

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

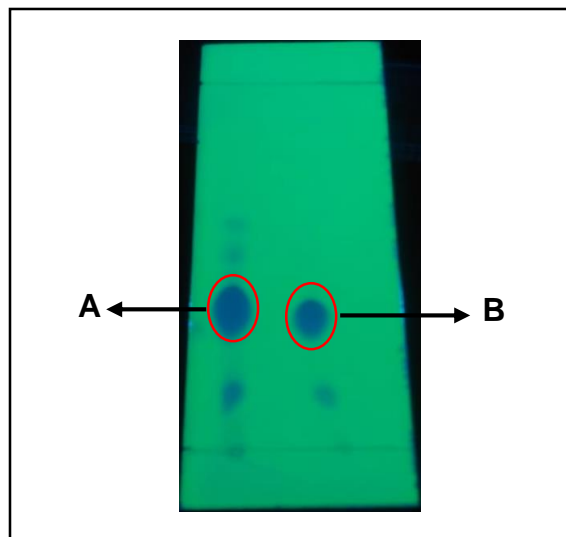
Penelitian Uji Toksisitas Sub Kronik Piperin dalam Lada Putih (*Piper nigrum L*) telah selesai dilakukan. Uji toksisitas sub kronik bertujuan untuk mengetahui efek toksik dari suatu sediaan uji dengan pemberian dosis berulang secara oral kepada hewan uji selama tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan uji (BPOM, 2014). Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini ialah biji lada putih (*Piper nigrum L*) sebanyak 1 kg yang selanjutnya dibuat menjadi serbuk lada putih (*Piper nigrum L*) sebanyak 676,18 gram dan diekstraksi menggunakan metode sokhletasi.

Sokhletasi merupakan salah satu metode ekstraksi dengan prinsip perendaman dan pemanasan sampel, hal tersebut menyebabkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel akibat adanya perbedaan tekanan antara bagian dalam dan luar sel sehingga zat yang terkandung dalam sitoplasma akan terlarut ke dalam pelarut organik (Depkes RI, 2006). Dalam prosesnya, ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa hal yang diantaranya suhu, ukuran partikel, jenis pelarut, waktu ekstraksi dan metode ekstraksi (Istiqomah, 2013). Pemilihan metode ekstraksi didasarkan pada sifat bahan dan tingkat kesesuaian dengan masing-masing metode ekstraksi serta kepentingan untuk mendapatkan ekstrak yang mendekati sempurna (Ansel, 1989).

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi ialah etil asetat. Pemilihan etil asetat sebagai pelarut dikarenakan sifatnya yang semi polar sehingga dapat menarik senyawa polar maupun non polar dalam sampel (Susanti *et al*, 2012). Selanjutnya dilakukan evaporasi menggunakan evaporator pada suhu 70° C guna mendapat ekstrak piperin yang pekat dan setelah itu ekstrak disimpan dalam wadah tertutup dan dijauhkan dari sinar matahari guna mendapatkan kristal piperin. Kristal piperin dicuci menggunakan etanol 96% untuk menghilangkan pengotor sehingga didapatkan kristal piperin sebanyak 15,12 gram. Rendemen yang didapat dari ekstrak tersebut ialah 2,23%. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran 3.

Kristal piperin yang telah didapat diidentifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis. Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu cara yang dilakukan untuk mengetahui kemurnian kandungan dari suatu senyawa (Harbone, 1987) dan juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa (Farmakope Herbal Indonesia, 2008). Keuntungan menggunakan metode KLT diantaranya adalah dapat menganalisis beberapa sampel secara simultan dengan menggunakan fase gerak yang lebih sedikit sehingga lebih menghemat biaya dan lebih ramah lingkungan, selain itu metode ini memiliki teknik yang cukup sederhana dengan penggunaan alat yang minimal (Wulandari, 2011). Identifikasi dilakukan dengan membandingkan nilai R_f pada standar piperin dengan piperin hasil ekstraksi dan dilakukan pengamatan di bawah lampu UV 254 nm. Berdasarkan perhitungan nilai R_f (dapat dilihat pada Lampiran 3) didapatkan nilai R_f piperin hasil ekstraksi ialah sebesar 0,35 Sedangkan nilai R_f dari standar piperin ialah sebesar 0,4. Nilai tersebut

tidaklah jauh berbeda antara piperin hasil ekstraksi dengan standar piperin yang dijadikan sebagai pembanding. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi elusi pada KLT diantaranya struktur kimia dari senyawa yang akan dipisahkan, pelarut dan derajat kemurniannya, jumlah sampel yang digunakan, serta faktor suhu (Sastrohamidjojo, 1985). Hasil kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil kromatografi lapis tipis untuk identifikasi kandungan piperin dalam *Piper nigrum* L. (A) hasil ekstraksi dan (B) piperin standar

Subjek uji yang digunakan untuk penelitian ini ialah mencit galur Balb/C berumur 2-3 bulan dengan berat badan 35-45 gram. Pada usia tersebut mencit dapat dikatakan dewasa sehingga fungsi organnya diharapkan sudah baik (Malole, 1989).

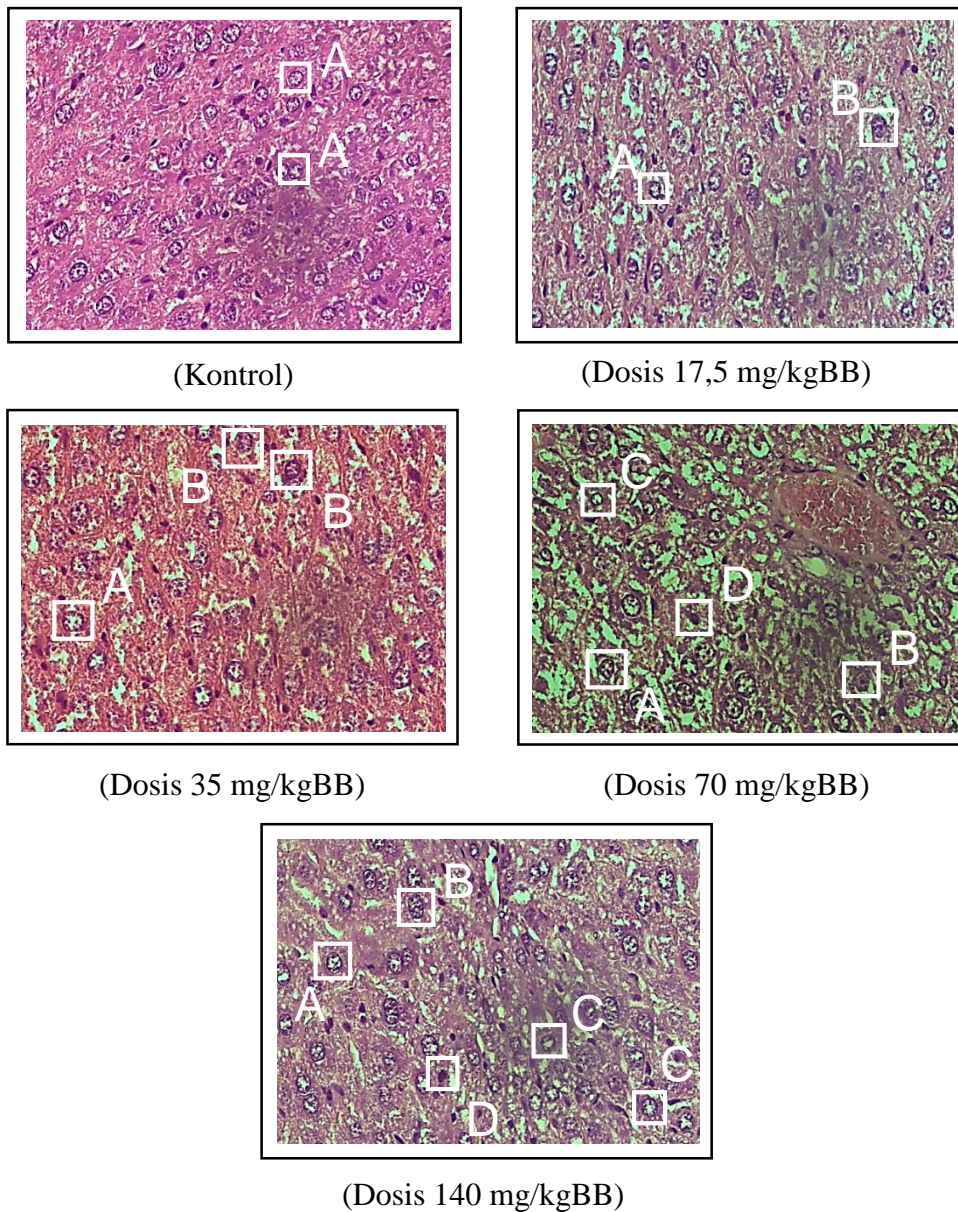
Dosis piperin yang diberikan yaitu 17,5 mg/kgBB; 35 mg/kgBB; 70 mg/kgBB dan 140 mg/kgBB dengan larutan pembawa *corn oil*. Pemilihan dosis pemberian piperin didasarkan pada Wadhwa (2014) yang menyatakan bahwa pemberian piperin sub kronik selama 7 hari pada dosis 100 mg/kgBB tidak

menimbulkan efek toksik. Pemilihan *corn oil* sebagai larutan pembawa didasarkan pada Singh *et al* (2010) yang menyatakan bahwa *corn oil* pada dosis 10 ml/kgBB dapat digunakan sebagai larutan pembawa untuk uji toksisitas dan tidak menimbulkan perubahan fisik apapun pada subjek. Pemberian ekstrak piperin dilakukan menggunakan sonde selama 21 hari secara terus-menerus secara peroral

Pada hari ke-22 seluruh mencit yang masih hidup dikorbankan dengan menggunakan kloroform secara inhalasi. Penggunaan kloroform merupakan cara yang sering dilakukan dan dinilai terbaik karena prosesnya cepat dan tidak menimbulkan tanda luka pada kondisi fisik hewan uji (Malole, 1989). Organ hati dan ginjal diambil dan selanjutnya difiksasi sebelum dilakukan pembuatan preparat dengan menggunakan formalin 10%. Formalin biasa digunakan untuk mengawetkan spesimen hayati, hal tersebut dikarenakan formalin dapat bergabung dengan protein dalam jaringan sehingga membuat keras dan tidak larut dalam air, hal tersebut dapat mencegah terjadinya pembusukan pada spesimen (Wilbraham, 1992).

Pembuatan preparat organ hati dan ginjal dilakukan dengan menggunakan metode pewarnaan Harris Hematoxylin-Eosin (HE). Hematoxylin-Eosin merupakan metode pewarnaan yang sering digunakan dalam hal pewarnaan jaringan. Hematoxylin bekerja sebagai pewarna basa yang mewarnai inti dan struktur basa lainnya pada sel menjadi warna biru, sedangkan Eosin bekerja sebagai pewarna asam yang akan mewarnai jaringan maupun struktur asam pada sel menjadi warna merah muda (Junquiera, 2007).

Data hasil pengamatan kerusakan hati pada kelompok kontrol dan perlakuan dapat dilihat pada Gambar 4. Data persentase kerusakan sel hati dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 4. Gambaran melintang histologi hati pada perbesaran 40x10 kali. Pada gambaran histologi dapat terlihat sel normal (A), degenerasi parenkim (B), degenerasi hidropik (C) dan nekrosis (D).

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopik hati, terlihat bahwa pada kelompok kontrol terdapat sel hati yang normal dengan inti sel yang masih terlihat jelas dan sitoplasma yang tidak keruh serta bentuknya yang masih normal. Pada dosis 17,5 mg/kgBB dan dosis 35 mg/kgBB terlihat adanya sel yang mengalami degenerasi parenkim. Pada dosis 70 mg/kgBB terlihat adanya degenerasi hidropik pada sel dan pada dosis 140 mg/kgBB sudah timbul nekrosis sel hati.

Tabel 3. Persentase Jumlah Sel Hepar Normal dan Sel Hepar yang Mengalami Kerusakan Setelah Pemberian Piperin

Kelompok	Jumlah Sel Normal (%)	Jumlah Sel Rusak (%)		
		Degenerasi Parenkim	Degenerasi Hidropik	Nekrosis
Kontrol	91	5,54	1,1	2,35
Dosis 17,5 mg/kgBB	66,67	24,46	2,56	6,3
Dosis 35 mg/kgBB	36,04	47,75	5,76	10,45
Dosis 70 mg/kgBB	26,58	48,66	10,72	14,03
Dosis 140 mg/kgBB	13,23	53,47	12,1	21,19

Berdasarkan data pada Tabel 3. dapat dilihat bahwa jumlah sel normal pada kelompok kontrol lebih banyak (66,67%) dibanding sel yang mengalami degenerasi parenkim, degenerasi hidropik dan nekrosis. Hasil penelitian Syafitri (2018) menunjukkan bahwa persentase jumlah sel normal pada kelompok kontrol ialah 78,58% yang berarti tetap terjadi kerusakan pada sel hepar pada kelompok kontrol. Kerusakan sel pada kelompok kontrol dapat diakibatkan oleh kondisi awal organ hati hewan uji atau kondisi hati yang telah mengalami kerusakan sebelumnya. Selain itu faktor lain yang dapat menyebabkan kerusakan hati pada kelompok

kontrol ialah faktor psikologi hewan uji, penyakit yang menyerang hewan uji selama perlakuan, proses pembuatan preparat yang kurang sempurna maupun faktor imunitas dari hewan uji tersebut (Setiawati, 2007).

Pada kelompok dosis 17,5 mg/kgBB , 35 mg/kgBB dan 70 mg/kgBB memiliki jumlah sel yang mengalami kerusakan lebih sedikit dibandingkan pada dosis 140 mg/kgBB. Pada kelompok dosis 140 mg/kgBB jumlah sel hati yang mengalami degenerasi parenkim lebih banyak (53, 47%) dibanding dengan sel yang mengalami degenerasi hidropik (12,1%) dan sel yang mengalami nekrosis atau kematian (21,19%). Jumlah sel yang mengalami nekrosis pada kelompok dosis 140 mg/kgBB memiliki jumlah paling banyak dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal tersebut dapat disebabkan karena tingginya dosis piperin yang diberikan kepada hewan uji selama perlakuan sehingga terakumulasi dan menjadi toksik. Pada dosis yang tinggi kandungan tersebut dapat menimbulkan reaksi yang dapat menyebabkan terjadinya nekrosis atau kematian sel (Mitchell, 2008).

Degenerasi parenkim merupakan tingkat degenerasi ringan dan bersifat reversible, degenerasi ini terjadi pada bagian mitokondria dan juga retikulum endoplasma akibat suatu rangsangan yang menyebabkan oksidasi (Widyarini, 2010). Hal tersebut menyebabkan terjadinya kegagalan oksidasi dan menyebabkan tertimbunnya protein di dalam sel sehingga mengganggu transportasi protein yang telah diproduksi oleh ribosom. Hal tersebut menyebabkan terjadinya pembengkakan sel sitoplasma yang diikuti dengan pengeruhan sitoplasma dengan munculnya granul-granul dalam sitoplasma yang diakibatkan oleh endapan protein

(Tamad *et al*, 2011). Degenerasi parenkim digambarkan dengan adanya sel hepatosis yang mengalami pembengkakan (ukuran lebih besar dari sel normal) dengan sitoplasma yang bergranul merah sebagai tanda terjadinya penumpukan protein (Tamad *et al*, 2011).

Degenerasi hidropik merupakan degenerasi yang serupa dengan degenerasi parenkim dan juga bersifat reversible. Namun derajat degenerasi hidropik lebih parah dibandingkan dengan degenerasi parenkim, hal tersebut karena pada degenerasi hidropik vakuola tampak berisi air dalam sitoplasma yang tidak mengandung lemak atau glikogen (Tamad *et al*, 2011). Degenerasi hidropik ditandai dengan sel hepatosit yang bervakuola dan terisi air dalam sitoplasmanya, degenerasi ini terjadi karena adanya gangguan transport aktif yang mengakibatkan sel tidak dapat memompa ion Na^+ keluar dan menyebabkan konsentrasi ion Na^+ dalam sel meningkat, hal tersebut berpengaruh pada proses osmosis yang menyebabkan influks air ke dalam sel yang mengakibatkan sel akan membengkak (Mitchell *et al*, 2008). Menurut Kumar *et al* (2013) gambaran sel hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik ditandai dengan terjadinya pembengkakan sel.

Nekrosis ialah kematian sel atau jaringan pada makhluk hidup (Amalina, 2009). Sel yang mengalami nekrosis atau kematian pada sel memiliki perubahan pada intinya, seperti karioreksis (fragmentasi material isi), kariolisis (kromatin inti menjadi lisis) dan piknotik (penggumpalan kromatin) (Widyarini, 2010). Menurut Kumar *et al* (2010) inti hepatosit yang mengalami nekrosis atau kematian menjadi terlihat lebih kecil dengan kromatin dan serabut retikuler menjadi berlipat-lipat,

selain itu inti menjadi lebih padat (piknotik) yang dapat hancur bersegmen-segmen (karioreksis) dan kemudian sel menjadi eosinofilik (kariolisis).

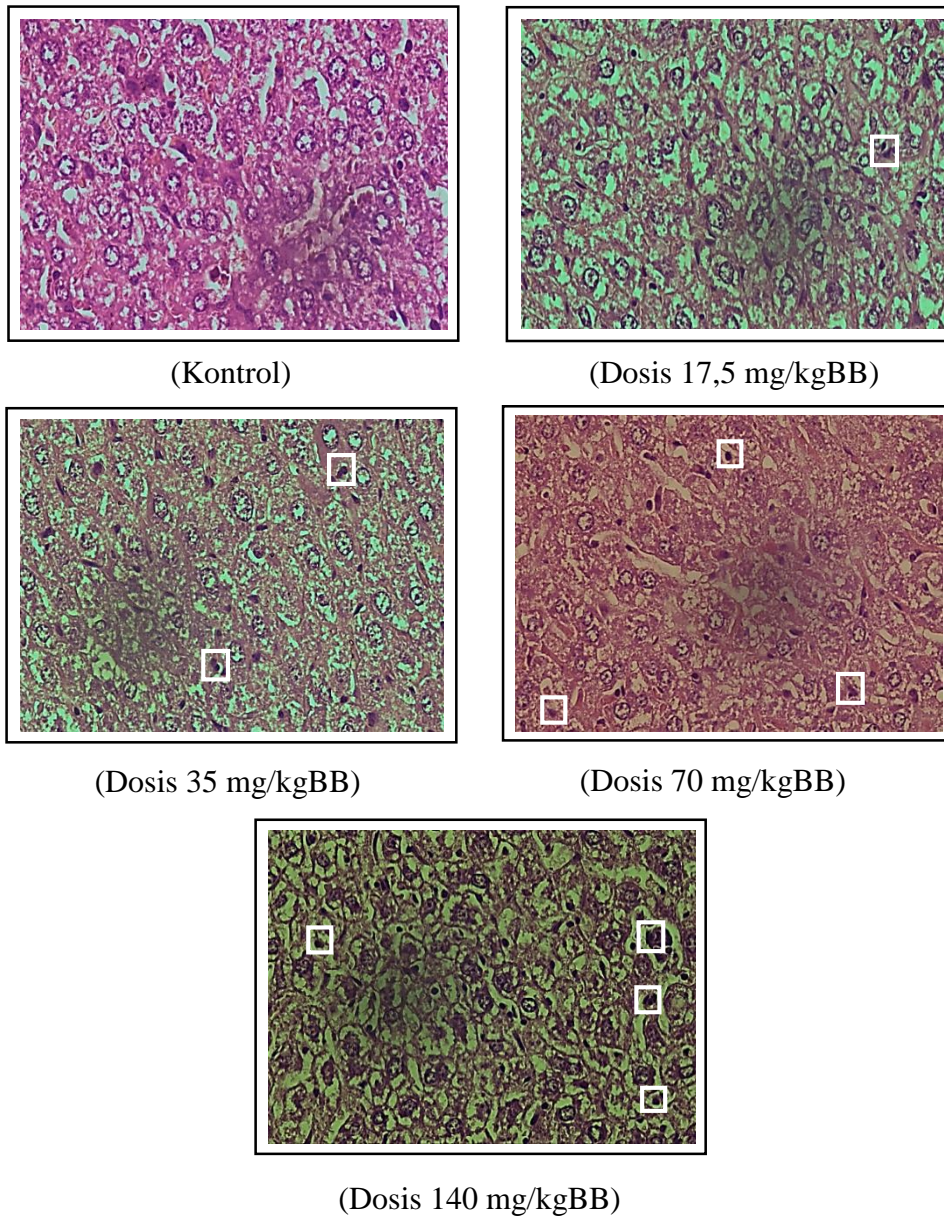
Hasil data skor kerusakan hati selanjutnya dianalisis dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Hasil uji statistik skor kerusakan hati dapat dilihat pada Tabel 4. Hasil uji statistik menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Perbedaan yang signifikan juga terlihat antara kelompok dosis 17,5 mg/kgBB, 35 mg/kgBB dan 140 mg/kgBB. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok dosis 35 mg/kgBB dengan dosis 70 mg/kgBB. Kelompok dosis 140 mg/kgBB memiliki nilai rata-rata skor kerusakan hati tertinggi dibanding dengan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan lainnya yang berarti pada dosis tersebut terjadi kerusakan hati yang paling parah dibandingkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan lainnya. Hal tersebut dapat terjadi karena tingginya kadar piperin.

Tabel 4. Data Rata-rata Skor Kerusakan Hati

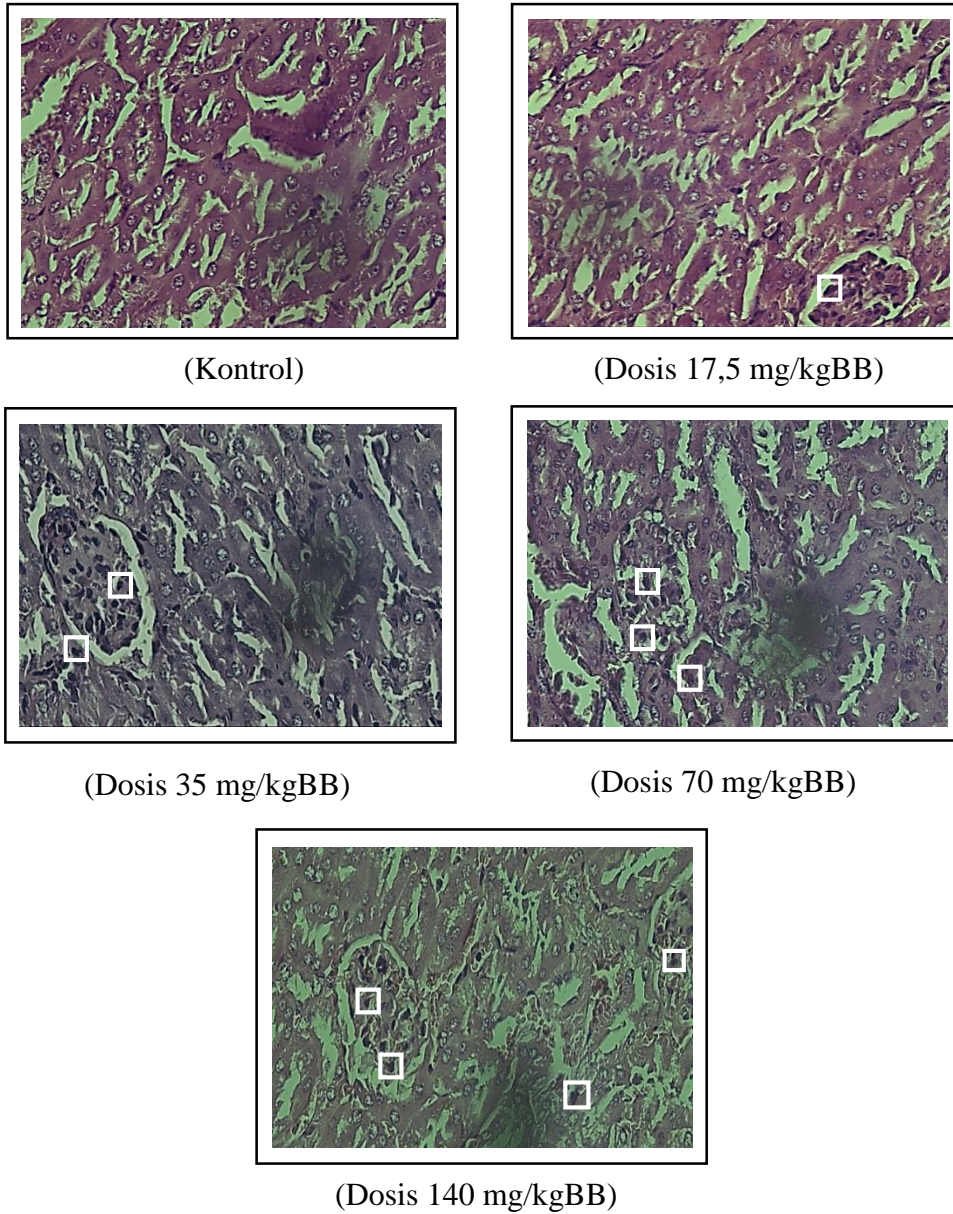
No.	Kelompok	Nilai Skor Kerusakan Hati
1	Kontrol	1,13 ± 0,05 ^a
2	Dosis 17.5 mg/kgBB	1,53 ± 0,34 ^b
3	Dosis 35 mg/kgBB	1,91 ± 0,20 ^c
4	Dosis 70 mg/kgBB	2,10 ± 0,20 ^c
5	Dosis 140 mg/kgBB	2,41 ± 0,14 ^d

Keterangan: Nilai yang diikuti dengan huruf yang berbeda menandakan perbedaan yang signifikan

Parameter yang dilihat berikutnya adalah jumlah sel polimorfonuklear (PMN) yang ditemukan pada organ hati dan ginjal hewan uji. Data gambaran histologi hati dan ginjal dapat dilihat pada Gambar 5 dan Gambar 6.



Gambar 5. Gambaran melintang histologi hati pada perbesaran 40x10 kali. Sel PMN ditunjukkan oleh tanda kotak berwarna putih.



Gambar 6. Gambaran melintang histologi ginjal pada perbesaran 40x10 kali. Sel PMN ditunjukkan oleh tanda kotak berwarna putih.

Berdasarkan hasil pengamatan dapat dilihat pada kelompok kontrol tidak ditemukan adanya sel PMN baik pada ginjal maupun hati. Pada kelompok dosis 17,5 mg/kgBB, 35 mg/kgBB, 70 mg/kgBB dan 140 mg/kgBB ditemukan adanya

sel PMN baik pada organ hati maupun ginjal hewan uji. Hal tersebut menandakan adanya kerusakan pada hati dan ginjal akibat pemberian piperin secara terus-menerus. Adapun jumlah sel PMN yang ditemukan pada masing-masing organ meningkat seiring dengan semakin tingginya dosis yang diberikan selama perlakuan. Peningkatan jumlah PMN yang terjadi merupakan salah satu respon tubuh akibat keadaan patologis tertentu seperti infeksi akut, inflamasi, kerusakan jaringan maupun gangguan metabolik pada tubuh (Riswanto, 2013).

Sel polimorfonuklear (PMN) merupakan salah satu jenis dari neutrofil yang merupakan leukosit sebagai salah satu unit aktif dari suatu sistem pertahanan tubuh yang dapat mengenali, menghancurkan maupun menetralkan benda-benda yang dianggap asing bagi tubuh dalam keadaan normal (Sherwood, 2012).

Leukosit merupakan bentuk perlawanan tubuh terhadap adanya senyawa asing dalam tubuh. terdapat enam macam leukosit yang secara normal dapat ditemui dalam darah, yaitu neutrofil polimorfonuklear, basofil polimorfonuklear, eosinofil polimorfonuklear, monosit, limfosit dan terkadang dapat ditemui sel plasma. Ketiga tipe sel pertama merupakan bagian dari sel-sel polimorfonuklear yang memiliki bentuk granular sehingga dapat disebut granulosit (Guyton dan Hall, 2007).

Neutrofil merupakan mekanisme tubuh pertama yang akan bekerja apabila terdapat jaringan tubuh yang rusak maupun adanya benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Fungsi sel-sel ini berkaitan dengan pengaktifan immunoglobulin serta sistem komplemen yang akan berinteraksi dengan neutrofil sehingga dapat

meningkatkan kemampuan neutrofil untuk melakukan fagositosis dan menguraikan bermacam-macam partikel (Langdon *et al*, 2009). Neutrofil merupakan leukosit pertama yang akan menjangkau daerah inflamasi dan juga memulai pertahanan host melawan pathogen dalam tubuh. Aktivasi neutrofil juga berperan dalam melawan infeksi bersama monosit dan makrofag melalui fagositosis (Craig *et al*, 2009). Sel neutrofil memiliki sitoplasma yang luas dengan warna pink pucat dan granula yang halus berwarna ungu (Riswanto, 2013).

Eosinofil dalam tubuh berfungsi sebagai fagositosis yang dapat menghasilkan antibodi terhadap antigen yang dikeluarkan oleh parasite (Kiswari, 2014). Gambaran eosinofil hampir sama dengan neutrofil, namun pada eosinofil granula sitoplasma lebih kasar dan juga berwarna merah *orange*. Warna tersebut disebabkan adanya senyawa protein bersifat basa yang mengikat zat warna golongan anilin seperti eosin. Bentuk granula sama besar dan teratur dan memiliki 3 lobus inti (Hoffbrand *et al*, 2012).

Basofil merupakan jenis leukosit yang paling sedikit jumlahnya dibanding neutrofil dan eosinofil. Granula pada basofil memiliki bentuk yang bervariasi dengan susunan tidak teratur hingga menutupi nukleus. Granula pada basofil berbentuk kasar dengan warna ungu atau biru tua dan sering kali menutup inti sel dan bersegmen (Kiswari, 2014).

Hasil data skor jumlah PMN pada hati dan ginjal selanjutnya dianalisis dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis yang dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Hasil uji statistik skor jumlah PMN hati dan ginjal dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Data Rata-rata Skor Jumlah PMN Hati dan Ginjal

No.	Kelompok	Nilai Skor Jumlah PMN	
		Hati	Ginjal
1	Kontrol	0,10 ± 0,08 ^a	0,03 ± 0,05 ^a
2	Dosis 17.5 mg/kgBB	0,33 ± 0,10 ^b	0,21 ± 0,09 ^b
3	Dosis 35 mg/kgBB	0,50 ± 0,08 ^c	0,50 ± 0,11 ^c
4	Dosis 70 mg/kgBB	0,70 ± 0,11 ^d	1,01 ± 0,11 ^d
5	Dosis 140 mg/kgBB	0,88 ± 0,13 ^e	1,11 ± 0,13 ^d

Keterangan: Nilai yang diikuti dengan huruf yang berbeda menandakan perbedaan yang signifikan

Hasil uji statistik skor jumlah PMN pada hati menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Hal yang sama juga terlihat pada masing-masing kelompok perlakuan. Terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok dosis 17,5 mg/kgBB, 35 mg/kgBB, 70 mg/kgBB dan 140 mg/kgBB. Pada hasil uji statistik skor jumlah PMN ginjal juga menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Terdapat perbedaan yang tidak signifikan pada kelompok dosis 70 mg/kgBB dan 140 mg/kgBB. Kelompok dosis 140 mg/kgBB memiliki rata-rata nilai skor jumlah PMN tertinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol dan juga kelompok perlakuan lainnya baik pada organ hati maupun ginjal.

Hal tersebut dapat terjadi karena tingginya dosis piperin yang diberikan pada hewan uji selama masa perlakuan.

Piperin merupakan senyawa yang sebagian besar diekskresi melalui ginjal dalam bentuk metabolitnya dan pada feses tidak ditemui adanya metabolit piperin setelah pemberian secara oral (Bajad dkk, 2003). Rao dkk (2015) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa pemberian piperin selama 3 minggu pada mencit albino menunjukkan terjadinya disfungsi pada hati dan secara signifikan menaikkan aspartat aminotransferase (AST), alanin aminotransferase (ALT) dan alkalin fosfatase (ALP) pada serum dan berpotensi menyebabkan kerusakan hepatosit akibat terjadinya perubahan permeabilitas pada membran. Pemberian piperin selama 14 hari pada hewan uji menyebabkan adanya perubahan histopatologi pada hati dan meningkatkan degenerasi hepatosit serta menyebabkan proliferasi pada saluran empedu (Da Silva Cardoso dkk, 2009).

Berdasarkan hasil pengamatan dan pembahasan kondisi histologi hati dan ginjal mencit setelah perlakuan menunjukkan bahwa piperin dapat menimbulkan kerusakan hati dan ginjal yang ditandai dengan meningkatnya skor kerusakan hati dan juga PMN pasca perlakuan pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kerusakan tersebut dapat meningkat seiring dengan semakin tingginya dosis dan lamanya pemberian piperin.