

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain *post-only control group*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Proses isolasi piperin dari lada putih (*Piper nigrum L*) serta uji toksisitas dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta (FKIK UMY). Determinasi lada putih dilakukan di bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Pembuatan preparat histologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta. Penelitian dilakukan dari bulan Maret 2018 hingga Januari 2019.

C. Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan subjek hewan uji yaitu mencit galur Balb/C yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (FK UGM) Yogyakarta. Pada penelitian ini menggunakan 30 ekor mencit Balb/C yang berusia 2 hingga 3 bulan, berat badan 35-45 gram dan berjenis kelamin jantan.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a. Variabel bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah empat macam dosis berbeda dari piperin (*Piper nigrum L*) yang akan diberikan secara per oral.

b. Variabel tergantung

Variable tergantung dalam penelitian ini adalah pengamatan berat badan mencit, skor ulkus lambung serta skor integritas kerusakan mukosa lambung.

c. Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu mencit dengan galur yang sama (Balb/C), berusia 2 hingga 3 bulan, berjenis kelamin jantan dan diberi makan serta minum yang sama.

2. Definisi Operasional

a. Piperin adalah kristal berwarna putih kekuningan dari biji lada putih (*Piper nigrum L*) yang diekstraksi menggunakan metode sokletasi dengan pelarut etil asetat dan diidentifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

b. Uji toksisitas subkronik adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui efek toksik dari suatu sediaan uji dengan pemberian dosis berulang yakni satu dosis perkelompok yang dilakukan selama 21 hari serta pengamatan berat badan mencit yang dilakukan 1 minggu sekali.

- c. Pengamatan pada lambung diamati dengan melakukan skoring ulkus lambung (makroskopis) serta membuat preparat histologi dengan metode pewarnaan Hematoksilin & Eosin (HE) kemudian dilakukan skoring integritas kerusakan mukosa lambung (mikroskopis) pada 5 lapang pandang mikroskop dengan perbesaran 10x dan 40x.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat penelitian

Blender (*National*), ayakan ukuran 60 mesh, toples, mortar, stemper, alat-alat gelas (*Pyrex*), timbangan analitik (*Sartorius*), pengaduk, corong, seperangkat alat soklet, cawan porselin, pipet ukur, pipet volume, propipet, penangas, *rotary evaporator* (IKA RV10), kertas saring (*Whatman 40*), aluminium foil (*Brand*), pipa kapiler, plat silika gel 60 GF₂₅₄, Lampu UV 254 nm, bejana, spuit, sonde lambung, pot organ, alat bedah, alat untuk preparat histologi.

2. Bahan Penelitian

Biji lada putih, etil asetat, etanol 96%, toluen, formalin 10%, NaCl 0,9%, *corn oil*, mencit galur Balb/C, makanan (AD1) dan minuman mencit serta Hematoxylin – Eosin.

F. Prosedur Penelitian

1. Pengumpulan bahan

Biji lada putih (*Piper nigrum L*) diperoleh dari daerah Gamping.

2. Determinasi tumbuhan

Determinasi dilakukan di bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

3. Pembuatan serbuk

Biji lada putih (*Piper nigrum L*) ditumbuk dengan mortir dan stemper kemudian diperkecil lagi ukurannya dengan blender. Serbuk yang dihasilkan kemudian diayak dengan ayakan mesh 60 sehingga diperoleh serbuk *Piper nigrum L* yang lebih halus. Semakin luas permukaan bahan, semakin memperbesar terjadinya kontak antara pelarut dan serbuk (Sembiring dkk, 2006).

4. Pembuatan ekstrak menggunakan metode sokletasi

Sebanyak 100 mg serbuk lada putih dibungkus dengan kertas saring. Kemudian dimasukkan pelarut etil asetat 300 ml ke dalam alat soklet beserta serbuk lada putih yang sudah dibungkus sebelumnya. Sokletasi dilakukan kurang lebih 3-5 jam sampai tetesan siklus dalam alat soklet tidak berwarna lagi. Kemudian dilakukan pemekatan ekstrak menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 70°C dengan kecepatan 90 rpm. Evaporasi atau penguapan ini dilakukan untuk mendapatkan ekstrak piperin yang lebih pekat dengan konsentrasi yang lebih tinggi.

5. Isolasi piperin biji lada putih

Ekstrak kental piperin yang diperoleh dari proses evaporasi kemudian didiamkan selama ± 7 hari hingga terbentuk kristal piperin. Selanjutnya dilakukan pencucian kristal piperin menggunakan etanol

96% dan etanol sisa pencucian dibuang. Langkah selanjutnya, kristal piperin yang sudah dicuci kemudian didiamkan selama beberapa hari hingga etanol menguap dan kristal piperin menjadi kering.

6. Identifikasi piperin dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kristal piperin diidentifikasi dengan menggunakan metode KLT . Identifikasi ini dilakukan dengan cara melarutkan kristal piperin kedalam pelarut etil asetat. Setelah itu, larutan uji ditotolkan pada plat silika gel 60 GF₂₅₄ (fase diam) menggunakan pipa kapiler. Fase gerak yang digunakan adalah toluene : etil asetat (7:3). Selanjutnya dilakukan elusi dengan memasukkan plat silika yang sudah ditotolkan larutan uji ke dalam bejana (telah dijenuhkan sebelumnya menggunakan kertas saring) yang sudah berisi fase gerak. Setelah proses elusi selesai, lempeng atau plat silika dikeringkan dan diperiksa bercaknya menggunakan lampu UV 254 nm.

7. Uji toksisitas

a. Aklimatisasi

Sebanyak 30 ekor mencit galur Balb/C berjenis kelamin jantan sehat, berusia 2-3 bulan dengan berat badan 35-45 gram, dilakukan adaptasi di Laboratorium Hewan Uji FKIK UMY dan diberi pakan AD1 serta minum selama 7 hari secara ad libitum sebelum dilakukan perlakuan.

b. Uji toksisitas subkronik

1. Pengelompokan hewan uji

Mencit dibagi menjadi 5 kelompok (sebelumnya sudah dilakukan penimbangan), yaitu:

- a) Kelompok kontrol : diberi *Corn Oil* (K. CO)
- b) Kelompok perlakuan 1 : piperin dosis 17,5 mg/KgBB
(P. 17,5)
- c) Kelompok perlakuan 2 : piperin dosis 35 mg/KgBB
(P. 35)
- d) Kelompok perlakuan 3 : piperin dosis 70 mg/KgBB
(P. 70)
- e) Kelompok perlakuan 4 : piperin dosis 140 mg/KgBB
(P. 140)

2. Persiapan larutan uji

Larutan uji yang digunakan pada kelompok kontrol ialah *Corn Oil* atau minyak jagung sedangkan pada kelompok perlakuan diberikan piperin yang dilarutkan dalam *corn oil* dengan dosis masing-masing. Pada kelompok perlakuan, dibuat larutan stok uji agar volume yang diberikan ke mencit tidak lebih dari 1 ml.

3. Pemberian piperin dan pengamatan berat badan mencit

Pemberian piperin pada mencit Balb/C dilakukan secara peroral selama 21 hari. Penimbangan berat badan mencit dilakukan satu minggu sekali untuk dibandingkan antara sebelum perlakuan dan setelah perlakuan. Mencit yang mati sebelum hari terakhir perlakuan diambil organ lambungnya, dicuci

dengan NaCl 10% dan dilakukan skoring ulkus (kriteria Bancroft & Cook). Lambung difiksasi menggunakan formalin 10%.

4. Pembedahan mencit dan pengamatan histologi lambung

Mencit dideterminasi menggunakan kloroform pada hari ke-22. Organ lambungnya diambil, dicuci menggunakan NaCl 0,9% dan dilakukan pengamatan skor ulkus lambung (makroskopis) menurut kriteria Bancroft & Cook (1984) pada tabel 1 dan 2. Lambung difiksasi menggunakan formalin 10% kemudian persiapan pembuatan preparat histologi.

Tabel 1. Penilaian Berdasarkan Jumlah Ulkus (J)

KEADAAN	NILAI SKOR
Normal (tidak ada ulkus)	1
Timbul kemerahan	1,5
Timbul Bintik perdarahan	2
Ada ulkus terhitung sejumlah 1-3	3
Ada ulkus terhitung sejumlah 4-6	4
Ada ulkus terhitung sejumlah 7-9	5
Ada ulkus terhitung sejumlah >9 atau perforasi	6

Tabel 2. Penilaian Berdasarkan Keparahan Ulkus (K)

KEADAAN	NILAI SKOR
Normal (tidak ada ulkus)	1
Timbul kemerahan	1,5
Timbul bintik perdarahan atau ada ulkus dengan panjang < 0,5 mm	2
Ada ulkus dengan panjang 0,5-1,5 mm	3
Ada ulkus dengan panjang 1,6-4,0 mm	4
Ada ulkus dengan panjang >4,0 mm	5
Sudah ada perforasi	6

a. Pembuatan preparat histologi

Pembuatan preparat histologi lambung dilakukan dengan cara memotong organ lambung dengan ukuran sekitar 0,3 x 0,3 x 0,3 cm kemudian organ direndam dalam formalin 10% dan dilakukan hidrasi serta *clearing* dengan satu sesi larutan yang terdiri atas : alkohol dengan 4 konsentrasi berbeda yakni 70%, 80%, 90%, 96%, alkohol absolut, toluene dan paraffin secara bertahap dalam waktu satu hari. Sampel organ kemudian di *blocking* dengan *embedding* set yang dituangi paraffin cair dan setelah itu didinginkan. Blok paraffin menggunakan microtome dengan ketebalan \pm 4-5 mikron.

Selanjutnya dilakukan pewarnaan menggunakan metode Harris Hematoxylin – Eosin dan *mounting* media (Maria dkk, 2017). Pembuatan preparat histologi ini dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta.

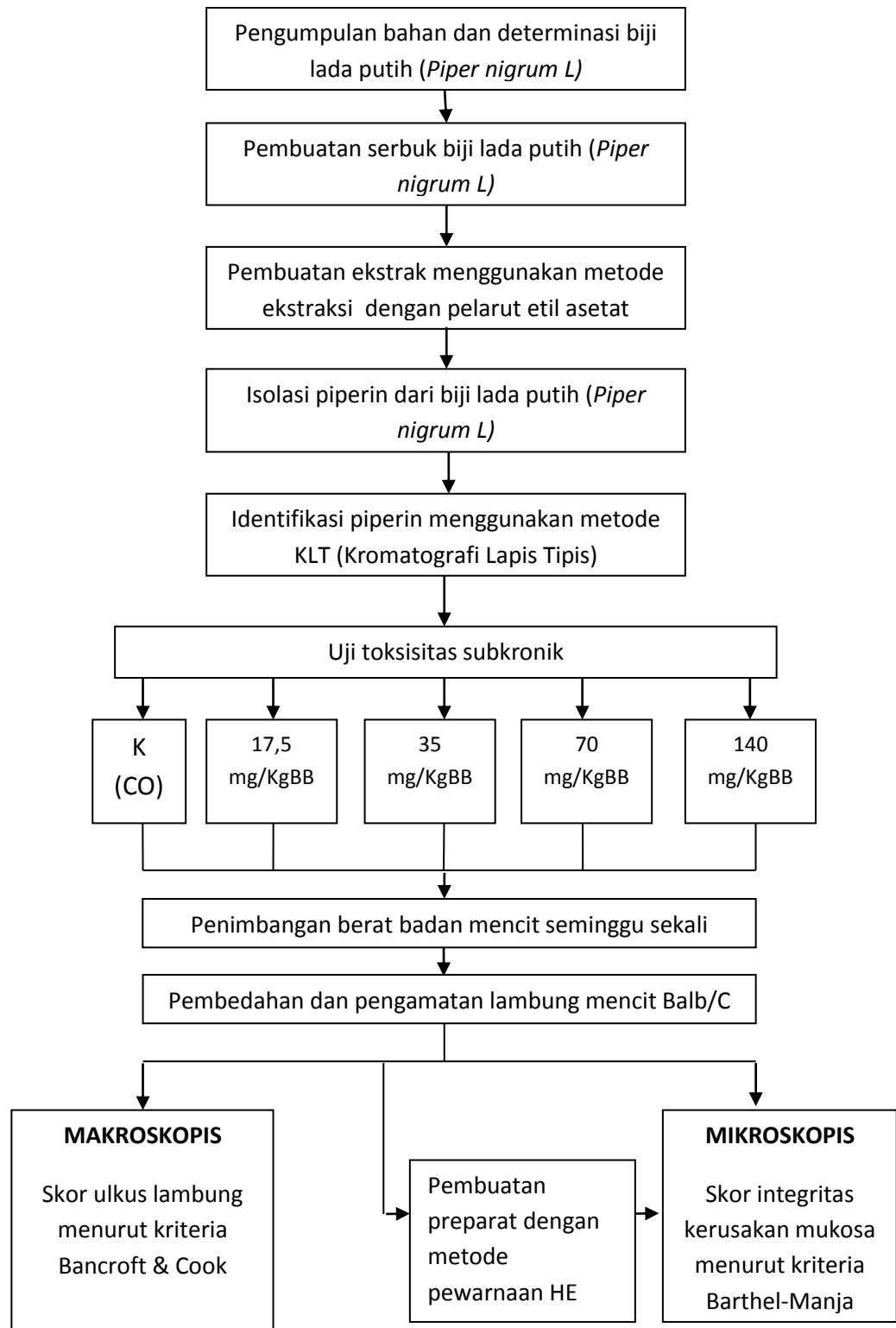
b. Pengamatan histologi lambung

Pengamatan histologi lambung dilakukan pada 5 lapang pandang mikroskop dengan perbesaran 10x dan 40x. Pengamatan yang dilakukan ialah skoring integritas kerusakan mukosa menurut kriteria Barthel-Manja pada Tabel 3.

Tabel 3. Indikator Kerusakan Integritas Mukosa Lambung

No.	Skor	Integritas Mukosa
1	0	Tidak ada perubahan patologik
2	1	Deskuamasi epitel
3	2	Erosi permukaan Epitel
4	3	Ulserasi epitel

G. Skema Langkah Kerja



H. Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji toksisitas subkronik adalah data kuantitatif yaitu berupa berat badan mencit, jumlah skoring ulkus lambung dan skoring kerusakan mukosa. Data jumlah skor ulkus lambung dan skor kerusakan mukosa dianalisis menggunakan *Krusal-Wallis Test* dan dilanjutkan dengan *Mann-Whitney Test*. Data berat badan mencit menggunakan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan *Post-Hoc*. Uji-uji tersebut bertujuan untuk melihat ada tidaknya perbedaan secara signifikan antar kelompok.