

Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI.1 Penyiapan Bahan (Pengumpulan bahan, Determinasi dan Pembuatan Simplisia)

Daun sirih merah yang digunakan diperoleh dari Perkebunan Manoko, Lembang. Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui kebenaran suatu identitas tanaman yang digunakan dalam penelitian (Puzi dkk., 2013). Hasil determinasi di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah tanaman sirih merah spesies *Piper crocatum* Ruiz & Pav. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

Daun sirih merah sebanyak 2,0 kg setelah dikeringkan menghasilkan simplisia kering sebanyak 408,2 g. Proses Pengeringan dilakukan menggunakan oven dengan suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ (Candasari dkk, 2012). Pengeringan dengan oven akan memberikan kualitas simplisia yang lebih baik dibandingkan pengeringan dengan matahari langsung. Hal ini dikarenakan oven menggunakan suhu yang relatif rendah dibandingkan suhu sinar matahari yang lebih tinggi dan tidak konstan sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada kandungan kimia bahan yang dikeringkan (Wahyuni dkk., 2014) seperti kandungan minyak atsiri yang secara umum tidak tahan panas dan mudah menguap (Andini dkk., 2015).

VI.2 Karakterisasi Simplisia

Suatu simplisia dikatakan bermutu apabila memenuhi persyaratan mutu yang tertera dalam monografi simplisia antara lain susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol dan kandungan kimia simplisia. Persyaratan mutu ini berlaku bagi simplisia yang digunakan dengan tujuan pengobatan dan pemeliharaan kesehatan (Depkes RI, 2008).

Simplisia yang memenuhi persyaratan diharapkan dapat menghasilkan ekstrak sebagai produk kefarmasian dengan mutu yang baik, aman, terstandar dan stabilitasnya teruji sehingga sediaan yang dihasilkan merupakan sediaan yang terjamin mutunya (Suharti dkk., 2017). Hasil karakterisasi simplisia daun sirih merah dapat dilihat pada tabel VI.1.

Tabel VI.1
Karakterisasi Daun Sirih Merah

Parameter	Hasil Uji (Rata-rata)	Pustaka (MMI)
Kadar sari larut air	14,38%	>14%
Kadar sari larut etanol	16,73%	>4,5%
Kadar Abu Total	13,96%	<14%
Kadar Abu Tidak Larut Asam	5,96%	<7%
Susut Pengeringan	4,70%	-

Penetapan kadar sari larut air dan sari larut etanol dilakukan untuk menyatakan jumlah senyawa/ zat yang dapat tersari dalam pelarut air atau etanol (Depkes RI, 2000). Dari hasil tersebut kadar sari larut etanol lebih besar (16,73%) dibandingkan kasar sari larut air

(14,38%), hal ini menyatakan bahwa senyawa dari simplisia lebih banyak larut dalam pelarut etanol dibandingkan air.

Penetapan kadar abu total dilakukan dengan tujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral organik maupun anorganik yang diperoleh secara internal ataupun eksternal. Sedangkan kadar abu tidak larut asam bertujuan untuk mengetahui jumlah abu yang diperoleh dari faktor eksternal, bersumber dari pengotor yang berasal dari pasir atau tanah silikat (Depkes RI, 2000). Berdasarkan hasil tersebut kadar abu total sebesar 13,96% sedangkan kadar abu tidak larut asam hanya sebesar 5,96%. Hasil ini memenuhi persyaratan standar dalam pustaka yang digunakan.

Penetapan susut pengeringan bertujuan bahwa persentase senyawa yang menghilang selama proses pemanasan (tidak hanya menggambarkan air yang hilang, tetapi juga senyawa menguap lain) (Depkes RI, 2000). Dari hasil pengujian, diperoleh nilai susut pengeringan sebesar 4,70%, menunjukkan bahwa jumlah senyawa yang hilang (menguap) pada saat proses pengeringan hanya sebanyak 4,70%.

Berdasarkan tabel VI.1 dapat terlihat bahwa simplisia daun sirih merah yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi persyaratan mutu dengan parameter yang digunakan. Perhitungan kadar parameter karakterisasi simplisia dapat dilihat pada lampiran 6 sampai dengan lampiran 10.

VI.3 Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode ekstraksi cara dingin yaitu maserasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% yang merupakan pelarut universal sehingga diharapkan dapat menarik sebagian besar senyawa. Selain itu, menurut Markham 1998: golongan senyawa flavonoid dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol (Yulianingtyas dkk., 2016). Etanol dengan kadar yang tinggi dapat mengekstrak senyawa bioaktif dari daun sirih merah lebih banyak dibandingkan etanol dengan kadar yang lebih rendah (Nisa dkk. 2014).

Setelah proses maserasi, selanjutnya maserat diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut. Rendemen ekstrak daun sirih merah yang diperoleh sebesar 17,9% dimana hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan Puzi dkk (11,6%) dan Suhaimi dkk (13,7%). Perhitungan rendemen ekstrak etanol daun sirih merah dapat dilihat pada lampiran 5.

VI. 4 Penapisan Fitokimia

Penapisan/ skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan yang bertujuan memberi gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang diteliti (Simaremare, 2014). Selain pada simplisia, penapisan fitokimia dilakukan terhadap ekstrak untuk memastikan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam sampel tidak hilang selama/ setelah proses ekstraksi dilakukan. Hasil penapisan fitokimia simplisia dan ekstrak daun sirih merah dapat dilihat pada tabel VI.2.

Tabel VI.2**Penapisan Fitokimia Simplisia dan Ekstrak Daun Sirih Merah**

Parameter	Hasil Uji	
	Simplisia	Ekstrak
Alkaloid	-	-
Flavonoid	+	+
Saponin	+	+
Kuinon	-	-
Tanin	-	-
Steroid/Triterpenoid	+	+

Keterangan:

(+): teridentifikasi

(-): tidak teridentifikasi

Berdasarkan hasil yang tertera pada tabel VI.2, simplisia dan ekstrak keduanya positif mengandung flavonoid, saponin, dan steroid/triterpenoid. Namun, hal ini sedikit berbeda dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fitriyani dkk, Rahmawati dkk, dan Safithri dkk (dalam Parfati dan Tri, 2016) dimana sirih merah positif mengandung alkaloid. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh faktor geografis seperti perbedaan wilayah tumbuh yang dapat menyebabkan kandungan senyawa berbeda (Salim dkk., 2016).

Senyawa golongan flavonoid dari sirih merah diduga berperan penting dalam memberikan efek antihipertensi. Salah satu mekanisme kerja flavonoid sama dengan mekanisme furosemid dimana flavonoid bekerja dengan meningkatkan laju kecepatan glomerulus dan menghambat reabsorpsi Na^+ dan Cl^- menyebabkan peningkatan Na^+ dan air dalam tubulus sehingga meningkatkan pengeluaran volume urin. Diuretik bekerja dalam menurunkan tekanan darah dengan cara mengurangi volume cairan berlebihan didalam tubuh akibatnya mengurangi beban kerja jantung (Muthia dkk, 2017).

Selain memiliki aktivitas diuretik, flavanoid juga memiliki mekanisme kerja sama dengan pembanding captopril yaitu menghambat aktivitas enzim angiotensin converting (ACEI) dimana enzim ini bersifat vasokonstriktor yang dapat memicu peningkatan tekanan darah (Widiasari, 2018). Selain itu flavonoid juga bekerja dengan menurunkan stress oksidatif dan meningkatkan relaksasi endotel pembuluh darah (Grande dkk., 2016).

VI.7 Pengujian Aktivitas Antihipertensi dan Analisis Data

Pengujian aktivitas antihipertensi dilakukan dengan menggunakan 2 metode antara lain metode diuretik dan metode *non invasive blood pressure*.

VI.7.1 Metode Diuretik

Pengujian antihipertensi terlebih dahulu dilakukan dengan metode diuretik yaitu Lipschitz (Vogel, 2002) dengan mengukur volume total urin dari hewan uji. Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 6 ekor tikus, berdasarkan perhitungan rumus Federrer $((n-1)(t-1) \geq 15)$. Kelompok perlakuan terdiri dari kelompok normal, kelompok pembanding (furosemid), dosis 1 (25 mg/kgBB), dosis 2 (50 mg/kgBB), dan dosis 3 (100 mg/kgBB).

Air hangat 15 mL/kgBB digunakan sebagai loading dose untuk mencegah dehidrasi dan menginduksi/ merangsang untuk mempercepat proses urinasi tikus sehingga memperjelas efek diuretik yang terjadi (Aulia dkk., 2015). Air hangat diberikan 30 menit sebelum larutan uji.

Setelah pemberian larutan uji, volume urin diukur tiap 1 jam selama 6 jam dan volume total urin kumulatif setelah 24 jam. Volume urin yang lebih besar dari kelompok normal menunjukkan adanya aktivitas diuretik. Hasil pengujian aktivitas antihipertensi metode diuretik dapat dilihat pada tabel VI.3

Tabel VI.3
Volume Urin Rata-Rata Hewan Uji

Kelompok Perlakuan	Rata-rata volume urin (mL), jam ke-						Total (24 jam)
	1	2	3	4	5	6	
Normal	0,48	0,20	0,27	0,14	0,18	0,13	3,09±0,96 [#]
Pembanding	1,15	0,49	0,76	0,29	0,31	0,24	5,26±0,96 ^α
Dosis 1	0,56	0,46	0,57	0,25	0,37	0,26	3,37±1,32 [#]
Dosis 2	0,62	0,49	0,65	0,30	0,50	0,28	5,16±0,67 ^α
Dosis 3	0,56	0,49	0,57	0,24	0,34	0,29	6,23±0,92 ^α

Keterangan:

α: terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok normal ($p < 0,05$)

#: terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok pembanding ($p < 0,05$)

Data hasil uji diuretik yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan aplikasi SPSS versi 24 dengan derajat kepercayaan 95%. Berdasarkan uji normalitas dan uji homogenitas, didapatkan nilai $p > 0,05$ yang artinya sebaran data berdistribusi normal dan varian data homogen. Sehingga memenuhi syarat untuk uji *one way* ANOVA dimana hasil menunjukkan volume total 24 jam (T24) memiliki $p < 0,05$ yang artinya secara keseluruhan antara kelompok satu dengan kelompok lainnya memiliki perbedaan yang bermakna.

Berdasarkan uji *Post Hoc* terhadap volume urin total kumulatif, kelompok pembanding, dosis 2 dan dosis 3 memiliki perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dengan kelompok normal. Hal ini menunjukkan

bahwa kelompok perlakuan tersebut menghasilkan aktivitas sebagai diuretik. Kelompok dosis 1 (25 mg/kgBB) memiliki volume urin total kumulatif lebih banyak dibandingkan kelompok normal. Namun, secara statistik dosis 1 tidak memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok normal.

Hasil uji menunjukkan bahwa dosis 2 (50 mg/kgBB) dan dosis 3 (100 mg/kgBB) tidak memiliki perbedaan bermakna dengan pembandingan ($p < 0,05$) yang artinya kelompok dosis tersebut menghasilkan efek sebanding/ setara furosemid. Dosis 2 merupakan dosis yang paling mendekati rata-rata volume urin total furosemid yaitu sebesar 5,16 mL dengan nilai p -value 0,871. Dosis 3 (100 mg/kgBB) memiliki rata-rata volume urin total yang paling tinggi dibandingkan dosis lainnya yaitu sebesar 6,23 mL. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis berbanding lurus dengan efek diuretik yang dihasilkan.

VI.7.2 Metode *Non invasive blood pressure*

Pengujian antihipertensi dengan metode *non invasive blood pressure* didasarkan pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik dari hewan uji dengan cara *tail-cuff* menggunakan alat *blood pressure analyzer* (CODA®). Sensor VPR yang terdapat dalam alat ini memungkinkan adanya pengukuran non invasif dari volume darah pada ekor tikus (Mallkoff, 2005).

Pengukuran tekanan darah sistolik dan tekanan diastolik dilakukan dalam tiga kondisi yaitu T0 (awal), T14 (setelah induksi 14 hari) dan T28 (setelah pemberian larutan uji). Menurut Thompson, suatu zat ini dikatakan mempunyai efek antihipertensi jika mampu menurunkan tekanan sistolik ≥ 20 mmHg (Puspitaningrum dkk, 2014). Hasil tekanan darah rata-rata dari hewan uji dapat dilihat pada tabel VI.4

Tabel VI.4
Tekanan Darah Rata-Rata Hewan Uji

Kelompok Perlakuan	T0 (mmHg)		T14 (mmHg)		T28 (mmHg)	
	Sistol	Diastol	Sistol	Diastol	Sistol	Diastol
Normal	85,17 $\pm 3,69$	58,11 $\pm 2,86$	83,39 ^{*#} $\pm 6,39$	53,28 ^{*#} $\pm 6,36$	78,89 ^{*#} $\pm 5,09$	55,89 ^{*#} $\pm 6,00$
Induksi	85,61 $\pm 2,78$	59,89 $\pm 5,30$	115,45 $\pm 3,30$	81,22 $\pm 7,35$	114,89 [#] $\pm 3,05$	80,83 [#] $\pm 7,23$
Pembanding	87,00 $\pm 1,98$	60,11 $\pm 3,69$	113,33 $\pm 1,92$	78,39 $\pm 3,05$	87,33 [*] $\pm 1,79$	64,61 [*] $\pm 3,27$
Dosis 1	85,72 $\pm 1,59$	64,61 $\pm 3,53$	112,00 $\pm 1,13$	78,28 $\pm 4,39$	105,3 ^{*#} $\pm 1,87$	70,17 [*] $\pm 9,40$
Dosis 2	87,06 $\pm 3,33$	62,34 $\pm 3,35$	112,94 $\pm 4,09$	78,17 $\pm 5,65$	86,56 [*] $\pm 2,79$	59,83 [*] $\pm 6,30$
Dosis 3	86,22 $\pm 3,70$	62,39 $\pm 3,19$	112,67 $\pm 3,04$	78,00 $\pm 8,21$	84,39 [*] $\pm 2,84$	59,45 [*] $\pm 3,69$

Keterangan:

*: terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok induksi

#: terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok pembanding

Tekanan fisiologis tikus normal adalah 100/80 mmHg (Puspitaningrum dkk., 2014). Namun berdasarkan data diatas, rata-rata tekanan darah awal/ normal hewan uji sekitar $\pm 86/60$ sehingga nilai ini yang dijadikan acuan sebagai T0 (*baseline*). Setelah diinduksi dengan prednison 1,5 mg/kgBB dan NaCl 2% selama 14 hari (selain kelompok normal), terdapat peningkatan tekanan darah sistolik >20

mmHg dan tekanan darah diastolik >10 mmHg pada semua kelompok kecuali kelompok normal yang tidak diinduksi.

Pada manusia dinyatakan hipertensi apabila terjadi peningkatan sistolik >20 mmHg dan diastolik >10 mmHg dari tekanan darah normal. Selain itu, menurut Ciptaningsih (dalam Puspitaningrum dkk., 2014) hipertensi dicapai setelah tikus mengalami peningkatan tekanan darah >10 mmHg dari tekanan darah kelompok normal.

Data hasil uji yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan aplikasi SPSS versi 24 dengan derajat kepercayaan 95%. Berdasarkan uji normalitas dan uji homogenitas, didapatkan nilai $p>0,05$ yang artinya sebaran data berdistribusi normal dan varian data homogen. Sehingga memenuhi syarat untuk uji *one way* ANOVA dimana hasil menunjukkan T0 memiliki nilai $p>0,05$ yang artinya tidak terdapat perbedaan bermakna pada tiap kelompok secara keseluruhan. Berbeda dengan T0, hasil uji ANOVA T14 dan T28 memiliki perbedaan bermakna dengan nilai $p<0,05$.

Uji *Post Hoc* (LSD) dilakukan untuk melihat perbedaan antar masing-masing kelompok. Hasil uji *Post Hoc* (LSD) menunjukkan bahwa pengukuran T0 memiliki nilai $p>0,05$ atau tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok yang artinya tekanan darah pada masing-masing kelompok seragam. Maka nilai T0 tersebut dapat dijadikan acuan/*baseline* sebagai tekanan darah awal.

Pada pengukuran T14, kelompok normal berbeda bermakna dengan kelompok induksi dengan nilai $p<0,05$, sehingga dapat dinyatakan bahwa induksi yang diberikan berhasil meningkatkan tekanan darah dan membuat pemodelan pada hewan uji. Selain itu, kelompok

pembandingan, dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 memiliki nilai $p > 0,05$ terhadap kelompok induksi yang artinya tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan yang diberikan larutan penginduksi mampu membuat hewan uji dalam keadaan hipertensi.

Pada pengukuran T28, kelompok induksi memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok pembandingan ($p < 0,05$) disebabkan karena kelompok induksi tidak diberikan larutan uji apapun sehingga tekanan darah rata-rata kelompok ini tidak berbeda jauh dengan pengukuran T14. Kelompok dosis 1 (25 mg/kgBB) memiliki tekanan diastol yang tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$) terhadap pembandingan. Kelompok dosis 1 mampu menurunkan tekanan darah namun efeknya lebih rendah dibandingkan kelompok dosis lainnya.

Kelompok uji dosis 2 (50 mg/kgBB) dan dosis 3 (100 mg/kgBB) tidak memiliki perbedaan bermakna dengan kelompok pembandingan ($p > 0,05$) baik tekanan sistol maupun diastolnya. Hal ini menunjukkan bahwa kedua dosis ini memiliki aktivitas antihipertensi serupa/ sebanding dengan pembandingan captopril dengan penurunan tekanan darah sistolik > 20 mmHg dan penurunan tekanan diastolik > 10 mmHg. Antara dosis 2 dan dosis 3 tidak memiliki perbedaan bermakna/ signifikan yang artinya efek yang dihasilkan kedua dosis sama secara statistik sehingga dapat dinyatakan bahwa dosis 2 (50 mg/kgBB) merupakan dosis paling efektif dalam menurunkan tekanan darah.

Berdasarkan uji *t-paired*, pengukuran antara T0-T14, pengukuran antara T0-T28 serta pengukuran antara T14-T28 menunjukkan hasil nilai signifikansi (2-tailed) $<0,05$ yaitu masing-masing 0,000; 0,039; dan 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan antara variabel awal dengan variabel akhir yang artinya terdapat perbedaan perlakuan yang bermakna yang diberikan pada masing-masing variabel.