

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung untuk pembuatan ekstrak lada hitam dan pemeliharaan, pemberian perlakuan serta pengamatan libido mencit jantan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan bulan Agustus 2013.

B. Alat dan Bahan

1. Hewan Uji Penelitian

Penelitian ini menggunakan mencit (*Mus musculus* L.) jantan dan betina yang berasal dari BPPV Regional III. Mencit jantan muda berumur 4 bulan dan mencit jantan tua berumur 6 bulan, masing-masing berjumlah 16 ekor. Mencit betina diperlukan untuk menguji aktivitas seksual mencit jantan yang telah diberikan perlakuan. Mencit betina yang digunakan sebanyak jumlah mencit jantan berusia 2 bulan dan kondisi virgin. Setiap satu ekor mencit betina digunakan untuk melihat perilaku seksual satu mencit jantan.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit dari baskom plastik, penutup kandang dari kawat *screen* (mesh 1 x 1 cm) yang juga menjadi tempat pakan, alas kandang berupa serbuk kayu, tempat minum mencit dari botol plastik yang disumbat pipa aluminium, penggiling, *stopwatch*, kamera digital, bak plastik bundar berwarna hitam, sekat triplek, alat ekstraksi, yaitu Erlenmeyer, gelas Baker, batang pengaduk, gelas ukur, *shaker*, kertas saring, kain saring, corong, mangkok porselen, kompor listrik, dan oven.

3. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah lada hitam, aquades, etanol 95 %, pur ayam, tepung terigu, dan tepung jagung.

C. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini dibedakan menjadi dua, yaitu variabel bebas (*independent variable*) dan variabel terikat (*dependent variable*). Variabel bebas mencakup perlakuan, yaitu perlakuan kontrol (P0), ekstrak air lada hitam (P1), ekstrak etanol lada hitam (P2), dan ekstrak air etanol lada hitam (P3). Variabel terikat mencakup libido mencit jantan, yaitu latensi percumbuan, latensi penunggang, dan frekuensi penunggang.

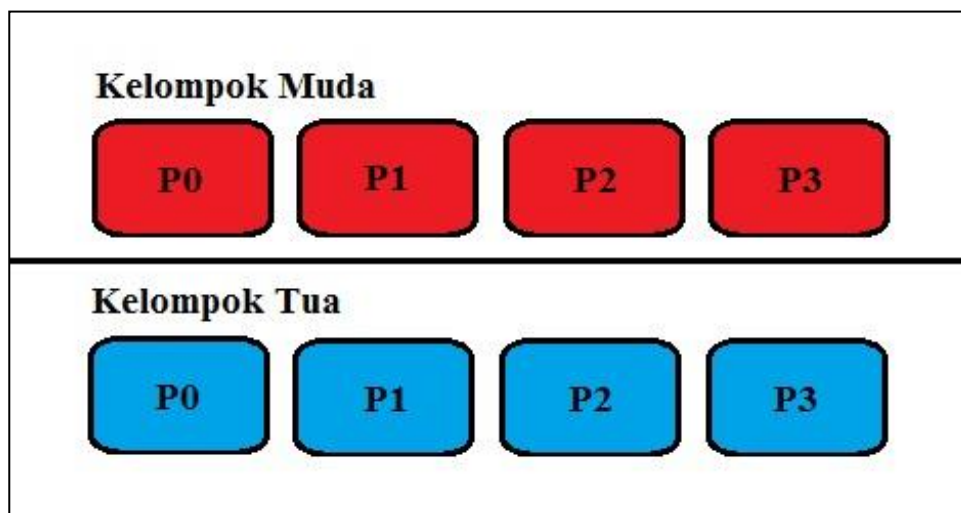
2. Definisi Operasional

Definisi operasional variabel penelitian adalah sebagai berikut:

- Perlakuan kontrol (P0) adalah perlakuan tanpa ekstrak lada hitam yang diberikan pada mencit jantan melalui pakan selama 3 bulan.
- Perlakuan ekstrak air lada hitam (P1) adalah perlakuan ekstrak lada hitam dengan pelarut air yang diberikan pada mencit jantan melalui pakan dengan konsentrasi ekstrak sebesar 0,3 ppt selama 3 bulan.
- Perlakuan ekstrak etanol lada hitam (P2) adalah perlakuan ekstrak lada hitam dengan pelarut etanol yang diberikan pada mencit jantan melalui pakan dengan konsentrasi ekstrak sebesar 0,3 ppt selama 3 bulan.
- Perlakuan ekstrak air dan etanol lada hitam (P3) adalah perlakuan ekstrak lada hitam dengan pelarut air dan etanol yang diberikan pada mencit jantan melalui pakan dengan konsentrasi ekstrak masing-masing sebesar 0,15 ppt selama 3 bulan.
- Latensi percumbuan, yaitu waktu sejak mencit jantan dan mencit betina dipertemukan (sekat dibuka) hingga terjadi percumbuan (penjilatan pada bagian luar alat kelamin mencit betina atau penciuman bagian mulut sampai leher) pertama selama waktu 10 menit.
- Latensi penunggang, yaitu waktu sejak mencit jantan dan mencit betina dipertemukan (sekat dibuka) hingga terjadi penunggang (menaiki mencit betina dari belakang) pertama selama waktu 10 menit.
- Frekuensi penunggang, yaitu banyaknya jumlah penunggang yang dilakukan mencit jantan sejak dipertemukan dengan mencit betina (sekat dibuka) selama waktu 10 menit.

D. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) 2 Faktorial. Mencit uji dibagi menjadi dua kelompok, kelompok muda (K1) dan kelompok tua (K2). K1 adalah kelompok mencit jantan berumur 4 bulan, sedangkan K2 adalah kelompok mencit berumur 6 bulan. Perlakuan terhadap hewan uji terdiri dari empat macam, yaitu kontrol (P0), ekstrak air lada hitam (P1), ekstrak etanol lada hitam (P2), dan ekstrak air etanol lada hitam (P3) melalui pemberian pakan. Setiap perlakuan terdiri dari empat pengulangan. Waktu pemberian pakan adalah selama 3 bulan, sehingga ketika melakukan pengamatan, mencit jantan pada K1 berumur 7 bulan dan K2 berumur 9 bulan. Rancangan penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 8 sebagai berikut.



Gambar 8. Rancangan penelitian

E. Prosedur Kerja

1. Penyediaan dan Pemeliharaan Hewan Uji

Penelitian ini dimaksudkan untuk melihat pengaruh bahan aktif piperin dari tanaman lada hitam (*Piper nigrum* L.) terhadap libido mencit (*Mus musculus* L.) jantan yang berbeda umur, maka mencit yang dijadikan subjek penelitian terdiri dari dua tingkatan umur berbeda, yaitu 4 bulan dan 6 bulan, masing-masing berjumlah 20 ekor. Mencit dipelihara dalam kandang dari baskom plastik dengan penutup kawat *screen* 1 x 1 cm. Selama perlakuan setiap kelompok ulangan mencit dipelihara dalam kandang terpisah (4 mencit dalam satu kandang). Setiap harinya mencit diberikan pakan pur ayam dan air minum dalam wadah botol plastik yang disumbat pipa alumunium. Alas kandang dari serbuk kayu diganti seminggu sekali.

2. Pembuatan Ekstrak Lada Hitam

Buah lada hitam (*Piper nigrum* L.) yang akan dijadikan sumber peningkatan libido akan dibeli langsung dari petani lada di Lampung Utara. Buah lada tersebut dikeringkan di dalam oven sampai benar-benar kering. Setelah benar-benar kering buah digerus sampai menjadi serbuk halus. Serbuk itulah yang akan diekstraksi.

Mengingat bahan aktif buah lada hitam memiliki kelarutan yang berbeda, ada yang larut dalam pelarut air tetapi ada pula yang hanya larut dalam alkohol, maka pada penelitian ini akan dilakukan ekstraksi dengan dua jenis pelarut yaitu air dan etanol. Piperin sangat larut di dalam etanol 95%, tetapi relatif sukar

larut di dalam air (Kohle *et al.*, 2011). Akan tetapi, penggunaan lada hitam sebagai bahan rempah biasanya menggunakan air sebagai media pengolahannya, maka penting pula ekstraksi dengan air dilakukan (Naseri dan Yahyavi, 2007).

Ekstraksi serbuk buah lada hitam dengan pelarut etanol 95% menggunakan teknik maserasi. Setiap 50 gram serbuk lada dimaserasi dengan pelarut etanol 95% sebanyak 500 ml. Serbuk lada hitam tersebut direndam dalam satu per tiga dari 500 ml ethanol 95% menggunakan labu Erlenmeyer selama 3x24 jam pada suhu kamar. Erlenmeyer digoyang menggunakan *shaker* dengan kecepatan rendah. Setiap 24 jam, maserat diambil dan disaring. Residu dimaserasi lebih lanjut dengan pelarut dan proses yang sama sebanyak dua kali. Filtrat disaring lalu diuapkan pada suhu 70°C dalam oven sampai didapatkan ekstrak dalam bentuk pasta. Pasta ini diberi nama sebagai ekstrak etanol.

Ekstraksi air tepung lada hitam dilakukan dengan cara memasukkan 50 gram serbuk lada ke dalam aquades 500 ml mendidih yang telah diangkat dari pemanas. Campuran tersebut diaduk selama 15 menit. Setelah itu dilakukan penyaringan. Filtrat diuapkan dalam oven pada suhu 70°C sampai didapatkan ekstrak dalam bentuk pasta. Pasta ini diberi nama sebagai ekstrak air.

3. Pemberian Perlakuan

Ekstrak lada hitam diujikan pada mencit melalui pemberian pakan. Proporsi campuran ekstrak terhadap pakan tidak melebihi batas aman bahan aktif lada hitam piperin berdasarkan *Material Safety Data Sheet Piperine*, yaitu tidak

melebihi LD 50 yang diberikan secara oral dengan toksisitas akut 330 mg/kg berat badan mencit. Penelitian ini berdasarkan dosis piperin dibawah LD 50, yaitu 200 mg/kg berat badan mencit yang dikonversikan menjadi 0,3 g ekstrak lada hitam pada setiap 1 kg pakan.

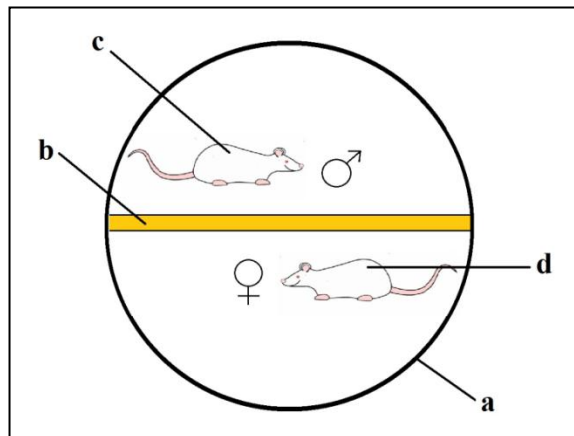
Berdasarkan itu, maka pada setiap 1 kg pakan mencit ditambahkan ekstrak lada hitam sebanyak 0.3 g. Ekstrak dicampur secara merata dengan pakan pur ayam, tepung terigu, dan tepung jagung lalu dicetak ulang untuk memperoleh pelet dalam bentuk batangan berdiameter 0.5-1.0 cm, panjang 4-5 cm dengan berat rata-rata 4-5 g setelah kering. Pakan dengan perlakuan kontrol dan pakan dengan ekstrak lada hitam yang telah berbentuk batangan inilah diberikan pada mencit uji setiap hari selama tiga bulan.

4. Pengamatan Libido dan Pengambilan Data

Setelah mencit diberikan perlakuan selama tiga bulan, maka dilakukan pengujian libido. Parameter uji libido yang diamati, yaitu latensi percumbuan, latensi penunggang, dan frekuensi penunggang. Aktivitas percumbuan diamati dalam batasan perilaku mencit jantan melakukan penjilatan pada bagian luar alat kelamin mencit betina serta penciuman bagian mulut sampai leher dan aktivitas penunggang dengan batasan perilaku mencit jantan pada saat menaiki mencit betina dari belakang.

Pada sore hari sekitar pukul 17.00 WIB, satu mencit betina dimasukkan ke dalam kandang mencit jantan yang awalnya dipisahkan oleh sekat. Setelah 5 menit, sekat yang memisahkan kedua mencit dilepaskan dan dimulai

perekaman aktivitas seksual yang terjadi dengan menggunakan kamera digital dan *stopwatch* selama 10 menit. Data parameter libido diperoleh dengan cara melihat hasil rekaman.



Gambar 9. Pengamatan libido

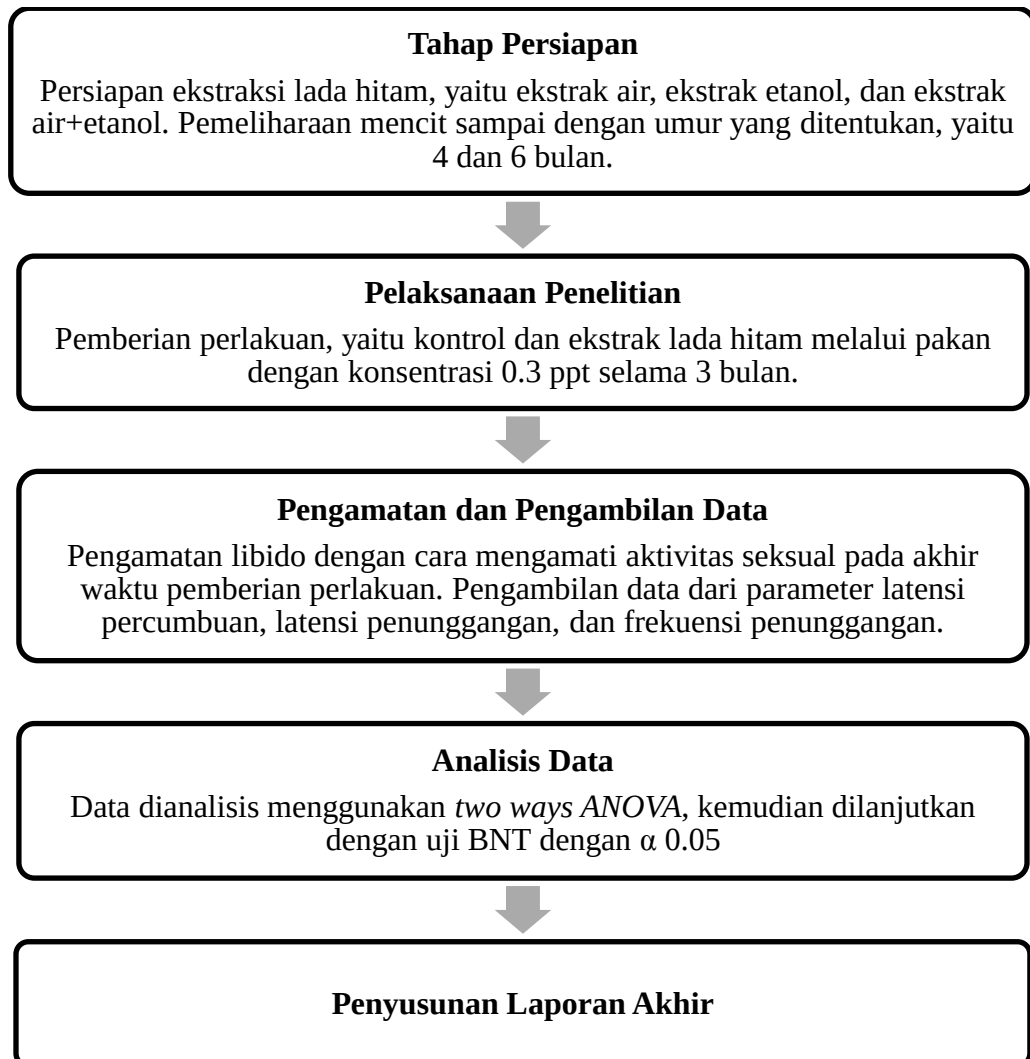
Keterangan gambar:

- a. Kandang uji berupa baskom bundar
- b. Sekat pemisah mencit jantan dan betina
- c. Mencit jantan
- d. Mencit betina

5. Analisis Data

Data hasil pengamatan parameter latensi percumbuan, latensi penunggang, dan frekuensi penunggang dianalisis menggunakan ANARA dua jalur (*two ways ANOVA*). Bila terdapat keragaman yang signifikan maka data diuji lebih lanjut menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf nyata 5%.

F. Diagram Alir Penelitian



Gambar 10. Diagram alir penelitian