

### III. METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan April sampai Agustus 2013 di Laboratorium Zoologi, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Lampung untuk perlakuan mencit, sedangkan untuk pembuatan ekstrak lada hitam dilakukan di Laboratorium Botani, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Lampung.

#### B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit berupa bak plastik berdimensi 40x15x20cm dengan tutup kawat, botol minum, blender, timbangan analitik, neraca, gunting, oven, erlenmeyer, mangkok porselen, kertas saring, serbuk kayu, penggaris, *beaker glass*, *shaker*, stopwatch, kamera, tripleks dan corong.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan umur 4 bulan dan 6 bulan yang dibeli dari Badan Penyidikan dan Pengujian Veteriner (BPPV) Regional III Bandar Lampung, tepung terigu, tepung jagung, aquades, kloroform, etanol 95%, alkohol 70%, tisu, pelet, dan lada hitam yang dibeli langsung dari petani lada di Lampung Utara.

## 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 kognitif mencit jantan, yaitu uji labirin, dan uji renang.

### 2. Definisi Operasional

Definisi operasional variabel penelitian adalah sebagai berikut:

- Perlakuan kontrol (P0), yaitu perlakuan tanpa ekstrak lada hitam yang diberikan pada mencit jantan melalui pakan selama 3 bulan.
- Perlakuan ekstrak air lada hitam (P1), yaitu perlakuan ekstrak air lada hitam yang diberikan pada mencit jantan melalui pakan dengan konsentrasi ekstrak sebesar 0,3 ppt selama 3 bulan.
- Perlakuan ekstrak etanol lada hitam (P2), yaitu perlakuan ekstrak etanol lada hitam 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), yaitu perlakuan ekstrak air lada hitam dan etanol lada hitam yang diberikan pada mencit jantan melalui pakan dengan konsentrasi ekstrak masing-masing sebesar 0,15 ppt selama 3 bulan.

- Uji labirin mencit, yaitu waktu saat mencit di masukkan ke dalam labirin sebagai proses belajar, kemudian menghitung waktu yang di butuhkan mencit untuk keluar dari labirin dengan menemukan umpan yang ada di labirin.
- Uji renang mencit, yaitu waktu saat mencit di masukkan ke dalam bak besar yang sudah berisi air hingga mencit mencit berenang sampai menemukan balok pijakan yang ada di dalam air dengan tanda garis putih.

#### **D. Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan 2 faktorial. Faktor pertama yaitu umur (K1 untuk mencit usia muda (4 bulan) dan K2 untuk mencit usia dewasa (6 bulan).

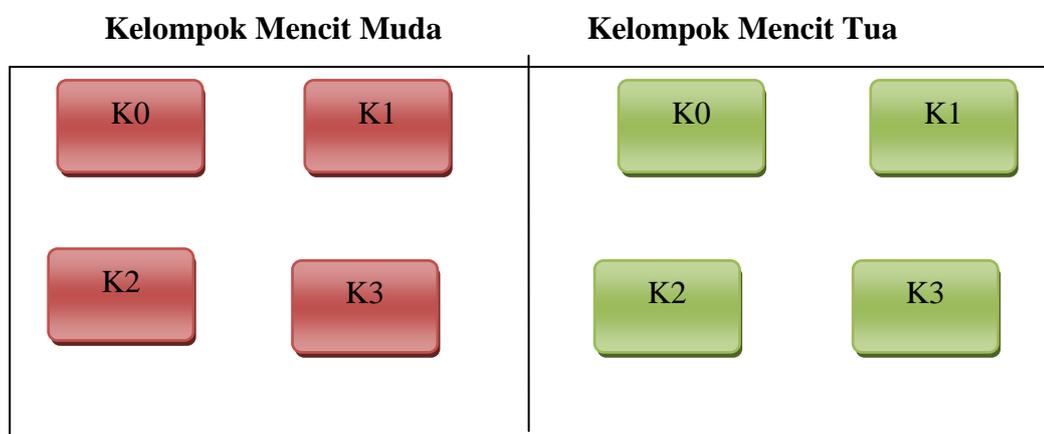
Faktor kedua adalah perlakuan yang terdiri dari 4 kelompok perlakuan.

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. Pola pengelompokkan perlakuan yang dipakai adalah sebagai berikut:

1. K0 adalah kelompok mencit yang diberi pakan pelet dalam bentuk batang sebanyak 5 batangan berdiameter 0,5-1,0 cm yang memiliki berat 4-5 gr tanpa ekstrak lada hitam (kontrol).
2. K1 adalah kelompok mencit yang diberi pakan pelet dalam bentuk batang sebanyak 5 batangan berdiameter 0,5-1,0 cm yang memiliki berat 4-5 gr dengan ekstrak air lada hitam.

3. K2 adalah kelompok mencit yang diberi pakan pelet dalam bentuk batang sebanyak 5 batangan berdiameter 0,5-1,0 cm yang memiliki berat 4-5 gr dengan ekstrak etanol lada hitam.
4. K3 adalah kelompok mencit yang diberi pakan pelet dalam bentuk batang sebanyak 5 batangan berdiameter 0,5-1,0 cm yang memiliki berat 4-5 gr yang dicampur dengan ekstrak etanol dan ekstrak air lada hitam.

Adapun desain penelitian dapat dilihat pada gambar dibawah ini .:



Gambar 6. Desain Penelitian

- Keterangan : -K0 : Kontrol      -K2 : Etanol
- K1 : Air                      -K3 : Campuran (Air+Etanol)

## E. Prosedur Kerja

### 1. Pemeliharaan Hewan Uji

Mencit dipelihara dalam kandang berupa bak plastik yang diberi tutup kawat dengan ukuran 1cm<sup>2</sup>. Dasar kandang diberi serbuk kayu dan dalam satu kandang dipelihara 5 ekor mencit. Selama pemeliharaan, mencit diberi pakan berupa pelet ayam dicampur tepung jagung dan tepung terigu yang dicetak ulang berbentuk batang dengan diameter sekitar 1cm sebagai

langkah habituasi pemberian pakan sebelum perlakuan menggunakan ekstrak lada hitam dan diberi minum dalam botol minum khusus mencit. Sanitasi kandang dan penggantian serbuk kayu dilakukan setiap satu minggu sekali.

## **2. Proses Ekstraksi Lada Hitam**

Buah lada kering diseleksi untuk mendapatkan buah yang benar-benar bernas dengan cara, biji-biji lada itu dimasukkan ke dalam air, biji yang terapung di permukaan air disisihkan (tidak dipakai), sedangkan yang tenggelam diambil untuk diproses lebih lanjut. Biji-biji lada yang bernas (tenggelam) dikeringkan di bawah matahari. Selanjutnya biji-biji tersebut dikeringkan lagi di dalam oven sampai benar-benar kering. Setelah benar-benar kering biji di gerus sampai menjadi serbuk halus, serbuk tersebut kemudian diekstraksi.

Ekstraksi serbuk buah lada hitam dilakukan sebanyak 2 macam yaitu ekstraksi dengan etanol dan ekstraksi dengan air. Untuk ekstraksi dengan etanol digunakan pelarut etanol 95% menggunakan teknik maserasi.

Setiap 5 gram serbuk lada hitam direndam dalam 50 ml etanol 95% menggunakan labu Erlenmeyer selama 24 jam pada suhu kamar. Selama maserasi labu Erlenmeyer digoyang menggunakan *shaker* dengan kecepatan rendah. Setelah 24 jam maserat diambil dan disaring. Residu dimaserasi lebih lanjut dengan pelarut dan proses yang sama hingga tiga kali. Filtrat disaring lalu dipisahkan dengan memasukkan hasil ekstraksi ke dalam oven pada suhu 60°C sampai didapatkan ekstrak dalam bentuk

pasta. Pasta dikeringkan sampai menjadi tepung. Tepung inilah yang disebut sebagai ekstrak etanol.

Ekstraksi dengan air dilakukan dengan cara, 5 gram serbuk lada dimasukkan ke dalam air suling mendidih sebanyak 50 ml selama 15 menit. Setelah itu dilakukan penyaringan. Filtrat diuapkan di dalam oven sampai didapatkan ekstrak dalam bentuk serbuk. Serbuk ini dinamakan sebagai ekstrak air.

Ekstrak lada hitam tersebut kemudian dicampur dengan pakan mencit dengan komposisi 0,3 g dalam setiap 1 kg pakan lalu dicetak kembali. Pakan dicetak membentuk batang dengan panjang 4-5 cm dan diameter 0,5-1 cm. kemudian dikeringkan

### **3. Pembuatan Pakan**

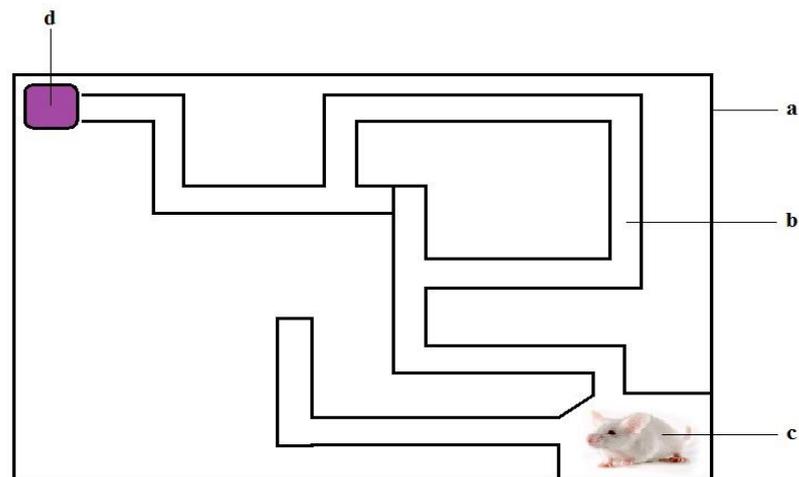
Ekstrak etanol dan ekstrak air lada hitam akan diujikan pada mencit melalui pemberian pakan. Proporsi campuran terhadap ekstrak pakan yang didasarkan pada batas aman bahan aktif lada hitam piperin menurut Hertperdia (2003), yaitu tidak melebihi LD 50 yang diberikan secara oral dengan toksisitas akut 330 mg/kg berat badan mencit. Penelitian ini berdasarkan dosis piperin dibawah LD 50, yaitu 100 mg/kg BB mencit yang dikonversikan menjadi 0,3 g ekstrak lada hitam pada setiap 1 kg pakan.

Berdasarkan itu, maka pada setiap 1 kg pakan mencit akan ditambahkan ekstrak lada hitam sebanyak 0,3 g. ekstrak dicampur secara merata dengan pakan ayam, tepung terigu, dan tepung jagung lalu dicetak ulang untuk

memperoleh pelet dalam bentuk batang yang berdiameter 0,5-1,0 cm, panjang 4-5 cm dengan berat rata-rata 4-5g setelah kering.

#### **F. Parameter yang Diamati**

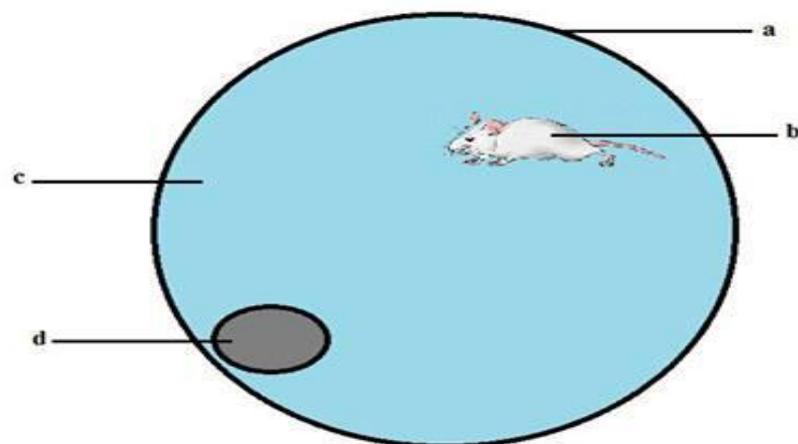
Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kecepatan daya ingat mencit setelah diberi ekstrak lada hitam pada masing-masing perlakuan. Batas parameter uji daya ingat dengan 2 parameter yang diamati yaitu yang pertama dengan menggunakan labirin dengan luas 100x100 cm, labirin merupakan jalur/jalan yang rumit, berliku-liku serta memiliki jalan yang buntu, dimana mencit di masukkan ke dalam labirin sebagai proses belajar, kemudian menghitung waktu yang dibutuhkan mencit untuk keluar dari labirin. Setelah selesai labirin di semprot dengan alkohol untuk menghapus jejak mencit dan dibiarkan beberapa saat sampai kering, dan parameter kedua menggunakan daya ingat (renang) yaitu dengan menggunakan bak besar berisi air dimana di dalam bak yang berisi air akan di letakkan balok di ujung sebagai pijakan mencit yang telah diberi tanda garis berwarna putih sebagai akhir dari uji pengamatan yang diamati, dengan mencatat waktu (detik) tempuh mencit tersebut dengan menggunakan stopwatch dan kamera pada setiap perlakuan yang akan diuji dengan pengulangan sebanyak 5 kali.



Gambar 7. Uji Labirin (penciuman)

**Keterangan :**

- a. Area pengamatan
- b. Labirin (liku perjalanan)
- c. Garisawal
- d. Garisakhir (Umpan)



Gambar 8. Uji Renang

**Keterangan :**

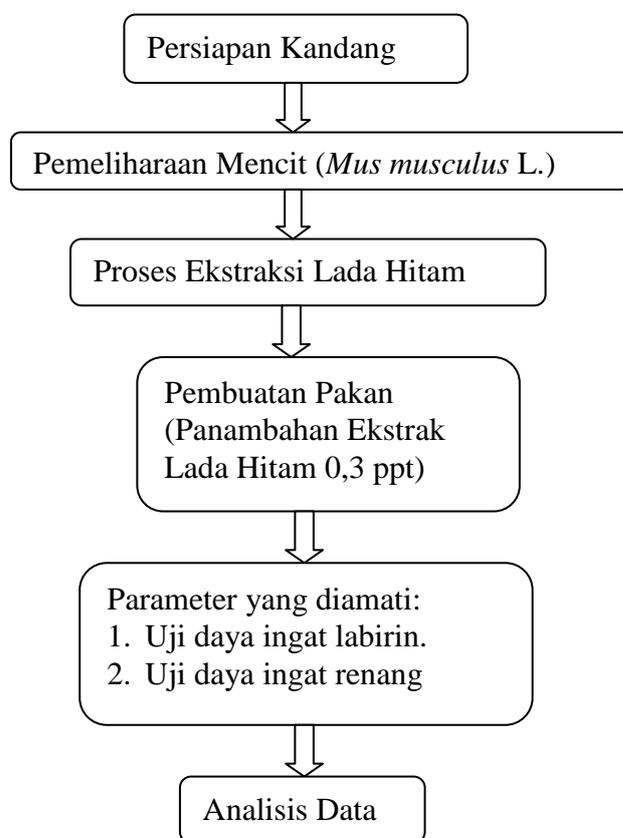
- a. Area pengamatan
- b. GarisAwal
- c. Air
- d. GarisAkhir (balok pijakan)

## G. Analisis Data

Hasil perlakuan mencit uji kognitif labirin dan renang akan dianalisis dengan menggunakan Sidik Ragam 2 Jalur (Two Ways ANOVA) untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan perlakuan. Jika ada perbedaan yang nyata maka akan dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5% untuk mengetahui perbandingan dari masing-masing kelompok.

## H. Diagram Alir Penelitian

Adapun diagram alir penelitian uji kognitif mencit dapat dilihat pada Gambar 9 sebagai berikut;



Gambar 9. Diagram Alir Penelitian