

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil Penelitian Tanaman Ciplukan**

##### **1. Hasil Determinasi Herba Ciplukan**

Tahap awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah identifikasi herba ciplukan yang dilakukan di Laboratorium Farmakognosi, Universitas Setia Budi Surakarta. Tujuan dilakukan determinasi adalah mencocokkan ciri-ciri morfologis yang ada pada tanaman yang diteliti, mengetahui kebenaran sampel yang digunakan, menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan, serta menghindari tercampurnya bahan dengan tanaman lain. Hasil determinasi berdasarkan pustaka Steenis: FLORA dengan nomor 325/DET/UPT-LAB/12/I/2019 dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba ciplukan atau ceplukan (*Physalis angulata* L.). Hasil determinasi dan deskripsi lengkap dari tanaman ciplukan dapat dilihat pada Lampiran 1.

##### **2. Hasil Pengambilan Bahan dan Pembuatan Serbuk Herba Ciplukan**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah herba ciplukan yang diperoleh dari petani di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Oktober 2018. Tahap pertama proses pembuatan serbuk yaitu mencuci seluruh bagian tanaman kemudian dilakukan perajangan, bagian tanaman yang diambil terdiri atas daun, batang, bunga, dan buah. Selanjutnya proses pengeringan dengan cara diangin-anginkan di tempat terbuka dan ditutupi menggunakan kain hitam untuk menghindari terurainya kandungan kimia dan kontaminasi debu atau hewan. Pengeringan dimaksudkan untuk mencegah timbulnya kuman, kapang dan khamir yang dapat menyebabkan pembusukan.

Setelah itu pengeringan lebih lanjut dengan cara simplisia yang telah diangin-anginkan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C, suhu perlu dijaga konstan, karena apabila suhu terlalu tinggi dapat merusak zat aktif yang terkandung didalam tanaman dan bila suhu terlalu rendah maka pengeringan menjadi tidak sempurna. Hasil penimbangan berat basah herba ciplukan sebanyak

8,9 kg setelah proses pengeringan didapatkan berat kering herba ciplukan sebesar 3,2 kg, sehingga diperoleh presentase rendemen kering sebesar 35,9%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Hasil rendemen simplisia herba ciplukan**

<b>Berat basah (gram)</b>	<b>Berat kering (gram)</b>	<b>Rendemen (%)</b>
8900	3200	35,9

Herba ciplukan yang telah kering dilakukan penyerbukan dengan menggunakan mesin penggiling dan dilakukan pengayakan dengan ayakan nomor 40. Alasan digunakannya ayakan nomor 40 adalah untuk mencegah didapkannya serbuk yang terlalu halus, karena apabila serbuk terlalu halus menyebabkan partikel serbuk tersebut lolos pada proses penyaringan dan serbuk yang terlalu halus sangat ringan sehingga serbuk akan naik ke permukaan cairan penyari pada saat proses ekstraksi. Serbuk yang masih tertahan pada ayakan selanjutnya dihaluskan lagi dengan cara diblender kemudian diayak kembali hingga menjadi serbuk. Tujuan simplisia dibuat serbuk adalah untuk memperbesar luas permukaan kontak serbuk dengan pelarut pada saat ekstraksi, sehingga senyawa aktif akan terekstrak lebih banyak dan prosesnya lebih cepat.

### **3. Hasil Karakterisasi Herba Ciplukan**

#### **3.1. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk dan ekstrak etanol herba ciplukan**

Pemeriksaan organoleptis serbuk dan ekstrak termasuk dalam parameter spesifik yang bertujuan sebagai pengenalan awal secara sederhana dan subjektif berdasarkan karakteristik dari serbuk dan ekstrak baik dari bentuk, warna, bau, dan rasa. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk herba ciplukan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil pemeriksaan organoleptis serbuk dan ekstrak etanol herba ciplukan

Organoleptis	Hasil	
	Serbuk	Ekstrak
Bentuk	Serbuk halus	Kental
Warna	Hijau kecoklatan	Hijau kehitaman
Bau	Khas	Khas ekstrak
Rasa	Khelat	Pahit

### 3.2. Hasil penetapan kadar air serbuk

Penetapan kadar air serbuk herba ciplukan pada penelitian ini menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Penetapan kadar air ini menggunakan pelarut pembawa yaitu toluen. Toluene digunakan sebagai pelarut karena memiliki titik didih yang lebih tinggi dari air dan tidak bercampur dengan air serta mempunyai berat jenis lebih rendah daripada air jernih (Sudarmadji *et al* 1997). Toluene mempunyai kelebihan seperti lebih ramah lingkungan karena terbuat dari minyak bumi yang berasal dari pohon tolu, harganya lebih terjangkau, dan hasil pembuatan preparat lebih jernih (Lael *et al* 2018). Kadar air herba ciplukan yang memenuhi persyaratan tidak lebih dari 11,7% (Depkes RI 2010).

Tabel 5. Persentase penetapan kadar air serbuk herba ciplukan

Replikasi	Berat awal (gram)	Volume air (mL)	Kadar (%)
1	20,0004	0,5	2,49
2	20,0002	0,5	2,49
3	20,0006	0,6	2,99
<b>Rata-rata ± SD</b>	20,0004	0,53	2,65 ± 0,28

Persentase rata-rata kadar air dalam serbuk herba ciplukan adalah 2,65%. Nilai tersebut menunjukkan bahwa kadar air dalam serbuk herba ciplukan telah memenuhi syarat kadar air herba ciplukan, yaitu tidak lebih dari 11,7% (Depkes RI 2010). Kadar air yang tinggi dapat menyebabkan perubahan enzim dan perubahan kimia zat aktif sehingga menurunkan mutu serbuk dan akan mudah ditumbuhi jamur (Gunawan & Mulyani 2004). Hasil perhitungan persentase rata-rata kadar air serbuk herba ciplukan terlampir pada Lampiran 2.

### 3.3. Hasil penetapan kadar sari larut air

Penetapan kadar sari larut air dilakukan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa yang dapat tersari dengan pelarut polar (air) dari suatu simplisia (Depkes RI 2000). Pelarut yang digunakan untuk penetapan kadar sari larut air harus jenuh kloroform dimana 1000 mL air dijenuhkan dengan 2,5 mL kloroform. Hasil penetapan kadar sari larut air adalah sebesar 9,8%. Menurut Depkes RI (2010) kadar sari yang larut dalam air untuk serbuk herba ciplukan tidak kurang dari 8,1 %. Hasil perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 3.

Tabel 6. Hasil penetapan kadar sari larut air serbuk herba ciplukan

Replikasi	Penimbangan (gram)	Bobot sari (gram)	Kadar sari larut air (%)
1	5,0014	0,1001	10
2	5,0010	0,0930	9,3
3	5,0006	0,1010	10,1
<b>Rata-rata ± SD</b>			<b>9,8 ± 0,43</b>

### 3.4. Hasil penetapan kadar sari larut etanol

Penetapan kadar sari larut etanol dilakukan untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa yang dapat tersari dengan pelarut etanol dari suatu simplisia (Depkes RI 2000). Menurut Depkes RI (2010) kadar sari yang larut etanol untuk serbuk herba ciplukan tidak kurang dari 2,8% dan pada penelitian ini kadar sari larut etanol pada herba ciplukan memenuhi syarat sebab nilainya sebesar 25,21%. Perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 4.

Tabel 7. Hasil penetapan kadar sari larut air serbuk herba ciplukan

Replikasi	Penimbangan (gram)	Bobot sari (gram)	Kadar sari larut etanol (%)
1	5,0002	0,1001	23,61
2	5,0023	0,0930	29,74
3	5,0011	0,1010	22,28
<b>Rata-rata ± SD</b>			<b>25,21 ± 3,97</b>

### 3.5. Hasil penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan dalam penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal mengenai besarnya senyawa yang hilang

pada saat proses pengeringan (Depkes RI 2000). Penetapan susut pengeringan dengan menggunakan alat *moisture balance* dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta. Hasil penetapan susut pengeringan menggunakan *moisture balance* sebesar 6%, hasil tersebut memenuhi telah memenuhi syarat susut pengeringan herba ciplukan karena kurang dari 10%. Perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 5.

**Tabel 8. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk herba ciplukan**

Replikasi	Penimbangan (gram)	Susut pengeringan (%)
1	2,0002	5,0
2	2,0001	6,5
3	2,0004	6,5
<b>Rata-rata ± SD</b>		<b>6 ± 0,86</b>

### 3.6. Hasil uji bebas alkohol ekstrak etanol herba ciplukan

Uji bebas alkohol ekstrak etanol herba ciplukan bertujuan untuk memastikan bahwa kandungan etanol dalam ekstrak yang diperoleh telah benar-benar terbebas dari etanol dan tidak mempengaruhi hasil uji antihipertensi. Uji ini dilakukan dengan cara esterifikasi alkohol menambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat sebagai katalis pada ekstrak kemudian dipanaskan. Hasil uji bebas alkohol pada penelitian ini adalah sudah tidak tercium lagi bau ester etil asetat yang khas seperti bau lem atau bau balon tiup yang merupakan hasil reaksi antara etanol dan asam asetat, sehingga ekstrak dapat digunakan untuk penelitian.

**Tabel 9. Hasil uji bebas etanol ekstrak etanol herba ciplukan**

Esterifikasi ekstrak HC	Hasil uji	Pustaka
Ekstrak HC + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat + CH <sub>3</sub> COOH, dipanaskan → C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Tidak tercium bau ester yang khas	Tidak tercium bau ester yang khas (seperti bau lem atau balon tiup)

### 3.7. Hasil penetapan bobot jenis

Penentuan bobot jenis merupakan perbandingan antara bobot zat dengan bobot air yang bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan kimia yang terlarut pada suatu ekstrak dan memberikan batasan tentang besarnya massa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang (Depkes RI 2000). Bobot jenis

merupakan sifat fisika dari suatu ekstrak. Dengan mengetahui bobot jenis ekstrak maka kita dapat menentukan apakah suatu zat dapat bercampur atau tidak dengan zat lainnya (Halilah *et al* 2017). Penentuan bobot jenis ekstrak dilakukan dengan menggunakan piknometer. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak yang telah diencerkan sebesar 5% menggunakan etanol 70% sebagai pelarut. Nilai bobot jenis yang diperoleh sebesar  $0,9399/\text{mL} \pm 0,02$ . Dari hasil yang didapatkan bobot jenis ekstrak etanol herba ciplukan  $< 1$  maka kontaminasi kecil dan kemungkinan terdapat senyawa yang tidak larut dalam etanol pada saat pengenceran atau proses ekstraksi seperti senyawa steroid. Hasil perhitungan bobot jenis dapat dilihat pada Lampiran 6.

#### 4. Hasil Pembuatan Ekstrak Etanol Herba Ciplukan

Pembuatan ekstrak etanol herba ciplukan mengacu pada Depkes RI (2013) menggunakan metode maserasi dengan perbandingan serbuk dan pelarut adalah 1:10. Serbuk herba ciplukan yang digunakan adalah 500 gram dengan pelarut etanol 70% sebanyak 5000 mL. Perhitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 5 dan Lampiran 7.

Tabel 10. Hasil rendemen ekstrak etanol herba ciplukan

Serbuk HC (gram)	Berat wadah kosong (gram)	Berat wadah + ekstrak (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
500	183,4862	287,293	103,8068	20,76

Berdasarkan hasil yang diperoleh maka rendemen ekstrak etanol herba ciplukan sebesar 20,76%. Rendemen pada ekstrak yang tidak terlalu besar ini dikarenakan dalam herba ciplukan komposisi batang lebih banyak dibandingkan dengan daun. Senyawa kimia yang bersifat polar di dalam herba ciplukan seperti flavonoid lebih banyak ditemukan pada daun, sedangkan pada batang lebih sedikit karena batang tumbuhan tersusun atas jaringan penyokong, sehingga rendemen yang terbentuk akan sedikit (Dewi 2017).

#### 5. Hasil Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dari serbuk dan ekstrak etanol herba ciplukan dilakukan untuk membuktikan serbuk dan ekstrak yang diperoleh

mengandung adanya senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, dan steroid. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol herba ciplukan dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 11. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol herba ciplukan**

Kandungan kimia	Kesimpulan		Pustaka
	Serbuk	Ekstrak	
Alkaloid	(+)	(+)	Terbentuk endapan warna putih kuning pada mayer, endapan berwarna coklat sampai hitam pada bouchardat (Depkes RI 1980).
Flavonoid	(+)	(+)	Warna merah sampai ungu pada lapisan amil alkohol (Bandiola 2018).
Steroid	(+)	(+)	Adanya warna merah, hijau, ungu, dan akhirnya biru (Ajiboye <i>et al</i> 2013).
Fenolik	(+)	(+)	Warna hijau, biru, merah, ungu atau hitam pekat (Tiwari <i>et al</i> 2011).

Berdasarkan hasil pada tabel di atas, dapat disimpulkan bahwa serbuk dan ekstrak etanol herba ciplukan terbukti positif mengandung alkaloid, flavonoid, steroid dan fenolik. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa herba ciplukan mengandung alkaloid yang terdapat dalam daunnya yaitu phygrine dengan struktur *bis-hygrine* (Basey *et al* 1992). Kandungan flavonol glikosida myricetin-3-*O*-neohesperidoside berhasil diisolasi oleh Ismail dan Alam (2001) dari daun ciplukan, serta kandungan steroid berupa berbagai jenis physalin yang berhasil diisolasi, seperti yang dilaporkan oleh Row *et al* (1978,1980) yang berhasil mengisolasi 5 senyawa baru physalin E, F, I, dan K bersama dengan physalin B, G, dan D serta *seco*-steroid dapat ditemukan pada biji ciplukan (Milena *et al* 2003). Hasil uji tabung identifikasi kandungan senyawa ekstrak etanol herba ciplukan dapat dilihat pada Lampiran 8.

## **B. Persetujuan Etik**

Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik (*Ethical Approval*) dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi Surakarta dengan nomor 231/II/HERC/2019. Surat keterangan persetujuan etik dapat dilihat pada Lampiran 9.

## **C. Hewan Uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley* dengan bobot 150-220 gram dengan umur 2-3 bulan. Tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley* sebanyak 40 ekor diperoleh dari peternakan hewan uji milik Sdr. Yulianto Ratno Saputro yang berlokasi di Pasar Burung Depok, Manahan, Surakarta dengan nomor surat keterangan kesehatan hewan 524.3/503.M/SKKH. Tikus *Sprague-Dawley* jantan dipilih karena memiliki sistem hormonal yang lebih stabil dibanding tikus betina dan terdapat hubungan antara hormonal dan tekanan darah sehingga dapat meminimalkan bias (Nurdiana 2013). Tikus ditempatkan pada kandang persegi dengan ventilasi yang baik dengan ukuran panjang 45 cm, lebar 35 cm, dan tinggi 15 cm. Tiap kandang berisi 5 ekor tikus. Sebelum perlakuan, hewan uji diaklimatisasi selama satu minggu di tempat penelitian untuk penyesuaian dengan lingkungan. Tikus diberikan konsumsi makanan standar dan air minum *ad libitum* selama periode satu minggu tersebut. Surat keterangan kesehatan hewan dapat dilihat pada Lampiran 10.

Hewan uji yang telah digunakan untuk pengujian aktivitas antihipertensi akan dilakukan euthanasia fisik metode dislokasi serviks. Prinsip teknik ini yaitu dengan memberikan tekanan pada leher dan menghilangkan tulang belakang dari tengkorak atau kepala, tujuannya agar dapat memisahkan dengan cepat sumsum tulang belakang dari otak dan untuk memberikan hewan uji kematian yang cepat dan tidak menyakitkan. Hewan uji yang sudah mati dimasukkan dalam kantong plastik berlapis yang diikat dengan tali rafia kemudian disimpan dalam lemari pendingin ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) sampai dilakukan pembakaran menggunakan insinerator oleh Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gadjah Mada.

#### **D. Hasil Penetapan Dosis**

Pada penelitian ini kelompok kontrol sakit diberikan CMC Na 0,5% yang dibuat dengan cara melarutkan 500 mg serbuk CMC Na ke dalam 100 mL aquadest dengan volume pemberian 2 mL/200 grambb. Sediaan uji induksi prednison 1,5 mg/kgbb dan ekstrak dosis 50 mg/kgbb, 100 mg/kgbb , 200 mg/kgbb disuspensikan dengan CMC Na 0,5% agar sediaan tidak mengendap sehingga tidak mempengaruhi dosis pada saat pemberian dengan sonde oral. Obat pembanding kaptopril dosis 2,5 mg/kgbb hanya dilarutkan dengan aquadest karena kaptopril mempunyai kelarutan yang cukup baik dalam air. Perhitungan dosis dan volume pemberian dapat dilihat pada Lampiran 11.

Dosis ekstrak diperoleh dengan mengalikan randemen ekstrak kental 20,76% dengan dosis empiris pada manusia sebesar 5 gram, diperoleh dosis ekstrak sebesar 1,04 gram. Kemudian dosis ekstrak dikonversikan ke tikus 200 gram dengan faktor konversi 0,018 diperoleh dosis sebesar 95 mg/kgbb tikus. Selanjutnya dilakukan orientasi dosis terhadap hewan uji dengan menggunakan dua variasi dosis yaitu  $\frac{1}{2}$  dosis ekstrak 50 mg/kgbb dan 1 kali dosis ekstrak 100 mg/kgbb.

Berdasarkan hasil orientasi dosis maka ditetapkan dosis untuk uji aktivitas antihipertensi herba ciplukan dengan tiga variasi dosis yaitu  $\frac{1}{2}$  dosis ekstrak 50 mg/kgbb, 1 kali dosis ekstrak 100 mg/kgbb, dan 2 kali dosis ekstrak 200 mg/kgbb. Hasil pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik orientasi dapat dilihat pada Lampiran 12 dan Lampiran 13.

#### **E. Hasil Pengukuran Tekanan Darah**

Penelitian ini dimulai dengan meningkatkan tekanan darah hewan uji menjadi hipertensi dengan menggunakan metode induksi prednison dan NaCl. Dosis prednison yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,3 mg/200 grambb tikus dan NaCl yang digunakan 40 mg/200 grambb tikus. Pengukuran tekanan darah dilakukan dengan cara tidak langsung menggunakan metode *tail cuff* dengan alat bernama *non invasive blood pressure analyzer CODA<sup>®</sup>* dari Kent

Scientific Corporation. Prinsip pengukuran alat tersebut sama dengan cara pengukuran tekanan darah menggunakan sphygmomanometer pada manusia. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

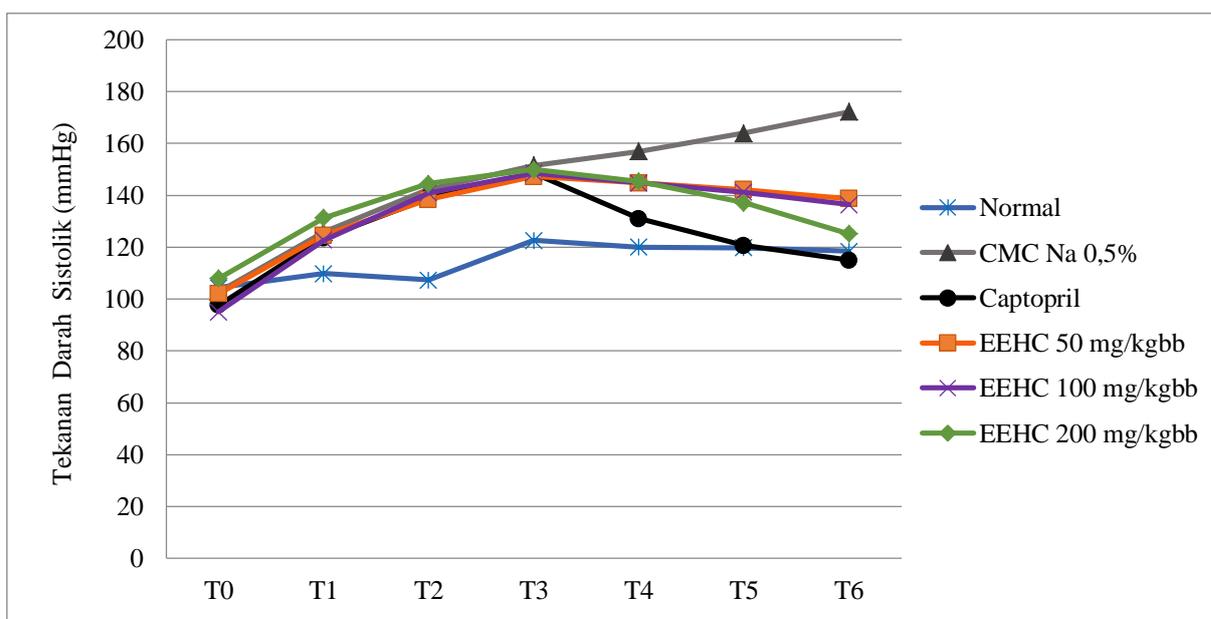
Pemilihan kaptopril sebagai obat pembanding karena kaptopril selain sebagai *first line* terapi antihipertensi tetapi juga sediaan uji ekstrak etanol herba ciplukan yang masih berupa ekstrak menjadi pertimbangan dalam pemilihan obat pembanding karena belum diketahui mekanismenya secara spesifik dalam menurunkan tekanan darah. Kaptopril mempunyai mekanisme kerja obat menghambat *angiotensin converting enzyme* (ACE) yaitu mengurangi pembelahan hormon peptida angiotensin I ke angiotensin II dan mengurangi metabolisme peptida bradikinin menjadi tidak aktif. Penghambatan pada ACE menghasilkan efek vasodilatasi lalu menurunkan resistensi vaskuler sehingga menurunkan tekanan darah, dan menurunkan sekresi aldosteron, kemudian menurunkan volume darah sehingga menurunkan beban akhir jantung (*afterload*) (Katzung *et al* 2013).

Data tekanan darah pada enam kelompok perlakuan masing-masing terdiri dari lima ekor tikus putih jantan galur *Sprague-Dawley* yang diambil yaitu jumlah rata-rata tekanan darah sistolik dan diastolik awal sebelum diberi induksi prednison dan NaCl ( $T_0$ ), tekanan darah pada hari ke 7 ( $T_1$ ), hari ke 14 ( $T_2$ ), hari ke 21 ( $T_3$ ) pada saat induksi prednison dan NaCl, tekanan darah pada hari ke 28 ( $T_4$ ), hari ke 35 ( $T_5$ ), dan hari ke 42 ( $T_6$ ) setelah diberi induksi prednison dan NaCl kemudian diberi terapi CMC Na, kaptopril, dan ekstrak etanol herba ciplukan.

Dalam penelitian ini, pemberian kombinasi prednison 0,3 mg/200 gram tikus dan NaCl 40 mg/200 gram tikus selama 21 hari menyebabkan tekanan sistolik dan diastolik meningkat dengan rata-rata 149,2 mmHg dan 111,2 mmHg. Hipertensi dikategorikan ringan bila tekanan darah sistolik berada pada rentang 149-199 dan tekanan diastolik >97 mmHg (Krinke 2000, diacu dalam Nisa *et al* 2017). Rata-rata peningkatan nilai tekanan sistolik setelah induksi sebesar 48,12 mmHg dari rata-rata tekanan darah awal ( $T_0$ ). Nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan DOCA garam (+20-35 mmHg) tetapi hal ini setara dengan infus

angiotensin (+45-60 mmHg) dan lebih besar dari metode diet tinggi lemak (10 mmHg) (Monassier *et al* 2006). Hasil data tekanan darah sistolik dan diastolik dapat dilihat pada Tabel 12 dan Tabel 13.

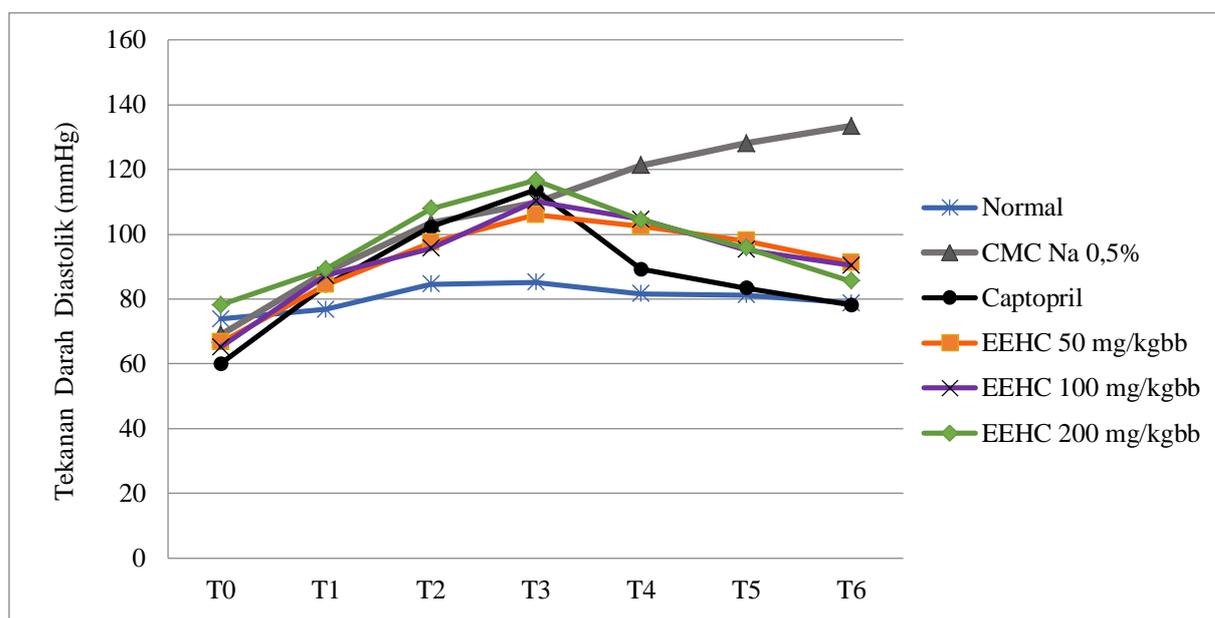
Peningkatan tekanan darah terjadi karena induksi prednison dan NaCl dapat menyebabkan kenaikan tekanan darah secara signifikan dan konstan melalui teraktivasinya *Renin Angiotensin Aldosteron System* (RAAS) dan retensi cairan (Purwidyaningrum *et al* 2017; Nisa *et al* 2017). Teraktivasinya RAAS akan meningkatkan aktivitas renin yang akan mengaktifkan angiotensin II dan kemudian menghasilkan aldosteron sehingga terjadi peningkatan reabsorpsi natrium pada tubulus distal ginjal. Peningkatan tersebut dapat menyebabkan kenaikan tekanan darah (Kienitz & Quinkler 2008).



**Gambar 6** Diagram hubungan rata-rata tekanan darah sistolik dengan waktu pada masing-masing kelompok perlakuan.

Berdasarkan diagram pada Gambar 6 di atas terjadi peningkatan tekanan darah sistolik yang dimulai pada hari ke 0 ( $T_0$ ) sampai hari ke 21 ( $T_3$ ) yang disebabkan karena pemberian induksi prednison dan NaCl. Pada kelompok kontrol normal tidak terjadi peningkatan atau penurunan tekanan sistolik dan cenderung konstan karena kelompok tersebut tidak diberikan perlakuan. Pada kelompok hipertensi tekanan darah sistolik terus mengalami peningkatan karena terus diberikan induksi dari hari 0 ( $T_0$ ) sampai hari ke 42 ( $T_6$ ), kelompok

hipertensi hanya diberikan larutan CMC Na 0,5% yang berfungsi untuk memastikan CMC Na sebagai pembawa atau *suspending agent* tidak mempengaruhi tekanan darah dan kelompok hipertensi juga berfungsi untuk melihat profil tekanan darah kelompok sakit. Pada hari ke 28 ( $T_4$ ) masa terapi, kelompok EEHC dosis 50 mg/kgbb, kelompok EEHC dosis 100 mg/kgbb, dan kelompok EEHC dosis 200 mg/kgbb belum terjadi penurunan tekanan darah yang signifikan dikarenakan sampel yang berupa ekstrak bahan alam yang terdiri dari berbagai senyawa yang kompleks membutuhkan waktu yang cukup lama untuk mengakumulasi zat ke tingkat tertentu hingga mencapai onset. Pada hari ke 35 ( $T_5$ ) sampai hari ke 42 ( $T_6$ ) sudah mulai terlihat efek hipotensi dari sediaan uji, terutama kelompok dosis 200 mg/kgbb pada akhir penelitian menunjukkan penurunan tekanan darah sistolik yang signifikan mendekati tekanan darah kelompok normal dibandingkan dengan kelompok dosis EEHC dosis 50 mg/kgbb dan kelompok EEHC dosis 100 mg/kgbb.



**Gambar 7** Diagram hubungan rata-rata tekanan darah sistolik dengan waktu pada masing-masing kelompok perlakuan.

Berdasarkan diagram pada Gambar 7 di atas terjadi peningkatan tekanan darah diastolik yang dimulai pada hari ke 0 ( $T_0$ ) sampai hari ke 21 ( $T_3$ ) yang disebabkan karena pemberian induksi prednison dan NaCl. Pada kelompok

kontrol normal tidak terjadi peningkatan atau penurunan tekanan sistolik dan cenderung konstan karena kelompok tersebut tidak diberikan perlakuan. Pada kelompok hipertensi tekanan darah diastolik terus mengalami peningkatan karena terus diberikan induksi dari hari 0 ( $T_0$ ) sampai hari ke 42 ( $T_6$ ), kelompok hipertensi hanya diberikan larutan CMC Na 0,5% yang berfungsi untuk memastikan CMC Na sebagai pembawa atau *suspending agent* tidak mempengaruhi tekanan darah selain itu kelompok hipertensi juga berfungsi untuk melihat profil tekanan darah kelompok sakit. Pada hari ke 28 ( $T_4$ ) masa terapi, kelompok EEHC dosis 50 mg/kgbb, kelompok EEHC dosis 100 mg/kgbb, dan kelompok EEHC dosis 200 mg/kgbb belum terjadi penurunan tekanan darah yang signifikan dikarenakan sampel yang berupa ekstrak bahan alam yang terdiri dari berbagai senyawa yang kompleks yang membutuhkan waktu yang cukup lama untuk mengakumulasi zat ke tingkat tertentu hingga mencapai onset. Pada hari ke 35 ( $T_5$ ) sampai hari ke 42 ( $T_6$ ) sudah mulai terlihat efek hipotensi dari sediaan uji, terutama kelompok dosis 200 mg/kgbb pada akhir penelitian menunjukkan penurunan tekanan darah diastolik yang signifikan dibandingkan dengan kelompok dosis EEHC dosis 50 mg/kgbb dan kelompok EEHC dosis 100 mg/kgbb.

Perbedaan pengaruh sampel terhadap tekanan darah sistolik dan diastolik dari seluruh kelompok uji dapat diketahui dengan melakukan analisis statistik *One-Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil analisis statistik dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* pada tekanan darah awal ( $T_0$ ) sampai dengan tekanan darah hari ke 42 ( $T_6$ ) menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai sig  $>0,05$ , sehingga analisis statistik menggunakan analisis varian *One-Way ANOVA* dilanjutkan *Post Hoc test Tukey HSD*.

**Tabel 12. Rata-rata tekanan darah sistolik pada berbagai kelompok perlakuan**

Kel	T <sub>0</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>
Uji	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)
I	104,4±8,90	122,6±4,82 <sup>ab</sup>	120±2,73 <sup>ab</sup>	119,8±3,89 <sup>a</sup>	118,4±5,31 <sup>a</sup>
II	102,8±21,44	151,6±3,84 <sup>c</sup>	157±3,16 <sup>bc</sup>	164±4,94 <sup>bc</sup>	172,2±5,54 <sup>bc</sup>
III	97,6±10,69	148,6±7,09 <sup>c</sup>	131±3,16 <sup>ac</sup>	120,6±2,60 <sup>a</sup>	115±3,39 <sup>a</sup>
IV	102±12,72	147,2±4,54 <sup>c</sup>	144,8±3,49 <sup>abc</sup>	142,2±3,63 <sup>abc</sup>	138,8±4,86 <sup>abc</sup>
V	95±13,83	148,6±4,71 <sup>c</sup>	144,8±5,21 <sup>abc</sup>	141,2±4,32 <sup>abc</sup>	136,4±4,03 <sup>abc</sup>
VI	108±8,80	150±8,74 <sup>c</sup>	145,4±7,70 <sup>abc</sup>	137,2±7,29 <sup>abc</sup>	125,2±4,08 <sup>ab</sup>

Keterangan :

- a : Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif (sig <0,05)
- b : Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol positif (sig <0,05)
- c : Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol normal (sig <0,05)
- I : Kelompok normal
- II : Kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)
- III : Kelompok kontrol positif (kaptopril 2,5 mg/kgbb)
- IV : Kelompokekstrak etanol herba ciplukan 50 mg/kgbb
- V : Kelompokekstrak etanol herba ciplukan 100 mg/kgbb
- VI : Kelompokekstrak etanol herba ciplukan 200 mg/kgbb
- T<sub>0</sub> : Tekanan darah awal (mmHg)
- T<sub>3</sub> : Tekanan darah hari ke 21 setelah induksi prednison 1,5 mg/kgbb dan NaCl 200 mg/kgbb (mmHg)
- T<sub>4</sub> : Tekanan darah hari ke 28 setelah induksi dan setelah diberikan terapi (mmHg)
- T<sub>5</sub> : Tekanan darah hari ke 35 setelah induksi dan setelah diberikan terapi (mmHg)
- T<sub>6</sub> : Tekanan darah hari ke 42 setelah induksi dan setelah diberikan terapi (mmHg)

Peningkatan tekanan darah pada semua kelompok dibandingkan dengan kelompok kontrol normal. Tahap ini bertujuan untuk menguji kemampuan NaCl dan prednison untuk meningkatkan tekanan darah, dengan menganalisis tekanan darah sistolik dan diastolik setiap minggu, dimulai pada periode induksi hari ke 0 (T<sub>0</sub>) hingga hari ke 21 (T<sub>3</sub>), menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara tekanan darah sistolik dan diastolik semua kelompok yang

diinduksi oleh prednison dan NaCl pada hari ke 21 induksi (T<sub>3</sub>) (Tabel 12 dan Tabel 13). Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa induksi oleh prednison dan NaCl selama 21 hari, meningkatkan tekanan darah sistolik dan diastolik pada tikus galur *Sprague-Dawley* jantan secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol normal ( $p < 0,05$ ).

Evaluasi selanjutnya adalah menganalisis tekanan darah selama terapi. Hasil penurunan tekanan darah selama terapi dibandingkan dengan kelompok hipertensi dan kelompok kontrol normal. Tujuan dari tahap ini adalah untuk menguji kemampuan sediaan uji dalam memberikan efek antihipertensi. Perbandingan antara kelompok kontrol positif (kaptopril 2,5 mg/kgbb) dan kelompok hipertensi bertujuan untuk memvalidasi metode pengujian dalam penurunan tekanan darah hewan uji. Berdasarkan analisis tekanan darah sistolik dan diastolik setiap minggu, dimulai pada hari ke 28 (T<sub>4</sub>) hingga 42 hari masa terapi (T<sub>6</sub>), menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara tekanan darah sistolik dan diastolik kelompok kaptopril dibandingkan dengan kelompok hipertensi ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 13. Rata-rata tekanan darah diastolik pada berbagai kelompok perlakuan**

Kel	T <sub>0</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>
Uji	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)
I	73,8±10,10	85,2±5,63 <sup>ab</sup>	81,6±4,21 <sup>a</sup>	81,2±4,32 <sup>a</sup>	78,8±7,69 <sup>a</sup>
II	69±17,01	109,9±4,60 <sup>c</sup>	121,2±2,86 <sup>bc</sup>	128±4,06 <sup>bc</sup>	133,4±3,78 <sup>bc</sup>
III	60±11,11	113,8±4,71 <sup>c</sup>	89,2±9,62 <sup>a</sup>	83,4±4,82 <sup>a</sup>	78,2±2,94 <sup>a</sup>
IV	66,6±9,12	106±5,40 <sup>c</sup>	102,4±4,72 <sup>abc</sup>	98±7,17 <sup>abc</sup>	91,2±6,30 <sup>abc</sup>
V	65,2±10,08	110,2±6,87 <sup>c</sup>	104,6±7,53 <sup>abc</sup>	95,2±5,40 <sup>abc</sup>	90,4±7,16 <sup>abc</sup>
VI	78,2±6,61	116,6±7,70 <sup>c</sup>	104,4±8,47 <sup>abc</sup>	95,8±5,76 <sup>abc</sup>	85,6±4,82 <sup>a</sup>

Keterangan :

- a : Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif (sig <0,05)
- b : Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol positif (sig <0,05)
- c : Berbeda bermakna dengan kelompok kontrol normal (sig <0,05)
- I : Kelompok normal
- II : Kelompok kontrol negatif (CMC Na 0,5%)
- III : Kelompok kontrol positif (kaptopril 2,5 mg/kgbb)

- IV : Kelompekekstrak etanol herba ciplukan 50 mg/kgbb
- V : Kelompekekstrak etanol herba ciplukan 100 mg/kgbb
- VI : Kelompekekstrak etanol herba ciplukan 200 mg/kgbb
- T<sub>0</sub> : Tekanan darah awal (mmHg)
- T<sub>3</sub> : Tekanan darah hari ke 21 setelah induksi prednison 1,5 mg/kgbb dan NaCl 200 mg/kgbb (mmHg)
- T<sub>4</sub> : Tekanan darah hari ke 28 setelah induksi dan setelah diberikan terapi (mmHg)
- T<sub>5</sub> : Tekanan darah hari ke 35 setelah induksi dan setelah diberikan terapi (mmHg)
- T<sub>6</sub> : Tekanan darah hari ke 42 setelah induksi dan setelah diberikan terapi (mmHg)

Kemudian membandingkan antara kelompok kaptopril dengan kelompok kontrol normal untuk melihat efektivitas kaptopril dalam menurunkan tekanan darah hingga mencapai normal. Tidak ada perbedaan signifikan dalam tekanan darah sistolik (dimulai pada T<sub>5</sub>) dan diastolik (dimulai pada T<sub>4</sub>) antara kaptopril dengan kelompok kontrol normal. Dapat disimpulkan bahwa kaptopril efektif menurunkan tekanan darah mencapai nilai normal pada hewan uji.

Perbandingan antara kelompok hipertensi dan kelompok kontrol normal dilakukan dengan menganalisis tekanan darah sistolik dan diastolik setiap minggu dimulai pada hari ke 21 (T<sub>3</sub>) hingga hari ke 42 (T<sub>6</sub>) selama terapi. Ada perbedaan yang signifikan pada tekanan darah sistolik dan diastolik kelompok hipertensi dan kelompok kontrol selama periode terapi ( $p < 0,05$ ). Dapat disimpulkan bahwa NaCl 200 mg/kgbb dan prednison 1,5 mg/kgbb yang diberikan secara oral selama 21 hari masa induksi kemudian dilanjutkan selama 21 hari masa terapi mampu mempertahankan tekanan darah pada kelompok hipertensi yang berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kelompok normal ( $p < 0,05$ ).

Langkah selanjutnya adalah membandingkan kelompok sediaan uji, kelompok EEHC dosis 50 mg/kgbb, kelompok EEHC dosis 100 mg/kgbb, dan kelompok EEHC dosis 200 mg/kgbb terhadap kelompok hipertensi dan kelompok kontrol positif yang bertujuan untuk menguji kemampuan efek antihipertensi dari sediaan uji. Berdasarkan analisis tekanan darah sistolik mingguan selama terapi (T<sub>4</sub> sampai T<sub>6</sub>), dapat dilihat terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok

EEHC dosis 50 mg/kgbb, kelompok EEHC dosis 100 mg/kgbb, dan kelompok VI EEHC dosis 200 mg/kgbb dibandingkan dengan kelompok hipertensi dan kelompok kontrol positif pada T<sub>6</sub> ( $p < 0,05$ ) (kecuali diastolik T<sub>6</sub> hanya berbeda signifikan dengan kelompok hipertensi).

Kelompok sediaan uji juga dibandingkan dengan kelompok kontrol normal untuk menguji kemampuan sediaan uji untuk memberikan efek antihipertensi terhadap tekanan darah normal. Berdasarkan analisis statistik setiap minggu dimulai pada hari ke 28 (T<sub>4</sub>) hingga terapi hari ke 42 (T<sub>6</sub>), hasilnya menunjukkan bahwa tekanan darah sistolik dan diastolik dari semua kelompok sediaan uji berbeda signifikan dengan kelompok kontrol normal dimulai pada hari ke 28 (T<sub>4</sub>) hingga terapi hari ke 42 (T<sub>6</sub>), kecuali kelompok EEHC dosis 200 mg/kgbb pada hari ke 42 terapi (T<sub>6</sub>) berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan tekanan darah sistolik dan diastolik tidak terdapat perbedaan secara signifikan terhadap kelompok normal ( $p > 0,05$ ).

Dari hasil analisis statistik sediaan uji, besarnya penurunan tekanan darah sistolik dan diastolik setelah 21 hari masa terapi dapat diurutkan menjadi kelompok dosis 200 mg/kgbb > kelompok dosis 100 mg/kgbb > kelompok dosis 50 mg/kgbb. Suatu zat uji memiliki kemampuan menurunkan tekanan darah sistolik  $\geq 20$  mmHg maka dapat digunakan sebagai antihipertensi (Aminunsiyah *et al* 2014; Fidrianny *et al* 2009). Ekstrak etanol herba ciplukan dapat menurunkan tekanan darah sistolik lebih dari 20 mmHg terutama kelompok dosis 200 mg/kgbb menurunkan tekanan sistolik sebesar 25 mmHg dan 31 mmHg pada tekanan diastolik.

Berdasarkan hasil uji kualitatif kandungan kimia ekstrak etanol herba ciplukan positif mengandung alkaloid, flavonoid, fenolik, dan steroid. Salah satu senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol herba ciplukan adalah quercetin-3-*O*-rutinoside dan 3-*O*-metilquercetin-*O*-rutinoside (Dewi 2017). Hasil penelitian lain yang dilakukan oleh Akomolafe *et al* (2018) menyatakan bahwa dari hasil analisis kuantitatif menggunakan *high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector* (HPLC–DAD) ekstrak air herba ciplukan mengandung kaempferol, isokuersitrin, rutin, quersitrin, dan

kuersetin. Menurut Depkes RI (2010) ekstrak kental herba ciplukan mengandung flavonoid total tidak kurang dari 3,54% yang dihitung sebagai kuersetin.

RAAS memainkan peran utama dalam pengaturan tekanan darah. Induksi prednison dan NaCl akan mengaktivasi RAAS, aktivitas berlebih jangka panjang dari sistem ini menyebabkan hipertensi dan penyakit kardiovaskular lainnya. Penggunaan ACE inhibitor atau penghambat reseptor angiotensin subtype-spesifik dapat mengganggu RAAS dan menyebabkan penurunan tekanan darah dan kejadian kardiovaskular pada populasi berisiko tinggi (Cohn 2010). Kuersetin secara *in vitro* menunjukkan aktivitas hambatan pada ACE (Loizzo 2006), mungkin melalui kemampuannya untuk mengkelat ion logam seperti seng (Chen & Pace-Asciak 1996). Menariknya, mekanisme kerja dimana ACE inhibitor seperti kaptopril dan imidapril menghambat ACE adalah dengan mengikat atom seng di situs aktif enzim, yang memperlambat konversi angiotensin I menjadi angiotensin II (Carretero 2005). Mackraj *et al* (2008) membandingkan efek antihipertensi jangka panjang dari kaptopril dengan kuersetin menggunakan tikus sensitif garam Dahl yang diberikan injeksi setiap hari selama 4 minggu dengan kaptopril, kuersetin, dan plasebo. Tekanan darah meningkat pada tikus Dahl yang dirawat dengan plasebo selama periode 4 minggu, lalu menurun secara signifikan dibandingkan dengan *baseline* pada kelompok yang diobati dengan kuersetin dan kaptopril. Penurunan tekanan darah terjadi bersamaan dengan *down-regulation* dari reseptor angiotensin I di ginjal, peningkatan volume urin, dan peningkatan ekskresi natrium urin, sehingga memberikan mekanisme potensial untuk efek penurunan tekanan darah jangka panjang dari kuersetin.

Ekstrak air daun ciplukan dan fraksi etil asetat herba ciplukan memiliki efek antioksidan yang tinggi secara *in vitro* (Kusumaningtyas *et al* 2015; Nurfiana 2018). Aktivitas antioksidan mungkin disebabkan oleh kandungan flavonoid dari ciplukan yaitu 5-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone dan 5,6,7-trimethoxyflavone (Ser 1988). Flavonoid dapat mencegah kerusakan jaringan dari radikal bebas penyebab timbulnya berbagai penyakit degeneratif seperti hipertensi diabetes mellitus, stroke, jantung koroner, dislipidemia dan sebagainya, dengan

melalui berbagai mekanisme termasuk *scavenging* oksigen reaktif, spesies nitrogen, khelasi logam, penghambatan reaksi propagasi dalam peroksidasi lipid, dan *sparing* antioksidan terkait LDL (Mira *et al* 2002). Berdasarkan penelitian Febianti *et al* (2019), menyatakan bahwa kelompok uji yang mendapat ekstrak air daun ciplukan dosis 500 mg/kgbb dan 1500 mg/kgbb memiliki kepadatan vaskular yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok L-NAME. Sehingga dapat diasumsikan bahwa suplementasi ekstrak air daun ciplukan dapat mencegah *rarefaction* pembuluh darah yang diinduksi oleh L-NAME. Penelitian lain menyebutkan bahwa ciplukan dapat meningkatkan level *nitric oxide* (NO) dari kultur sel endotel (Nurdiana & Karyono 2010), dimana NO memiliki efek vasoprotektif dengan mencegah apoptosis pada sel endotel (Yamashita *et al* 2007) dan berperan penting dalam mempertahankan tonus pembuluh darah khususnya untuk proses relaksasi pembuluh darah. Seperti yang diketahui sel endotel mempunyai fungsi utama dalam regulasi tekanan darah antara lain yaitu, mengatur tonus pembuluh darah, mengatur adhesi leukosit dan inflamasi, dan mempertahankan keseimbangan antara trombosis dan fibrinolitik (Deanfield *et al* 2007).

Nanumala *et al* (2012) dalam penelitiannya menyatakan bahwa dosis bertingkat dari ekstrak metanol daun ciplukan dalam salin normal menunjukkan peningkatan yang sangat signifikan pada diuresis, natriuresis, kaliuresis, dan GFR. Ekstrak metanol daun ciplukan menyebabkan peningkatan eliminasi urin dan peningkatan ekskresi  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  dibandingkan dengan salin normal. Ekstrak mungkin bertindak dengan mekanisme aksi sinergis dari  $[\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-]$ ,  $[\text{HCO}_3^+/\text{H}^+]$  penukar dan antiporter  $[\text{N}^+/\text{H}^+]$ , untuk menyebabkan diuresis. Dilaporkan penelitian sebelumnya bahwa flavonoid dan glikosida memiliki aktivitas diuretik (Bose *et al* 2007). Berdasarkan hasil penelitian tersebut, ekstrak metanol daun ciplukan mempunyai efek sebagai diuretik dengan meningkatkan ekskresi urin, natrium, kalium dan klorida sehingga menurunkan volume darah, cairan ekstra sel, dan menurunkan resistensi perifer yang berpengaruh pada terjadinya penurunan tekanan darah.