{C}$  selama 5–10 menit (Shofa, 2020).

## **11. Pembuatan Sediaan**

**11.1 Pembuatan larutan stok suspensi CMC Na 0,5%.** Sebanyak 0,5 gram CMC Na 0,5% sebagai kontrol negatif ditimbang lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu dilarutkan menggunakan 30 mL air suling panas. Campuran tersebut diaduk secara terus-menerus selama kurang lebih 30 menit hingga terbentuk larutan koloid yang homogen. Larutan yang telah larut ditambahkan dengan air suling (aquadest) hingga volume mencapai 100 mL.

**11.2 Pembuatan larutan stok kafeina.** Kontrol positif sebanyak 0,5 gram serbuk kafein ditimbang dan digunakan, lalu disuspensikan dalam 100 mL Na-CMC 0,5%, kemudian diaduk hingga larut dan homogen.

**11.3 Pembuatan larutan stok ekstrak biji pinang.** Sebanyak 0,5 gram ekstrak biji pinang ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam mortir. Larutan suspensi CMC Na 0,5% ditambahkan secara bertahap sambil dihancurkan hingga tercampur merata dan membentuk campuran yang homogen. Campuran tersebut kemudian dipindahkan ke dalam labu

erlenmeyer dan ditambahkan larutan CMC Na 0,5% sampai volume akhir mencapai 100 mL, sehingga konsentrasinya 0,5%.

**11.4 Pembuatan larutan stok fraksi *n*-heksana.** Sebanyak 125mg fraksi *n*-heksana ditimbang dan ditambahkan dengan larutan suspensi CMC Na 0,5% secara bertahap sampai tercampur merata dan membentuk campuran yang homogen. Campuran tersebut kemudian dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditambahkan larutan CMC Na 0,5% sampai volume akhir mencapai 50 mL, sehingga konsentrasinya 0,25%.

**11.5 Pembuatan larutan stok fraksi etil asetat.** Sebanyak 125 mg fraksi etil asetat ditimbang dan ditambahkan dengan larutan suspensi CMC Na 0,5% secara bertahap sampai tercampur merata dan membentuk campuran yang homogen. Campuran tersebut kemudian dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditambahkan larutan CMC Na 0,5% sampai volume akhir mencapai 50 mL, sehingga konsentrasinya 0,25%.

**11.6 Pembuatan larutan stok fraksi air.** Sebanyak 250 mg fraksi air ditimbang dan ditambahkan dengan larutan suspensi CMC Na 0,5% secara bertahap sampai tercampur merata dan membentuk campuran yang homogen. Campuran tersebut kemudian dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditambahkan larutan CMC Na 0,5% sampai volume akhir mencapai 50 mL, sehingga konsentrasinya 0,5%.

## **12. Pengujian Aktivitas Tonikum**

Penimbangan awal dilakukan terhadap mencit putih jantan sebelum masa aklimatisasi selama 7 hari. Aklimatisasi bertujuan menyesuaikan fisiologi hewan terhadap lingkungan penelitian. Sebanyak 60 ekor mencit putih jantan (*Mus musculus*) berusia 2–3 bulan dengan berat 20–30 gram digunakan sebagai hewan uji, dalam kondisi sehat dan tanpa cacat. Setiap mencit ditimbang untuk memastikan bobot sesuai kriteria. Hewan uji dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan dengan 5 ekor per kelompok yang dibagi untuk dua metode. Penelitian menggunakan dua metode uji daya tahan fisik, yaitu metode gelantung dan metode renang (*natatory exhaustion*) dengan prosedur berbeda yaitu:

**12.1 Metode Uji renang (metode *natatory exhaustion*).** Mencit menjalani uji renang sebagai pengujian awal sebelum pemberian sediaan uji. Hewan dipuasakan selama 8 jam dengan tetap diberi akses air. Pengujian dilakukan dengan menempatkan mencit ke dalam akuarium berisi air dan mencatat waktu hingga kelelahan sebagai data

awal untuk hari pertama (T0). Memberikan sediaan uji secara oral, lalu mencit diistirahatkan selama 30 menit sebelum menjalani uji renang lanjutan (agar suspensi dapat diabsorpsi oleh tubuh mencit). Mencatat kembali waktu renang mencit sebagai data setelah perlakuan hari kedua (T1), hari ketiga (T2), dan hari keempat (T3). Efek tonikum ditentukan berdasarkan selisih waktu antara data awal dan data setelah perlakuan untuk menilai peningkatan daya tahan fisik. Kelelahan ditandai dengan ketidakmampuan menggerakkan kaki, tubuh tegak di air, ekor diam, dan kepala berada di bawah permukaan air minimal 7 detik.

**12.2 Metode Uji Gelantung.** Mencit menjalani uji gelantung sebelum pemberian sediaan uji dan dipuaskan selama 8 jam dengan tetap diberi akses air minum. Pengujian dilakukan dengan menggantung mencit pada batang besi horizontal sepanjang 50 cm dan setinggi 20 cm dari permukaan meja. Waktu bertahan mencit dalam posisi bergelantung dicatat sebagai data awal untuk hari pertama (T0). Memberikan sediaan uji secara oral, lalu mencit diistirahatkan selama 30 menit sebelum menjalani uji gelantung lanjutan (agar suspensi dapat diabsorpsi oleh tubuh mencit). Mencatat kembali data waktu bergelantung sebagai data setelah perlakuan hari kedua (T1), hari ketiga (T2), dan hari keempat (T3). Efek tonikum ditentukan berdasarkan selisih waktu antara data awal dan data setelah perlakuan untuk menilai peningkatan daya tahan fisik. Kelelahan ditandai dengan ketidakmampuan mencit untuk mencengkeram kawat besi dengan cakar depan ataupun belakang karena kekuatan otot menurun sehingga mencit jatuh, mencit menjadi kurang aktif atau tidak lagi berusaha berpindah posisi di atas kawat besi (penurunan aktivitas motorik), serta penurunan waktu ketahanan (waktu gantung) yang singkat.

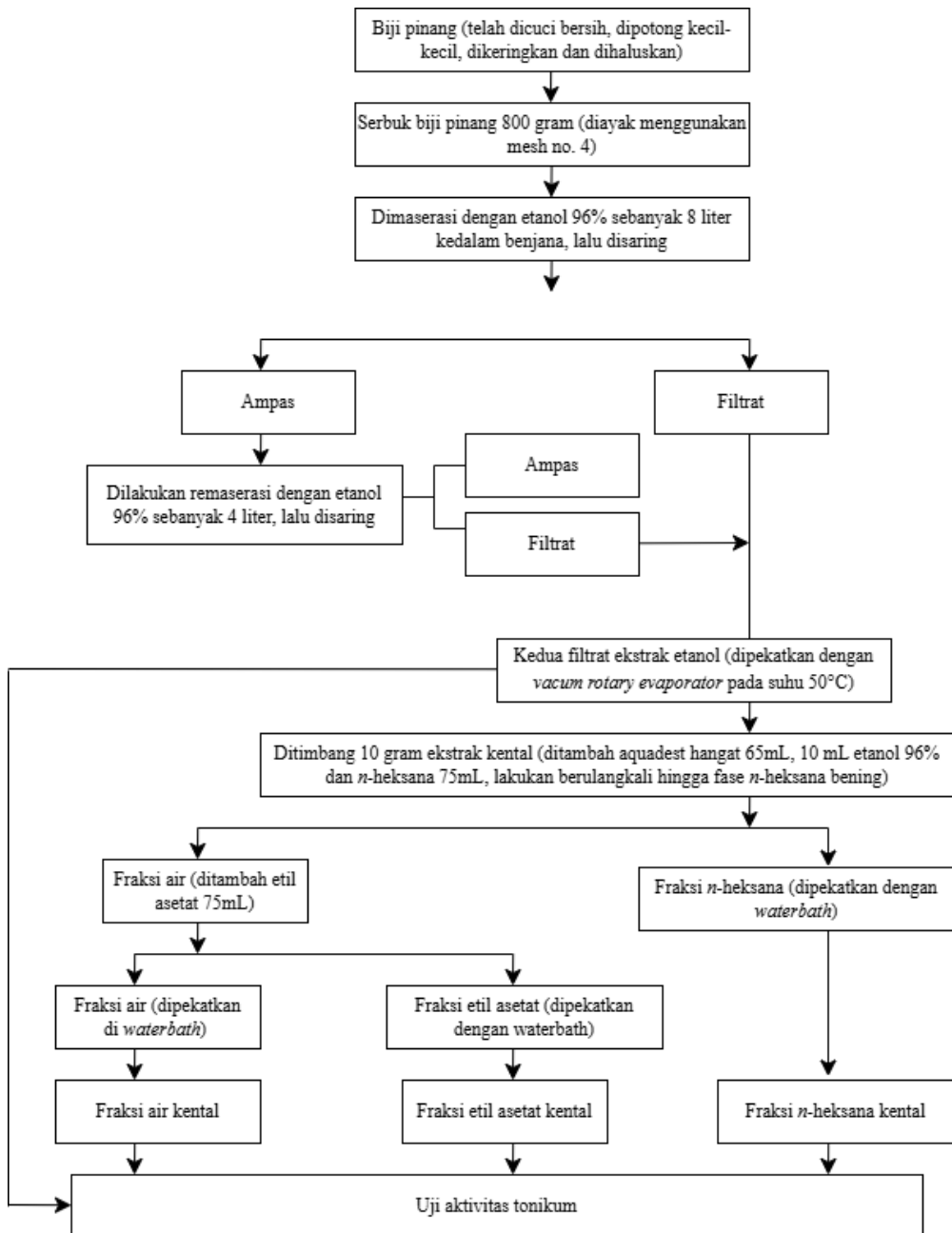
Pembagian kelompok hewan uji yaitu terdiri dari 6 kelompok perlakuan pada mencit putih jantan (*Mus musculus*) seperti berikut:

- Kelompok I : kontrol negatif yang diinduksikan CMC-Na 0,5%
- Kelompok II : kontrol positif yang diinduksikan kafein 2 mg/20g BB mencit
- Kelompok III : diinduksikan ekstrak biji pinang dosis 2 mg/20g BB mencit
- Kelompok IV : diinduksikan fraksi *n*-heksana dosis 0,43mg/20g BB mencit

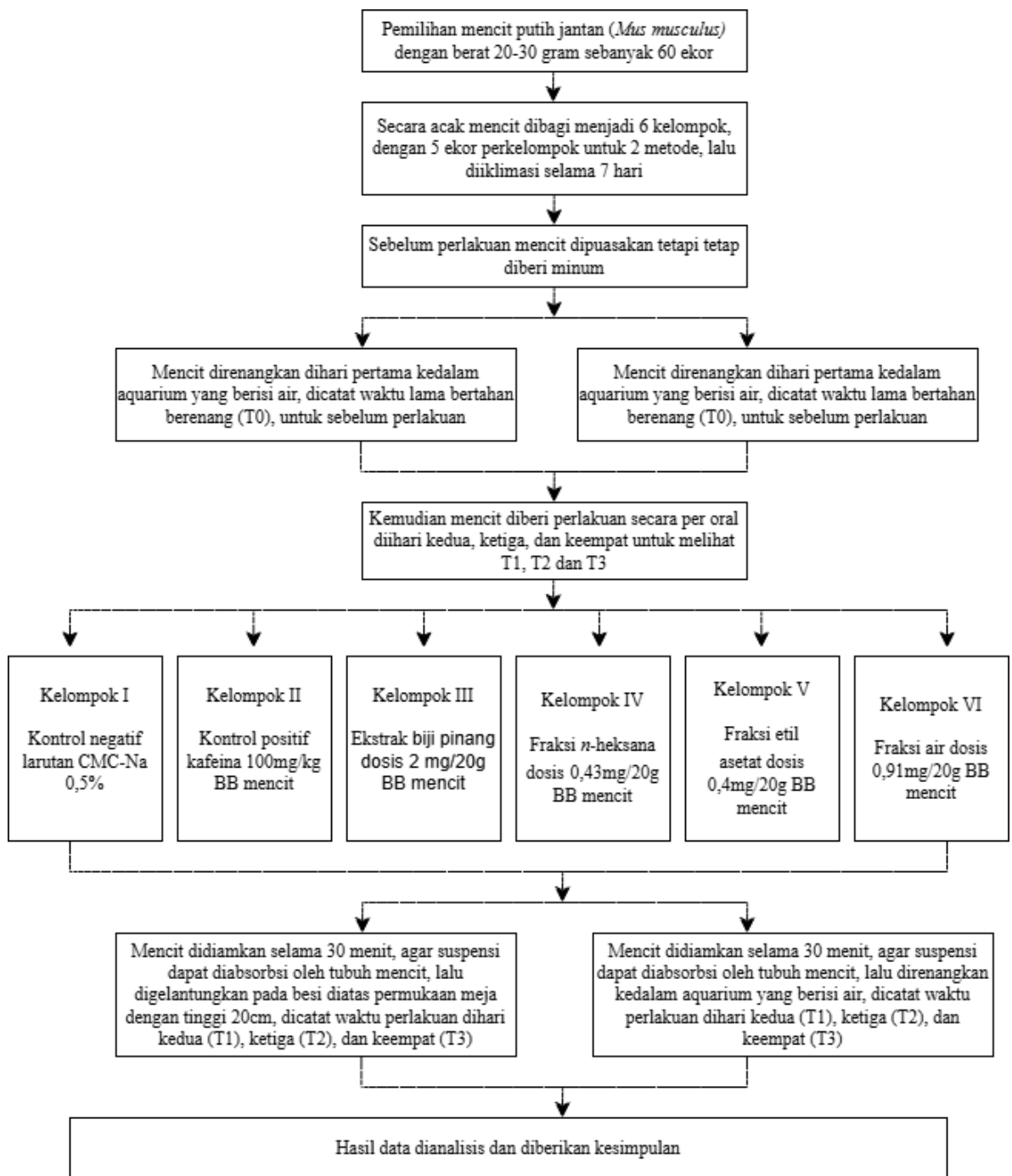
Kelompok V : diinduksikan fraksi etil asetat dosis 0,4mg/20g BB mencit

Kelompok VI : diinduksikan fraksi air dengan dosis 0,91mg/20g BB mencit

### E. Skema Penelitian



Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak dan fraksi biji pinang (*Areca catechu* L.)



Gambar 5. Skema Uji Aktivitas Tonikum

### **F. Analisis Data**

Analisis data yang diperoleh pada penelitian berupa data peningkatan daya tahan tubuh pada mencit putih (*Mus musculus*) jantan. Data analisis dengan menggunakan perangkat lunak SPSS. Data hasil pengukuran pada hari pertama T0, pada hari kedua T1, pada hari ketiga T2 dan hari keempat T3 dianalisis uji *Shapiro-Wilk* Test untuk mengetahui hasil data berdistribusi normal atau tidak. Data yang terdistribusi normal dilakukan uji homogenitas dengan uji Levene Test guna memastikan keberadaan ketidaksamaan varian. Data dikatakan homogen jika nilai  $p > 0,05$ . Data homogen dan normal dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan metode *One Way Anova* dan dilanjutkan pada uji *Tukey* untuk melihat ada tidaknya perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan (Hariyati, 2018).