

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *post only control group design*.

B. Tempat dan Waktu

1. Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Patologi-Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

2. Waktu

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret 2018 – Maret 2019

C. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan subjek hewan uji yaitu mencit galur Balb/C berumur 2-3 bulan yang berjenis kelamin jantan dengan berat badan 35-45 gram sebanyak 30 ekor dan didapat dari Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : Dosis piperin
- b. Variabel tergantung : Skoring kerusakan hati, skoring jumlah polimorfonuklear (PMN)
- c. Variabel terkendali : Mencit galur Balb/C berusia 2-3 bulan yang berjenis kelamin jantan dengan berat badan 35-45 gram yang diberi minum dan pakan AD1.

2. Definisi Operasional

- a. Piperin merupakan kristal berwarna kuning yang didapat dari hasil ekstraksi biji lada putih (*Piper nigrum* L) dengan metode sokhletasi dengan pelarut etil asetat.
- b. Skoring kerusakan hati ialah skor yang menggambarkan tingkat kerusakan pada hati yang diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x dan 40x sebanyak 10 lapang pandang. Skoring yang diberikan menurut Manja-Roenigk pada Tabel 1.
- c. Skoring jumlah polimorfonuklear (PMN) ialah skor yang menggambarkan jumlah sel polimorfonuklear yang ditemukan pada organ saat pengamatan yang diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x dan 40x sebanyak 10 lapang pandang. Skoring jumlah polimorfonuklear mengacu Makiyyah (2006) pada Tabel 2.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

Timbangan analitik, blender, ayakan ukuran 60 mesh, toples, alat-alat gelas, corong, pengaduk, *rotary* evaporator, cawan porselin, mortir, stamper, penggaris, pipa kapiler, pipet ukur, pro pipet, kertas saring, alumunium foil, plat silica gel 60 GF₂₅₄, bejana elusi KLT, perangkat sokhletasi, Lampu UV-Vis, spuit, mikroskop.

2. Bahan Penelitian

Biji *Piper nigrum* L, etil asetat, etanol 96%, toluene, kristal piperin standar, larutan formalin 10%, dan *corn oil*.

F. Cara Kerja

1. Isolasi Piperin

a. Pengumpulan Simplisia

Simplisia kering biji lada putih (*Piper nigrum* L) diperoleh dari pasar tradisional Gamping, Bantul, Yogyakarta.

b. Determinasi Tumbuhan

Sebelum penelitian dimulai, terlebih dahulu dilakukan determinasi tanaman untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan adalah benar lada putih. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Ahmad Dahlan.

c. Pembuatan Serbuk

Simplisia kering biji *Piper nigrum* L diperkecil ukurannya dengan ditumbuk menggunakan mortir dan stamper. Serbuk biji *Piper nigrum* L dihaluskan menggunakan blender dan di ayak menggunakan ayakan ukuran 60 mesh sehingga didapat serbuk *Piper nigrum* L yang halus.

d. Sokhletasi

Satu set alat sokhlet disiapkan dan dipasang. Sebanyak 100 mg serbuk simplisia dibungkus dengan menggunakan kertas saring dan diikat pada kedua ujungnya. Serbuk simplisia yang telah dibungkus dan 300 ml etil asetat dimasukkan ke dalam perangkat sokhlet. Proses sokhletasi dilakukan selama kurang lebih 3-5 jam hingga tetesan siklus tidak berwarna atau jernih, sehingga didapatkan ekstrak. Ekstrak yang didapat kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary* evaporator dengan kecepatan 90 rpm pada suhu 50-70°. Ekstrak yang didapat kemudian disimpan dalam wadah yang terlindung dari sinar matahari selama kurang lebih 7 hari. Kristal yang terbentuk kemudian dicuci dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 20 ml dan dibantu dengan pengadukan. Etanol yang digunakan untuk mencuci kemudian dibuang dan kristal piperin yang telah dicuci disimpan dalam wadah baru untuk dikering anginkan.

e. Identifikasi Piperin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi yang dilakukan mengacu pada penelitian Kolhe *et al* (2011) dengan menggunakan fase diam Silika Gel 60 GF₂₅₄ dan fase gerak toluene : etil asetat dengan perbandingan 7:3. Identifikasi dengan KLT dilakukan dengan menggunakan plat silika gel 60 GF₂₅₄ yang telah dipotong dengan ukuran 3x10 cm kemudian ditotolkan kristal piperin yang telah dilarutkan dalam etil asetat dengan bantuan pipa kapiler lalu dielusi dalam fase gerak yang terdapat dalam bejana yang tertutup rapat yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan fase gerak tersebut. Proses elusi dihentikan apabila fase gerak telah mencapai jarak 1 cm sebelum ujung akhir plat kemudian plat dikeluarkan dari dalam bejana dan dikering anginkan. Setelah dikeringkan, bercak pada plat dapat diamati di bawah lampu UV 254 nm.

2. Uji Toksisitas Sub Kronik Piperin

a. Pengelompokan Hewan Uji

Mencit ditimbang dan dikelompokkan menjadi 5 kelompok, yaitu:

- 1) Kelompok 1 : diberikan *corn oil* saja.
- 2) Kelompok 2 : diberikan piperin dosis 17,5 mg/kgBB (P-17,5).
- 3) Kelompok 3 : diberikan piperin dosis 35 mg/kgBB (P-35).
- 4) Kelompok 4 : diberikan piperin dosis 70 mg/kgBB (P-70).

5) Kelompok 5 : diberikan piperin dosis 140 mg/kgBB
(P-140).

b. Persiapan Larutan Uji

Terlebih dahulu dilakukan persiapan larutan uji stok A dan B dengan menimbang piperin dan dilarutkan dalam *corn oil*. Larutan stok A untuk 1 hari berisi 13,615 mg piperin yang dilarutkan dalam 0,85 ml *corn oil*, sedangkan larutan stok B untuk 1 hari berisi 51,17 mg piperin yang dilarutkan dalam 0,88 ml *corn oil*. Dan untuk kontrol hanya diberikan *corn oil* saja.

c. Perlakuan

Larutan uji yang sudah disiapkan akan diberikan kepada masing-masing kelompok. Kelompok kontrol akan diberikan *corn oil* setiap hari selama 21 hari dan kelompok lainnya akan diberikan piperin dengan dosis yang berbeda tiap kelompoknya setiap hari selama 21 hari.

d. Pembedahan

Pembedahan dilakukan pada hari ke-22. Terlebih dahulu mencit dikorbankan menggunakan kloroform. Mencit dibedah dan diambil organ hati dan ginjalnya. Organ tersebut dimasukkan dalam pot organ yang berisi formalin 10% dan dipersiapkan untuk pembuatan preparat histologi organ hati dan ginjal.

e. Pembuatan Preparat Histologi

Pembuatan preparat histologi organ hati dan ginjal dilakukan dengan membuat organ menjadi berukuran ± 3 mm dan dimasukkan ke dalam *embedding cassette*. Dilakukan dehidrasi dengan merendam organ pada alcohol dengan konsentrasi bertingkat kemudian dilakukan *clearing* untuk membersihkan sisa alcohol dengan menggunakan xilol I,II dan III dan dilakukan *impregnasi* menggunakan paraffin I,II dan III. Dilakukan proses *embedding* dengan menggunakan paraffin cair dan didinginkan lalu dilakukan proses *cutting* dengan memotong blok paraffin sebelumnya dengan ketebalan 4-5 mikron dengan menggunakan mikrotom. Selanjutnya dilakukan proses *staining* atau pewarnaan dengan metode Harris Hematoxylin Eosin dan dilanjutkan dengan proses *mounting*. Pembuatan preparat histologi organ hati dan ginjal dilakukan di Laboratorium Patologi-Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

f. Pengamatan Histologi Hati dan Ginjal

Pengamatan histologi organ hati dan ginjal dilakukan sebanyak 10 lapang pandang dengan menggunakan perbesaran 40x10. Perubahan histologi yang akan diamati ialah banyaknya jumlah PMN yang ditemukan serta skoring tingkat kerusakan hati.

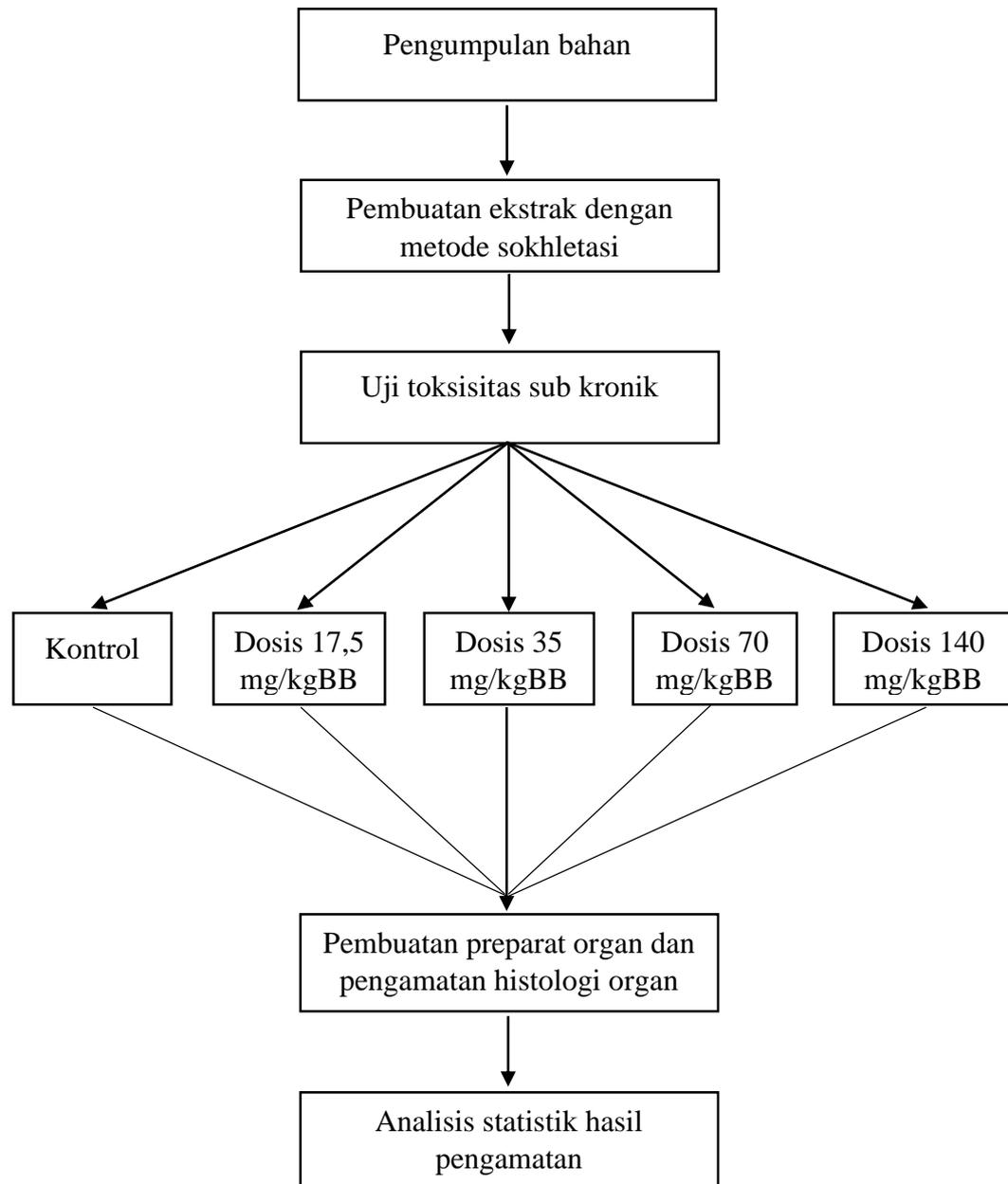
1) Kerusakan hati

Pengamatan kerusakan hati dilakukan dengan menghitung jumlah sel hati normal, sel yang mengalami degenerasi parenkim, degenerasi hidropik dan nekrosis pada masing-masing lapang pandang kemudian dikalikan dengan nilai skor masing-masing sesuai tabel Manja-Roenigk dan dibagi dengan jumlah sel yang diamati pada lapang pandang tersebut. Jumlah sel normal dan yang rusak yang diamati seluruhnya dihitung persentasenya masing-masing.

2) Polimorfonuklear

Pengamatan polimorfonuklear dilakukan dengan menghitung jumlah polimorfonuklear yang terlihat pada masing-masing lapang pandang preparat hati dan ginjal lalu masing-masing lapang pandang diberi skor menurut tabel Makkiyah (2006) dan dijumlahkan seluruhnya lalu dibagi dengan total lapang pandang.

G. Skema Langkah Kerja



H. Analisis Data

1. Isolasi Kristal piperin

Kristal yang diperoleh dari proses ekstraksi dihitung persen rendemennya dengan menggunakan persamaan 1.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot kristal piperin yang didapat}}{\text{Bobot serbuk simplisia yang digunakan}} \times 100\% \quad (1)$$

2. Identifikasi Kristal piperin dengan KLT

Identifikasi dilakukan dengan mengamati bercak dengan menggunakan sinar UV 254 nm kemudian dihitung nilai R_f dengan membagi nilai jarak tempuh solute dengan panjang lintasan fase diam dengan menggunakan persamaan 2. Nilai R_f yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan nilai R_f piperin yang diperoleh dari penelitian sebelumnya. Perhitungan nilai R_f mengikuti persamaan 2.

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut}}{\text{Panjang lintasan fase diam}} \quad (2)$$

3. Analisis statistika

Data hasil skor jumlah PMN dan skor kerusakan hati yang telah didapat dianalisis menggunakan uji Kruskall-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.