

Pengaruh pemberian sediaan nori kombinasi kunyit (*Curcuma longa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) terhadap modulasi ekspresi gen ACE, eNOS dan iNOS pada tikus hipertensi

Laporan Tugas Akhir

Hajar Sukmawati

11171014



Universitas Bhakti Kencana

Fakultas Farmasi

Program Strata I Farmasi

Bandung

2021

ABSTRAK

Pengaruh pemberian sediaan nori kombinasi kunyit (*Curcuma longa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) terhadap odulasi ekspresi gen ACE, eNOS dan iNOS pada tikus hipertensi

Oleh :
Hajar Sukmawati
11171014

Tekanan darah tinggi (hipertensi) adalah suatu kondisi tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg dan tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg. Hipertensi merupakan faktor resiko utama penyebab penyakit kardiovaskular yang dapat mengancam jiwa seperti infark miokard, gagal jantung koroner, gagal ginjal, dan stroke. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek antihipertensi dari kombinasi kunyit (*Curcuma longa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) yang dibuat dalam sediaan nori melalui metode preventif pada tikus yang diinduksi L-NAME dan tanpa induksi (sebagai suplemen). Tikus Wistar jantan (n=25) secara acak dimasukkan ke dalam kelompok kontrol negatif, positif, pembanding, suplemen, dan uji, diberi perlakuan selama 28 hari. Pengukuran tekanan darah dilakukan secara non invasive dengan CODA, penilaian elastisitas pembuluh darah menggunakan sensor EKG dan PPG, pengukuran kadar NO serum menggunakan reagen griess secara spektrofotometri λ 540 nm, serta dilakukan penilaian aktivitas ekspresi gen ACE, eNOS dan iNOS melalui metode semi kuantatif PCR basis gel. Hasil penelitian menunjukkan sediaan nori yang mengandung kombinasi kunyit dan pegagan dalam campuran pakan 5% memiliki efek antihipertensi ditandai dengan penurunan tekanan darah sistolik, diastolik serta tekanan arteri rata-rata melalui perbaikan elastisitas pembuluh darah (penurunan nilai PWV), denyut jantung, peningkatan ketersediaan NO dan ekspresi eNOS, serta penurunan ekspresi iNOS.

Kata Kunci: Antihipertensi, Ekspresi gen, *Curcuma longa*, *Centella asiatica*, Nori

ABSTRACT

Effect of giving nori a combination of turmeric (*Curcuma longa*) and gotu kola (*Centella Asiatica*) on the modulation of ACE, eNOS and iNOS gene expression in hypertensive rats

By:
Hajar Sukmawati
11171014

High blood pressure (hypertension) is a condition of systolic blood pressure > 140 mmHg and diastolic blood pressure > 90 mmHg. Hypertension is a major risk factor for causing life-threatening cardiovascular diseases such as myocardial infarction, coronary heart failure, kidney failure, and stroke. This study aims to examine the antihypertensive effect of the combination of turmeric (*Curcuma longa*) and gotu kola (*Centella asiatica*) made in nori preparations through a preventive method in rats induced by L-NAME and without induction (as a supplement). Wistar rats (n=25) were randomly assigned to negative, positive, comparison, supplement and test control groups, which were treated for 28 days. Measurement of blood pressure was carried out non-invasively with CODA, assessment of elasticity of blood vessels using ECG and PPG sensors, measurement of serum NO levels using Griess reagent by spectrophotometry λ 540 nm, as well as assessment of activity of gene expression of ACE, eNOS and iNOS through semi-quantitative PCR based method gel. The results showed that nori preparations containing a combination of turmeric and gotu kola in a 5% feed mixture had an antihypertensive effect marked by a decrease in systolic, diastolic blood pressure and mean arterial pressure through improved elasticity of blood vessels (decreased PWV value), heart rate, increased availability of NO and eNOS expression, as well as decreased iNOS expression.

Keywords: Antihypertensive, Gene expression, *Curcuma longa*, *Centella asiatica*, Nori

LEMBAR PENGESAHAN

Pengaruh pemberian sediaan nori (kombinasi ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) terhadap modulasi ekspresi gen ACE, eNOS dan iNOS pada tikus hipertensi

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan Sarjana Farmasi

Hajar Sukmawati

11171014

Bandung, 16 Juli 2021

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



(Dr. Apt. Yani Mulyani, M.Si.)

NIDN. 0421117803

Pembimbing Serta,



(Dr. Apt. Patonah, M.Si.)

NIDN. 0402087302

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur bagi Allah atas ridho-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Dan tidak lupa shalawat serta salam senantiasa terlimpahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW, yang telah menjadi suri tauladan yang baik bagi umatnya dan untuk berbuat kebajikan. Skripsi ini ditujukan untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan program Sarjana Farmasi di Universitas Bhakti Kencana Bandung.

Penulis memahami tanpa bantuan, doa, dan bimbingan dari semua orang akan sangat sulit untuk menyelesaikan skripsi ini. Maka dari itu penulis ingin mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya atas dukungan dan kontribusi kepada;

1. Ibu Dr. apt. Yani Mulyani, M.Si selaku pembimbing utama dan Dr. apt. Patonah, M.Si selaku pembimbing serta yang telah mempercayakan penulis dalam melaksanakan penelitian ini serta atas bimbingan dan arahan selama pelaksanaan tugas akhir dan ilmu maupun saran yang sangat membantu dalam kelancaran penelitian ini.
2. Bapak Soni Muhsinin, M.Si yang telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam melakukan penelitian mengenai ekspresi gen menggunakan PCR.
3. Seluruh jajaran Dosen dan Staf Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana.
4. Kedua orang tua dan saudara saya yang telah memberi berbagai macam bantuan baik dorongan doa, motivasi, moral dan materi.
5. Teman-teman fakultas farmasi angkatan 2017 terutama kelas FA1 yang selalu mendukung dalam perkuliahan.
6. Serta kepada semua pihak yang terlibat dan tidak dapat disebutkan satu persatu semoga Allah membalas kebaikannya.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis sendiri dan pembaca. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam skripsi ini.

Bandung, Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xi
BAB I. PENDAHULUAN	1
I.1. Latar belakang	1
I.2. Rumusan masalah	2
I.3. Tujuan dan manfaat penelitian	3
I.4. Hipotesis penelitian	3
I.5. Tempat dan waktu penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1. Hipertensi	4
II.1.1. Definisi	4
II.1.2. Etiologi	4
II.1.3 Patofisiologi	8
II.1.4 Klasifikasi	10
II.1.5 Terapi	11
II.2. Ekspresi Gen	14
II.2.1. Angiotensin Converting Enzyme	14
II.2.2. NO	15
II.2.2.1. Neuronal NOS	16
II.2.2.2. Inducible NOS	17
II.2.2.3. Endotel NOS	17
II.3. Kunyit (<i>Curcuma longa</i>)	18
II.3.1. Morfologi	18
II.3.2. Khasiat	19
II.3.3. Kandungan	20
II.4. Pegagan	20
II.4.1. Morfologi	21

II.4.2. Khasiat	22
II.4.3. Kandungan.....	22
II.5. Nori	23
II.5.1. Nori Artifisial	23
II.5.2. Komposisi Nori Artifisial	24
II.6. PCR.....	24
II.6.1. Deskripsi.....	24
II.6.2. Analisis Produk PCR	25
II.6.3. Variasi Metode PCR	25
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN.....	27
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN	28
IV.1. Alat dan Bahan	28
IV.1.1. Alat	28
IV.1.2. Bahan.....	28
IV.2. Pembuatan Nori	28
IV.3. Pengujian In Vivo.....	29
IV.3.1. Penyiapan Hewan	29
IV.3.2. Perlakuan Hewan.....	29
IV.3.3. Uji Antihipertensi	29
IV.2.3.1. Pengukuran tekanan darah	29
IV.2.3.2. Evaluasi kekakuan arteri dan pengukuran sudut spasial	30
IV.4. Metode In Vitro	31
IV.4.1. Pengukuran Kadar Oksida Nitrit	31
IV.4.1.1. Pembuatan Larutan Pereaksi Griess.....	31
IV.4.1.2. Pembuatan Larutan Baku Natrium Nitrit (NaNO ₂).....	31
IV.4.1.3. Pembuatan Seri Konsentrasi Natrium Nitrit (NaNO ₂).....	31
IV.4.1.4. Pembuatan Kurva Baku	32
IV.4.1.5. Penyiapan Serum	32
IV.4.1.6. Penentuan kadar NO serum	32
IV.4.2. Ekspresi Gen	32
IV.4.2.1. Desain Primer	32
IV.4.2.2. Sampel.....	33
IV.4.2.3. Isolasi Sampel RNA.....	33
IV.4.2.4. Sintesis cDNA	34
IV.4.2.5. Amplifikasi cDNA dengan PCR gel base.....	34

IV.4.2.6. Karakterisasi PCR dengan elektroforesis.....	35
IV.4.2.7. Semi kuantitatif dengan image J.....	35
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
V.1. Hasil Pengamatan terhadap Tekanan Darah	36
V.2. Hasil Pengamatan Elastisitas Pembuluh Darah	40
V.3. Hasil Pengamatan QRS-T spasial.....	42
V.4. Hasil Pengamatan Denyut Jantung.....	44
V.5. Hasil Pengamatan Kadar NO	45
V.6. Hasil Pengamatan Ekspresi Gen.....	48
BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN	55
VI.1. Simpulan	55
VI.2. Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA.....	56
LAMPIRAN	62

DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI

Gambar II.1. Patofisiologi Hipertensi	9
Gambar II.2. Tanaman Kunyit	19
Gambar II.3. Tanaman Pegagan	21

DAFTAR TABEL

Tabel II.1. Etiologi Hipertensi Sekunder (menurut Keyce dkk., 2015)	5
Tabel II.2. Etiologi Hipertensi Sekunder (menurut Whelton dkk., 2018).....	6
Tabel II.3. Klasifikasi hipertensi menurut JNC-VII 2003.....	11
Tabel II.4. Obat Antihipertensi yang direkomendasikan oleh JNC8.....	13
Tabel IV.1. Pengelompokan Hewan Uji	29
Tabel IV.2. Gen Primer	32
Tabel V. 1. Hasil Tekanan Darah Sistolik.....	37
Tabel V. 2. Hasil Tekanan Darah Diastolik	37
Tabel V. 3. Hasil Tekanan Arteri Rata-Rata (MAP)	38
Tabel V.4. Persen Penurunan Tekanan Darah	40
Tabel V. 5. Hasil Elastisitas Pembuluh Darah	40
Tabel V. 6. Hasil Sudut QRS-T Spasial	42
Tabel V. 7. Hasil Denyut Jantung.....	44
Tabel V. 8. Hasil Evaluasi Primer dengan OligoEvaluator™	50
Tabel V. 9. AUC Ekspresi Gen.....	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat persetujuan komisi etik	62
Lampiran 2. Perhitungan dosis	63
Lampiran 3. Hasil oligo evaluator dan snappene ACE	64
Lampiran 4. Hasil oligo evaluator dan snappene eNOS	65
Lampiran 5. Hasil oligo evaluator dan snappene iNOS	66
Lampiran 6. Dokumentasi penelitian	67
Lampiran 7. Hasil Cek Plagiasi	70
Lampiran 8. Surat Pernyataan Bebas Plagiasi	71
Lampiran 9. Surat Persetujuan untuk dipublikasikan di media on line	72
Lampiran 10. Persetujuan dosen pembimbing terhadap ttd virtual	73

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	NAMA
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Ang	Angiotensin
CVD	Cardiovaskular Disease
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthases
HR	Heart Rate
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthases
L-NAME	N ω -nitro-L-arginine-methyl ester
LSD	Least Significance Different
MAP	Mean Arterial Pressure
nNOS	Neuronal Nitric Oxide Synthases
NO	Nitric Oxide
PCR	Polymerase Chain Reaction
PWV	Pulse Wave Velocity
RAAS	Renin Angiotensin-Aldosteron System
TDD	Tekanan Darah Diastolik
TDS	Tekanan Darah Sistolik
VPR	Volume Pressure Recording

BAB I. PENDAHULUAN

I.1. Latar belakang

Peningkatan tekanan darah merupakan faktor risiko utama terjadinya jantung koroner dan penyakit serebrovaskular, selain itu tekanan darah yang tidak terkontrol juga dapat menyebabkan gagal jantung, gangguan ginjal, penyakit pembuluh darah perifer dan kerusakan pembuluh darah retinal (gangguan penglihatan). Sekitar 970 juta orang di seluruh dunia memiliki tekanan darah yang tinggi. Tahun 2025 diperkirakan 1,56 miliar orang dewasa akan hidup dengan hipertensi (Kayce Bell dkk., 2015). Berdasarkan data Riskesdas 2018 hasil pengukuran pada penduduk usia 18 tahun prevalensi hipertensi sebesar 34,1%, kasus hipertensi tertinggi terjadi di Kalimantan Selatan sebesar 44,1%, sedangkan kasus terendah yaitu di Papua sebesar 22,2%. Kelompok kasus hipertensi tertinggi yaitu sebesar 55,2% terjadi pada kelompok usia 55-64 tahun (Kemenkes, 2019).

Hipertensi adalah suatu kondisi dimana tekanan darah yang meningkat lebih dari atau sama dengan 140/90 mmHg (Kayce Bell dkk., 2015). Sistem renin-angiotensin (RAS) memainkan peran utama dalam patogenesis penyakit kardiovaskular. Di dalam RAS, *angiotensin converting enzyme* (ACE) merupakan komponen yang paling berperan, ACE mengubah angiotensin (Ang) I menjadi angiotensin (Ang) II yang merupakan peptida vasoaktif utama dari RAS (Ferreira dkk., 2011) berperan dalam regulasi tekanan darah dan merupakan sebuah vasokonstriktor kuat (Ngo dkk., 2014), sedangkan ACE2 bertanggung jawab untuk memetabolisme Ang II menjadi heptapeptida Angiotensin-(1-7) yang mencegah perkembangan fibrosis ventrikel (Ferreira dkk., 2011).

Hipertensi juga telah dikaitkan dengan penurunan aktivitas kaskade NOS/NO/cGMP. Vasorelaksasi sebagai respons terhadap vasodilator yang bergantung pada endotel (misalnya, Asetilkolin). Meskipun awalnya diidentifikasi sebagai vasodilator, nitrit oksida (NO) telah muncul sebagai mediator penting dalam beragam fungsi biologis. Dalam sistem kardiovaskular, NO berperan dalam regulasi tonus vaskular, kontraktilitas jantung, remodeling vaskular, dan fungsi barorefleks. Kelainan bioavailabilitasnya secara kausal berkaitan dengan berbagai penyakit kardiovaskular dan ginjal. NO disintesis dari prekursornya yaitu *L-arginine* oleh keluarga NO *synthases* (NOS) termasuk neuronal NOS (nNOS), *inducible* NOS (iNOS), dan endotel NOS (eNOS) (Lee dkk., 2016). Penurunan aktivitas eNOS terutama berpengaruh terhadap peningkatan tekanan darah, dan ekspresi iNOS yang abnormal kemungkinan terkait dengan perkembangan disfungsi vaskular (Lee dkk., 2016).

Saat ini nori merupakan jenis makanan yang makin populer di kalangan masyarakat. Selain itu nori juga memiliki rasa yang enak sehingga tingkat konsumsi nori semakin meningkat. Berdasarkan beberapa penelitian *Curcuma longa* memiliki aktivitas terhadap hipertensi. Aktivitas tersebut berasal dari konstituen aktif utama *Curcuma longa* yaitu kurkumin. Kurkumin memberikan efek menguntungkan pada penyakit kardiovaskular, meskipun target molekulernya banyak, kurkumin dapat mengatur DNA polymerase, protein kinase C, lipoksigenase, faktor pertumbuhan, faktor transkripsi, sitokin inflamasi, molekul adhesi dan protein terkait apoptosis (Yao dkk., 2016). Kurkumin (diferuloylmethane) juga memiliki efek antiinflamasi melalui penurunan faktor regulasi transkripsi inflamasi (seperti faktor inti κ B), enzim (seperti siklooksigenase 2 dan 5 lipoksigenase) dan sitokin (seperti faktor nekrosis tumor, interleukin). Karena peran penting terhadap peradangan sehingga memiliki potensi pada sebagian besar penyakit kronis, seperti penyakit neoplastik, neurologis, kardiovaskular, paru, dan metabolik (Aggarwal & Sung, 2009). Selain kunyit, pegagan (*Centella asiatica*) memiliki efek langsung dalam menurunkan tekanan darah (Cristovao dkk., 2012). Asam asiatik merupakan senyawa triterpenoid yang berasal dari pegagan, Asam asiatik mengurangi semua perubahan hemodinamik yang ada pada hipertensi. Efek antihipertensi asam asiatik karena kemampuannya untuk mengurangi aktivasi berlebihan RAS melalui penghambat ACE sehingga dapat memperbaiki gangguan hemodinamik. Mekanisme penghambatan ACE dapat berupa interaksi langsung antara asam asiatik dan ACE dan/atau asam asiatik menurunkan kadar protein ACE (Maneesai dkk., 2017).

Berdasarkan uraian tersebut penelitian ini bertujuan untuk mengkaji kombinasi kunyit (*Curcuma longa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) dalam bentuk olahan nori terhadap tekanan darah, kekakuan arteri, kadar NO dan modulasi ekspresi gen ACE, eNOS serta iNOS pada model hewan hipertensi yang diinduksi dengan L-NAME.

I.2. Rumusan masalah

- a. Bagaimana pengaruh pemberian sediaan nori kombinasi kunyit (*Curcuma longa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) terhadap tekanan darah, kekakuan arteri dan kadar NO melalui studi preventif terhadap hewan uji hipertensi.
- b. Bagaimana pengaruh pemberian sediaan nori kombinasi kunyit (*Curcuma longa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) terhadap modulasi ekspresi gen ACE, eNOS dan iNOS pada model hewan hipertensi

I.3. Tujuan dan manfaat penelitian

- a. Mengetahui pengaruh pemberian sediaan nori kombinasi kunyit (*Curcuma longa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) terhadap tekanan darah, kekakuan arteri dan kadar NO melalui studi preventif terhadap hewan uji hipertensi.
- b. Mengetahui pengaruh pemberian sediaan nori kombinasi kunyit (*Curcuma longa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) terhadap modulasi ekspresi gen ACE, eNOS dan iNOS pada hewan uji hipertensi.

I.4. Hipotesis penelitian

Pemberian sediaan nori yang mengandung kombinasi kunyit (*Curcuma longa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) pada model hewan hipertensi dapat memberikan pengaruh terhadap penurunan tekanan darah, perbaikan arteri dan peningkatan kadar NO serta memodulasi ekspresi gen ACE, eNOS dan iNOS

I.5. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium hewan dan laboratorium instrument Universitas Bhakti Kencana pada bulan Maret hingga Mei tahun 2021.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Hipertensi

II.1.1. Definisi

Hipertensi adalah kondisi medis kronis yang ditandai dengan tekanan darah arteri tinggi (Abdel-Rahman dkk., 2017). Jika tekanan darah sistol lebih dari 140 mmHg dan tekanan darah diastolik lebih dari 90 mmHg maka disebut dengan hipertensi atau tekanan darah tinggi (Kemenkes.RI, 2014). Hipertensi sistolik terisolasi didefinisikan sebagai peningkatan tekanan darah sistolik (≥ 140 mmHg) dan tekanan darah diastolik rendah (< 90 mmHg), yang sering terjadi pada usia muda, termasuk pada anak-anak dan lanjut usia. Hipertensi sistolik terisolasi adalah bentuk paling umum dari hipertensi esensial. Pada orang tua mencerminkan pengerasan arteri besar dengan peningkatan tekanan nadi (perbedaan antara TDS dan TDD). Jika tekanan darah terjadi dalam waktu yang lama (persisten) maka dapat menyebabkan resiko kerusakan pada organ ginjal (gagal ginjal), jantung (jantung koroner) dan otak (stroke) (Kemenkes.RI, 2014). Peningkatan risiko terjadi pada individu yang berusia antara 40 hingga 89 tahun. Untuk setiap peningkatan tekanan darah sistolik sebesar 20 mmHg atau diastolik sebesar 10 mmHg, maka terjadi dua kali lipat resiko mortalitas dari penyakit jantung iskemik serta stroke (JNC VII, 2004).

II.1.2. Etiologi

Penyebab hipertensi esensial sering diidentifikasi tidak diketahui atau dikaitkan dengan genetik atau gen kurang diekspresikan serta fenotipe perantara yang mereka atur untuk menyebabkan tekanan darah tinggi. Terdapat beberapa faktor meningkatkan TD, yaitu : obesitas, resistensi insulin, konsumsi alkohol yang tinggi, makanan tinggi garam (pada pasien yang sensitif terhadap garam), penuaan dan mungkin akibat pola hidup menetap, stres, kurangnya asupan kalium dan kalsium (Ebomoyi & Iyawe, 2009).

Lebih dari 90% penderita tekanan darah tinggi penyebabnya tidak diketahui. Hal tersebut dikategorikan sebagai hipertensi primer atau esensial. Dan kurang dari 10% penderita menunjukkan penyebab spesifik tekanan darah tinggi, maka dikategorikan sebagai hipertensi sekunder. Hipertensi esensial tidak dapat disembuhkan, tetapi tekanan darah dapat dikontrol dengan terapi yang tepat (termasuk melakukan modifikasi gaya hidup dan terapi), faktor genetik merupakan faktor utama dalam perkembangan hipertensi primer. Hipertensi esensial cenderung berkembang secara bertahap selama bertahun-tahun. Hipertensi sekunder disebabkan oleh kondisi medis atau karena pengobatan (Tabel II.1.).

Dengan mengontrol kondisi medis yang terkait atau menghindari obat penyebab, akan memberi efek penurunan tekanan darah sehingga dapat mengatasi hipertensi sekunder. Penyebab tersering hipertensi sekunder dikaitkan dengan gangguan ginjal seperti penyakit ginjal kronis atau penyakit renovaskular. Hipertensi sekunder umumnya muncul secara tiba-tiba dan seringkali mengakibatkan tekanan darah lebih tinggi daripada hipertensi primer (Kayce Bell dkk., 2015).

Tabel II. 1. Etiologi Hipertensi Sekunder (Menurut Keyce dkk., 2015)

Keadaan Penyakit	Obat-obatan dan produk lainnya
<ul style="list-style-type: none"> • Penyakit ginjal • Tumor kelenjar adrenal • Penyakit tiroid • Gangguan pembuluh darah bawaan • Penyalahgunaan alkohol atau penggunaan alkohol kronis • <i>Obstructive sleep apnea</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i> (NSAIDs) (seperti ibuprofen, naproxen) • Pil KB • Dekongestan (pseudoephedrine, phenylephrine) • Kokain • Amfetamin (seperti, amfetamin, methylphenidate, lisdexamfetamine) • Makanan (makanan tinggi natrium seperti makanan kaleng atau olahan, saus salad, keju, keripik, manisan) • Alkohol

Penyebab hipertensi menurut Whelton dkk., 2018, yaitu :

1. Predisposisi Genetik

Banyak gen atau kombinasi gen yang mempengaruhi tekanan darah sehingga hipertensi disebut sebagai kelainan poligenik kompleks. Varian genetik yang diketahui berkontribusi terhadap hipertensi mencakup lebih dari 25 mutasi langka dan 120 polimorfisme nukleotida tunggal. Adanya sejumlah besar alel merupakan efek kecil yang terkait dengan hasil tekanan darah yang lebih tinggi dalam peningkatan tekanan darah yang lebih cepat seiring bertambahnya usia.

2. Faktor Risiko Lingkungan

Berbagai faktor lingkungan, meliputi komponen makanan, aktivitas fisik, dan konsumsi alkohol, mempengaruhi tekanan darah. Beberapa komponen makanan yang telah dikaitkan dengan hipertensi termasuk kelebihan konsumsi natrium, kalium, kalsium, magnesium,

protein (terutama dari sayuran), serat, dan lemak ikan yang tidak mencukupi. Pola makan yang buruk, kurangnya aktivitas fisik, dan asupan alkohol yang berlebihan, baik sendiri atau dalam kombinasi, adalah penyebab utama sebagian besar hipertensi.

3. Hipertensi Sekunder

Banyak penyebab hipertensi sekunder sangat terkait dengan temuan klinis atau kelompok temuan yang menunjukkan kelainan tertentu (Tabel II.2.).

4. Obat-obatan dan Zat Lain yang Berpotensi Merusak Kontrol Tekanan Darah

Beberapa zat termasuk obat resep, obat bebas, bahan herbal, dan bahan makanan dapat mempengaruhi tekanan darah. Perubahan tekanan darah yang terjadi karena obat dan agen lain telah dikaitkan dengan perkembangan hipertensi, memburuknya kontrol pada pasien yang sudah menderita hipertensi, atau pelemahan efek penurun tekanan darah dari terapi antihipertensi. Perubahan tekanan darah juga dapat terjadi akibat interaksi obat-obat atau obat-makanan. Seperti, alkohol, amfetamin (misalnya, amphetamine, methylphenidate, dexmethylphenidate, dextroamphetamine), antidepresan (misalnya, *Monoamine Oxidase Inhibitors* (MAOIs), *Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors* (SNRIs), *Antidepresan trisiklik* (TCAs)), antipsikotik atipikal (misalnya, clozapine, olanzapine), kafein, dekonjestan (misalnya, fenilefrin, pseudoefedrin), suplemen Herbal (misalnya, *Ma Huang* [ephedra], *St. John's wort* [dengan penghambat MAO, yohimbine]), immunosupresan (mis., Siklosporin), kontrasepsi oral, NSAID, obat rekreasi (mis., kokain, metamfetamin, dll.), kortikosteroid sistemik (misalnya, deksametason, fludrocortisone, metilprednisolon, prednison, prednisolon), penghambat angiogenesis (mis., bevacizumab) dan penghambat tirosin kinase (mis., sunitinib, sorafenib) (Whelton dkk., 2018).

Tabel II. 2. Etiologi Hipertensi Sekunder (menurut Whelton dkk., 2018)

	Prevalensi	Indikasi Klinis
Penyebab umum		
Penyakit parenkim ginjal	1%–2%	Infeksi saluran kemih; obstruksi, hematuria; frekuensi kencing dan nokturia; penyalahgunaan analgesik; riwayat keluarga penyakit ginjal polistik; peningkatan kreatinin serum; urinalisis abnormal
Penyakit renovaskular	5%–34%	Hipertensi resisten; hipertensi onset mendadak atau memburuk atau

		semakin sulit dikendalikan; flash edema paru (aterosklerotik); hipertensi onset dini, terutama pada wanita (hiperplasia fibromuskular)
Aldosteronisme primer	8%–20%	Hipertensi resisten; hipertensi dengan hipokalemia (spontan atau diuretik); hipertensi dan kram otot atau kelemahan; hipertensi dan kebetulan ditemukan massa adrenal; hipertensi dan apnea tidur obstruktif; hipertensi dan riwayat keluarga hipertensi onset dini atau stroke
Apnea tidur obstruktif	25%–50%	Hipertensi resisten; keruh; tidur gelisah; pernapasan berhenti
Diinduksi obat atau alkohol	2%–4%	Hipertensi resisten; keruh; tidur gelisah; pernapasan berhenti selama tidur; kantuk di siang hari
Penyebab yang tidak umum		
Pheochromocytoma/para ganglioma	0.1%– 0.6%	Hipertensi resisten; keruh; Antasida yang mengandung natrium; kafein; nikotin (merokok); alkohol; NSAID; kontrasepsi oral; siklosporin atau takrolimus; simpatomimetik (dekongestan, anorektik); kokain, amfetamin dan obat-obatan terlarang lainnya; agen neuropsikiatri; agen perangsang eritropoiesis; penarikan clonidine; pernapasan berhenti saat tidur; kantuk di siang hari
Sindrom Cushing	<0.1%	Hipertensi resisten; hipertensi paroksismal atau krisis; sakit kepala, berkeringat, palpitasi, pucat; riwayat

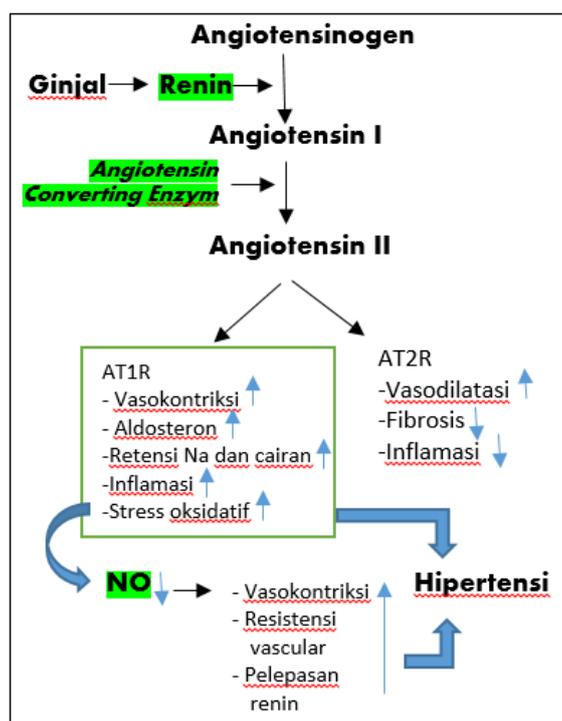
		keluarga positif pheochromocytoma /paraganglioma; incidentaloma adrenal
Hipotiroidisme	<1%	Pertambahan berat badan yang cepat, terutama dengan distribusi terpusat; kelemahan otot proksimal; depresi; hiperglikemia
Hipertiroidisme	<1%	Kulit kering; intoleransi dingin; sembelit; suara serak; penambahan berat badan
Koarktasio aorta (tidak terdiagnosis atau diperbaiki)	0.1%	Kulit hangat dan lembab; intoleransi panas; kegugupan; gemetar; insomnia; penurunan berat badan; diare; kelemahan otot proksimal
Hiperparatiroidisme primer	Langka	Pasien muda dengan hipertensi (usia <30 tahun)
Hiperplasia adrenal kongenital	Langka	Hiperkalsemia
Sindrom kelebihan mineralokortikoid selain aldosteronisme primer	Langka	Hipertensi dan hipokalemia; virilisasi (11-beta-hidroksilase defisiensi [11-beta-OH]); maskulinisasi tidak lengkap pada pria dan amenore primer pada wanita (defisiensi 17-alpha-hydroxylase [17-alpha-OH])
Akromegali	Langka	Hipertensi onset dini; hipertensi resisten; hipokalemia atau hiperkalemia

II.1.3 Patofisiologi

Beberapa faktor yang mempengaruhi tekanan darah berkontribusi dalam mengembangkan hipertensi primer. Faktor utama yang berperan meliputi masalah hormonal [hormon natriuretik,

sistem renin angiotensin-aldosteron (RAAS)] atau gangguan elektrolit (natrium, klorida, kalium). Hormon natriuretik menyebabkan peningkatan konsentrasi natrium dalam sel yang mengakibatkan terjadinya tekanan darah tinggi. Sistem renin angiotensin-aldosteron berperan dalam mengontrol natrium, kalium, dan volume darah, yang pada akhirnya akan mengatur tekanan darah di arteri (Kayce Bell dkk., 2015).

Renin yang telah dilepaskan dari ginjal selanjutnya berikatan dengan angiotensinogen menjadi angiotensin I, angiotensin I oleh bantuan ACE (angiotensin converting enzim) diubah menjadi angiotensin II. Angiotensin II mengaktifkan reseptor AT1 sehingga menimbulkan efek vasokonstriksi yang kuat pada pembuluh darah, rangsangan aldosteron yang menyebabkan retensi cairan dan natrium, meningkatnya inflamasi, meningkatnya stres oksidatif yang menurunkan kadar NO. Penurunan NO ini akan memperberat terjadinya vasokonstriksi pembuluh darah, selain itu menyebabkan retensi natrium atau meningkatnya reabsorpsi natrium. Kondisi tersebut akan menyebabkan peningkatan tahanan perifer total dan *Cardiac Output* yang akhirnya terjadi Hipertensi (Gambar II.1) (Kadir, 2018).



Gambar II.1. Patofisiologi Hipertensi

II.1.4 Klasifikasi

Klasifikasi hipertensi menurut Kemenkes RI 2014 dibagi kedalam beberapa kelompok yaitu:

1. Berdasarkan penyebabnya, hipertensi dapat dibagi menjadi 2 kelompok yaitu:
 - a. Hipertensi Primer/Esensial (90%)

Hipertensi yang penyebabnya tidak diketahui (idiopatik), walaupun dikaitkan dengan kombinasi faktor gaya hidup seperti kurang bergerak (inaktivitas) dan pola makan.
 - b. Hipertensi Sekunder/Non Esensial (10%)

Hipertensi yang diketahui penyebabnya, sekitar 5-10% penderita hipertensi disebabkan oleh penyakit ginjal. Sekitar 1-2%, penyebabnya adalah kelainan hormonal atau pemakaian obat tertentu (misalnya pil KB).
2. Berdasarkan bentuk Hipertensi :
 - a. Hipertensi diastolik
 - b. Hipertensi campuran (sistol dan diastol yang tinggi)
 - c. Hipertensi sistolik (*isolated systolic hypertension*).
3. Terdapat jenis hipertensi yang lain:
 - a. Hipertensi Pulmonal

Peningkatan tekanan darah pada pembuluh darah arteri paru-paru yang mengakibatkan sesak nafas, pusing dan pingsan pada saat beraktivitas. Berdasar penyebabnya hipertensi pulmonal dapat menjadi penyakit berat yang ditandai dengan penurunan toleransi dalam melakukan aktivitas dan gagal jantung kanan. Hipertensi pulmonal primer sering terjadi pada usia muda dan usia pertengahan, lebih sering pada perempuan dengan perbandingan 2:1. Kriteria diagnosis untuk hipertensi pulmonal merujuk pada *National Institute of Health*; yaitu tekanan darah sistolik arteri pulmonalis > 35 mmHg atau "rata-rata" tekanan arteri pulmonalis > 25 mmHg pada saat istirahat atau > 30 mmHg pada saat beraktivitas dan tidak terdapat kelainan katup pada jantung kiri, penyakit miokardium, penyakit jantung kongenital dan tidak adanya kelainan paru.
 - b. Hipertensi Pada Kehamilan

Pada dasarnya terdapat 4 jenis hipertensi yang umumnya terjadi pada saat kehamilan, yaitu:

 - a) Preeklampsia-eklampsia disebut juga sebagai hipertensi yang diakibatkan kehamilan/keracunan kehamilan (selain tekanan darah yang meningkat, juga terdapat kelainan pada air kencingnya). Preeklampsia yaitu penyakit yang timbul

dengan tanda-tanda hipertensi, edema, dan proteinuria yang muncul karena kehamilan.

- b) Hipertensi kronik yaitu hipertensi yang telah muncul dari sebelum ibu mengandung janin.
- c) Preeklampsia pada hipertensi kronik, yaitu gabungan preeklampsia dengan hipertensi kronik.
- d) Hipertensi gestasional atau hipertensi yang sesaat. Penyebab hipertensi ini sebenarnya belum jelas. Ada yang mengatakan bahwa hal tersebut disebabkan oleh kelainan pembuluh darah, ada yang mengatakan dikarenakan faktor diet, tetapi ada pula yang mengatakan disebabkan oleh faktor keturunan, dan lain sebagainya (Kemenkes.RI, 2014).

Tabel II. 3. Klasifikasi hipertensi menurut JNC-VII 2003

Kategori	TDS (mmHg)		TDD (mmHg)
Normal	< 120	dan	< 80
Pre-hipertensi	120 – 139	atau	80 – 89
Hipertensi tingkat 1	140 – 159	atau	90 – 99
Hipertensi tingkat 2	≥ 160	atau	≥ 100

II.1.5 Terapi

Terapi non farmakologis

Terapi non farmakologi untuk mengatasi hipertensi yang utama adalah melakukan pola hidup sehat, secara umum merupakan strategi yang dapat mengurangi risiko kejadian kardiovaskular. Pada penderita hipertensi derajat 1, tanpa faktor risiko penyakit kardiovaskular lain, maka modifikasi pola hidup sehat merupakan tata laksana tahap awal yang harus dilakukan yaitu selama 4–6 bulan. Jika setelah jangka waktu tersebut, tidak didapatkan hasil yang diharapkan yaitu penurunan tekanan darah atau bahkan menimbulkan faktor risiko kardiovaskular yang lain, maka sangat dianjurkan untuk memulai terapi farmakologi (Muhadi, 2016).

Beberapa gaya hidup sehat yang dianjurkan oleh beberapa guidelines adalah :

- Penurunan berat badan. Dengan melakukan pengaturan dalam makanan yaitu mengganti makanan tidak sehat dengan memperbanyak makanan yang bergizi seperti sayuran dan buah-buahan yang dapat memberikan manfaat lebih selain penurunan tekanan darah, yaitu dapat terhindar dari diabetes dan dislipidemia.

- Mengurangi asupan garam. Sebagian besar penderita hipertensi tidak sadar dengan kandungan garam yang terdapat dalam makanan cepat saji, makanan kaleng, daging olahan dan sebagainya. Makanan rendah garam ini juga berguna dalam menurunkan dosis obat antihipertensi pada pasien hipertensi derajat ≥ 2 . Asupan garam yang dianjurkan adalah tidak melebihi dari 2 g/hari
- Olah raga. Olahraga merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk menurunkan tekanan darah, dianjurkan melakukan olahraga secara teratur sebanyak 30 – 60 menit/hari atau minimal 3 hari/minggu. Bila pasien yang tidak memiliki waktu untuk berolahraga secara khusus, sebaiknya harus tetap dianjurkan untuk berjalan kaki, mengendarai sepeda atau menaiki tangga dalam aktivitas rutin mereka di tempat kerjanya.
- Mengurangi konsumsi alkohol. Karena konsumsi alkohol dapat menyebabkan tekanan darah meningkat, maka dengan membatasi atau menghentikan konsumsi alkohol dapat membantu dalam penurunan tekanan darah. Konsumsi alkohol > 2 gelas per hari pada pria atau 1 gelas per hari pada wanita, dapat meningkatkan tekanan darah.
- Berhenti merokok. Meskipun merokok hingga saat ini belum terdapat bukti memberi efek langsung terhadap penurunan tekanan darah, akan tetapi merokok merupakan salah satu faktor risiko utama penyakit kardiovaskular, sehingga pasien sebaiknya dianjurkan untuk berhenti merokok (Muhadi, 2016).

Terapi farmakologi

Secara umum, terapi farmakologi pada hipertensi derajat 1 dilakukan setelah lebih dari 6 bulan melakukan modifikasi gaya hidup sehat namun tidak mengalami penurunan tekanan darah atau jika pasien mengalami hipertensi derajat ≥ 2 . Terdapat beberapa prinsip dasar dalam melakukan terapi farmakologi yang perlu diperhatikan untuk menjaga kepatuhan dan meminimalisasi efek samping, yaitu:

- Bila memungkinkan, terapi dengan obat dosis tunggal
- Berikan obat generik (non-paten) bila sesuai dan dapat mengurangi biaya
- Obat pada pasien usia lanjut (> 80 tahun) sama halnya seperti pada usia 55–80 tahun, namun perlu memperhatikan faktor komorbid
- Jangan mengkombinasikan *angiotensin converting enzyme inhibitor* (ACE-i) dengan *angiotensin II receptor blockers* (ARBs)
- Berikan edukasi terpadu kepada pasien terkait terapi farmakologi
- Lakukan pemantauan efek samping obat secara berkala (PERKI, 2015).

Lebih dari dua pertiga penderita hipertensi tidak dapat dikontrol hanya dengan satu obat dan akan membutuhkan dua atau lebih obat antihipertensi yang dipilih dari kelas yang berbeda, Pada studi ALLHAT (*Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial*) 60% penderita, tekanan darahnya dikontrol menjadi <140/90 mmHg dengan dua atau lebih agen, dan hanya 30% secara keseluruhan yang dikontrol dengan satu obat. Diuretik tipe tiazid telah menjadi dasar terapi antihipertensi di sebagian besar uji coba hasil terkontrol plasebo, di mana kejadian CVD, termasuk stroke, penyakit jantung koroner, dan gagal jantung telah dikurangi dengan penurunan tekanan darah. Namun, ada juga data uji klinis yang sangat baik yang membuktikan bahwa menurunkan TD dengan golongan obat lain, termasuk ACEI, ARB, *beta blocker* (BB), dan *calcium channel blockers* (CCB) juga mengurangi komplikasi hipertensi. Beberapa uji coba terkontrol secara acak telah menunjukkan penurunan CVD dengan BB, tetapi manfaatnya kurang konsisten dibandingkan dengan diuretik. Percobaan Eropa tentang Hipertensi Sistolik pada Lansia (Syst-EUR) menunjukkan penurunan yang signifikan pada stroke dan semua CVD dengan dihydropyridine CCB, nitrendipine, dibandingkan dengan plasebo. Studi Evaluasi Pencegahan Hasil Jantung (HOPE), yang tidak terbatas pada individu hipertensi tetapi yang termasuk sub kelompok hipertensi yang cukup besar, menunjukkan pengurangan dalam berbagai kejadian CVD dengan ACEI, ramipril, dibandingkan dengan plasebo pada individu dengan riwayat CVD atau diabetes mellitus yang dikombinasikan dengan faktor risiko lain. Studi Penyakit Arteri Koroner (EUROPA) dimana ACEI, perindopril, ditambahkan ke terapi yang ada pada pasien rawat inap. dengan penyakit koroner stabil dan tanpa HF juga menunjukkan penurunan kejadian CVD dengan ACEI (JNC VII, 2004).

Tabel II. 4.4. Obat Antihipertensi yang direkomendasikan oleh JNC 8

Obat Antihipertensi	Dosis awal harian, mg	Dosis target dalam peninjauan RTC	Jumlah dosis per hari
ACE inhibitor			
Captopril	50	150-200	2
Enalapril	5	20	1-2
Lisinopril	10	40	1
Angiotensin reseptor beta			
Eprosartan	400	600-800	1-2
Candesartan	4	12-32	1
Losartan	50	100	1-2
Valsartan	40-80	160-320	1
Irbesartan	75	300	1
β-blocker			

Atenolol	25-50	100	1
Metoprolol	50	100-200	1-2
Calcium channel blockers			
Amlodipine	2-5	10	1
Diltiazem	120-180	360	1
Nitrendipine	10	20	1-2
Thiazide-tipe diuretic			
Bendroflumethiazide	5	10	1
Chlorthalidone	12,5	12,5-25	1
Hydrochlorothiazide	12,5-2,5	25-100	1-2
Indapamide	1,25	1,25-2,5	1

II.2. Ekspresi Gen

Ekspresi gen adalah proses kehidupan fundamental yang menyediakan jembatan antara informasi yang dikodekan di dalam gen dan produk gen fungsional akhir, seperti protein atau *non-coding* RNA (nC-RNA). Untuk ekspresi protein, ini adalah proses multi-tahap yang mencakup transkripsi, penyambungan mRNA, terjemahan, dan modifikasi protein pasca-translasi. Proses ini dapat dimodulasi pada setiap tahap, sehingga mengontrol kuantitas dan parameter spasiotemporal penampilan protein fungsional. Ini penting untuk mempertahankan struktur dan fungsi sel normal, dan juga merupakan dasar untuk perubahan perkembangan, seperti diferensiasi dan morfogenesis. Kemampuan untuk mengatur ekspresi gen memungkinkan sel mengirimkan protein fungsional kapanpun dibutuhkan untuk fungsi normal atau kelangsungan hidupnya. Mekanisme ini mendasari berbagai proses fisiologis dan patologis, termasuk adaptasi seluler terhadap lingkungan baru, pemeliharaan homeostasis, dan pemulihan dari kerusakan. Kuantitas ekspresi gen penyandi protein biasanya dilakukan dengan mengukur jumlah protein. Selain itu, penyelidikan lokasi ekspresi (lokalisasi produk gen) dapat memberikan informasi penting untuk studi perkembangan organ kompleks, seperti otak, dan analisis fungsi protein pada tingkat regional dan sel tunggal. Namun, dalam banyak situasi eksperimental, lebih layak untuk mengukur tingkat prekursor produk fungsional (mRNA) sebagai ukuran tidak langsung dari tingkat ekspresi gen (Volgin, 2013).

II.2.1. Angiotensin Converting Enzyme

Angiotensinogen dipecah oleh renin untuk menghasilkan angiotensin I (Ang I), kemudian angiotensin-converting enzyme (ACE) mengubah Ang I menjadi angiotensin II (Ang II). Di ginjal, sumbu ACE-Ang II tipe 1 (AT1) (RAS klasik) meningkatkan retensi natrium dan air, stres oksidatif, vasokonstriksi, proliferasi sel, peradangan, dan fibrosis. Sintesis Ang 1-9 yang tidak aktif dari Ang I dan katabolisme Ang II untuk membentuk Ang 1-7 yang berikatan dengan

reseptor Mas (reseptor membran spesifiknya) dan melawan efek Ang adalah fungsi utama ACE2 (Mizuri & Ohashi, 2015). ACE2 sebagian besar diekspresikan di jantung, ginjal dan testis, dan pada tingkat yang lebih rendah di berbagai jaringan, terutama usus besar dan paru-paru, ACE2 diekspresikan dalam endotelium dan kardiomyosit. Di ginjal, ACE2 didistribusikan ke permukaan luminal sel epitel tubular, namun berbeda dengan ACE yang tampaknya didistribusikan secara merata antara membran apikal dan basolateral dalam sel terpolarisasi. ACE dan ACE2 memiliki fungsi yang berbeda; ACE melepaskan dipeptida C-terminal dari substratnya (dipeptidylpeptidase), sedangkan ACE2 membelah asam amino tunggal (monocarboxypeptidase). ACE2 mengkatalisis peptida, dengan preferensi substrat untuk hidrolisis antara prolin dan residu C-terminal hidrofobik atau basa. Sementara ACE mengubah Ang I menjadi vasokonstriktor kuat Ang II, membelah Ang I untuk menghasilkan peptida Ang 1-9 yang mungkin tidak aktif, yang kemudian dapat diubah menjadi peptida vasodilator Ang 1-7 oleh ACE atau peptidase lain. Intinya ACE2 secara langsung memetabolisme Ang II untuk menghasilkan Ang 1-7 dengan efisiensi yang jauh lebih tinggi daripada mengubah Ang I menjadi Ang 1-9 (Kuba dkk., 2013).

Distribusi ACE dan ACE2 terdapat pada ginjal, batas sikat apikal tubulus proksimal menunjukkan kolokalisasi ACE dan ACE2, tetapi ini tidak terjadi pada glomerulus. ACE2 diekspresikan dalam podosit dan sel mesangial glomerulus yang kurang kuat, hanya sel endotel yang ditemukan untuk mengekspresikan ACE. Dalam kondisi sehat, aktivitas ACE2 meningkat seiring dengan aktivitas ACE, tetapi ketidakseimbangan dapat berkembang dalam kondisi penyakit. Konsentrasi ACE2 yang lebih tinggi dan konsentrasi protein ACE yang lebih rendah di tubulus ginjal memiliki efek renoprotektif. Konsumsi diet tinggi garam menyebabkan rasio ACE/ACE2 glomerulus lebih tinggi, mengakibatkan kerusakan ginjal dan stres oksidatif (Mizuri & Ohashi, 2015).

II.2.2. NO

Nitric oxide diproduksi secara endogen di dalam miokardium melalui mekanisme yang bergantung pada NOS atau tidak tergantung NOS. Empat isoform NOS telah dijelaskan: neuronal NOS (nNOS), terutama terletak di miosit jantung; NOS endotel (eNOS), biasanya diekspresikan dalam endotel koroner dan jantung; inducible NOS (iNOS), yang berasal dari neutrofil atau miosit selama inflamasi; dan mitokondria NOS (mtNOS), terdapat di mitokondria jantung. NO yang dihasilkan oleh NOS yang dapat diinduksi (iNOS) mungkin berasal dari miosit atau neutrofil yang bermigrasi di sekitar miosit selama peradangan dan juga dalam fibroblas yang diaktifkan, iNOS bila diekspresikan dalam miosit jantung dapat mengatur

respons terhadap stimulasi adrenoseptor β . Peningkatan ekspresi iNOS di jantung dengan batasan substrat menyebabkan iNOS tidak berpasangan yang menghasilkan anion superoksida dan berkontribusi pada disfungsi kontraktile (Pechánová dkk., 2015).

Aktivitas NOS diatur dalam beberapa cara termasuk kompartementalisasi, kofaktor dan ketersediaan substrat, modulasi transkripsi dan translasi. Secara umum NO adalah molekul pensinyalan penting yang terlibat dalam banyak proses fisiologis pada hewan dan manusia, termasuk transmisi saraf, hipertensi, dan gagal jantung. NO juga dikenal sebagai pemicu dan mediator untuk perlindungan jantung, mengurangi nekrosis miokard dan apoptosis. Di sisi lain, dalam kondisi patofisiologis seperti iskemia, akumulasi NO dari sumber enzimatis dan non-enzimatis dapat memainkan peran penting dalam cedera iskemia-reperfusi dengan meningkatkan produksi ROS. Berdasarkan hal ini, ada peran potensial *nuclear factor-erythroid 2* (Nrf2) dan eNOS yang diaktivasi secara endogen dalam stres oksidatif yang diinduksi oleh infark miokard (Kosutova dkk., 2019).

Norepinefrin dapat memediasi vasodilatasi melalui stimulasi produksi oksida nitrat (NO) di *brown adipose tissue* (BAT), yang mengakibatkan peningkatan aliran darahnya. NO diekspresikan secara konstitutif, dan ekspresinya dapat diatur secara dinamis oleh berbagai kondisi fisiologis atau patologis. Sebaliknya, NOS yang dapat diinduksi (iNOS) terutama diatur pada tingkat transkripsi, dan sel istirahat mengekspresikan sedikit atau tidak ada iNOS. iNOS telah terbukti diekspresikan dalam *brown adipose tissue*, menunjukkan bahwa NO yang diproduksi oleh iNOS terlibat dalam pengaturan fungsi jaringan *brown adipose tissue* (BAT). Perubahan aliran darah BAT yang disebabkan oleh norepinefrin terjadi sangat cepat, NO yang diproduksi oleh iNOS mungkin tidak terlibat dalam proses ini. Sehingga aliran darah melalui BAT mungkin diatur oleh NO yang diproduksi oleh NOS konstitutif (Gao dkk., 2020)

II.2.2.1. Neuronal NOS

Neuronal NOS diekspresikan dalam neuron spesifik dari sistem saraf pusat (SSP), nNOS terlibat dalam plastisitas sinaptik (yaitu fenomena seperti potensiasi jangka panjang dan penghambatan jangka panjang). Fenomena ini terlibat dalam dalam kontrol sentral tekanan darah. Dalam sistem saraf tepi (PNS) bertindak sebagai neurotransmitter atipikal, yang memediasi komponen relaksasi dari peristaltik usus, vasodilatasi, dan ereksi penis. Setidaknya stimulasi minimal dari *guanylyl cyclase* terlarut dalam corpus cavernosum oleh nNOS yang diturunkan NO, dan pembentukan selanjutnya dari sejumlah kecil GMP siklik, merupakan prasyarat untuk efek pro-ereksi dari *phosphodiesterase 5* inhibitor sildenafil (Viagra), vardenafil (Levitra), dan tadalafil (Cialis) (Förstermann & Sessa, 2012).

II.2.2.2. Inducible NOS

Eksresi iNOS dapat diinduksi oleh sitokin dan agen lain di hampir semua jenis sel. Ini awalnya telah ditunjukkan untuk makrofag. Inducible NOS di makrofag penting untuk pengendalian bakteri intraseluler seperti *Mycobacterium tuberculosis* atau parasit *Leishmania*. Namun, NOS yang diinduksi juga diatur dalam berbagai jenis penyakit inflamasi, dan NO yang dihasilkan oleh enzim memediasi berbagai gejala peradangan. Akhirnya, NO yang diturunkan dari iNOS adalah mediator utama vasodilatasi dan penurunan tekanan darah yang terlihat pada syok septik. Kondisi ini ditandai dengan vasodilatasi masif arteriolar, hipotensi, dan kerusakan mikrovaskuler. Tingkat NO yang tinggi yang dihasilkan oleh makrofag yang diaktifkan (dan mungkin juga neutrofil dan sel lain) mungkin tidak hanya menjadi racun bagi mikroba, parasit, atau sel tumor yang tidak diinginkan, tetapi ketika dilepaskan di tempat yang salah juga dapat membahayakan kesehatan sel. Sebagian besar lesi inflamasi dan autoimun ditandai dengan banyaknya makrofag dan neutrofil yang diaktifkan. Jumlah NO yang signifikan dapat disekresikan oleh sel-sel tersebut, menyebabkan kerusakan jaringan di sekitarnya (Förstermann & Sessa, 2012).

II.2.2.3. Endotel NOS

Endotel NOS adalah vasodilator fisiologis, tetapi juga dapat menunjukkan vasoproteksi. NO yang dilepaskan ke lumen vaskular merupakan penghambat kuat dari agregasi platelet dan adhesi ke dinding pembuluh darah. Selain perlindungan dari trombosis, ini juga mencegah pelepasan faktor pertumbuhan yang diturunkan dari platelet yang merangsang proliferasi otot polos dan produksi molekul matriksnya. Endotel NOS juga mengontrol ekspresi gen yang terlibat dalam aterogenesis. NO menurunkan ekspresi protein atraktan kemo MCP-1 dan sejumlah molekul adhesi permukaan, sehingga mencegah adhesi leukosit ke endotel vaskular dan migrasi leukosit ke dinding vaskular. Hal tersebut menimbulkan perlindungan terhadap fase awal aterogenesis dan juga penurunan permeabilitas endotel, berkurangnya lipoprotein yang masuk ke dalam dinding pembuluh darah dan penghambatan oksidasi lipoprotein, densitas rendah dapat berkontribusi pada sifat anti-aterogenik dari NO yang diturunkan dari NOS endotel (Förstermann & Sessa, 2012).

Fungsi fisiologis eNOS sebagai vasodilator dan menghambat agregasi platelet, adhesi endotel NOS tampaknya menjadi pengatur homeostasis dari banyak fungsi kardiovaskular esensial. NO yang diturunkan dari NOS endotel melebarkan semua jenis pembuluh darah dengan menstimulasi *guanylyl cyclase* terlarut dan meningkatkan GMP siklik dalam sel otot polos. Penghilangan gen eNOS menyebabkan peningkatan tekanan darah. Oksida nitrat dilepaskan ke

arah lumen pembuluh darah merupakan penghambat yang kuat dari agregasi platelet dan adhesi ke dinding pembuluh darah. Selain perlindungan dari trombosis, eNOS juga mencegah pelepasan faktor pertumbuhan yang diturunkan dari platelet yang merangsang proliferasi otot halus dan produksi molekul matriks. Penghambatan adhesi leukosit dan inflamasi vaskuler endotel NO mengontrol ekspresi gen yang terlibat dalam aterogenesis. NO yang diturunkan dari endotel mencegah apoptosis sel endotel yang diinduksi oleh sitokin proinflamasi dan faktor proaterosklerotik termasuk spesies oksigen reaktif (ROS) dan angiotensin II (AT). Penekanan apoptosis juga dapat berkontribusi pada efek antiinflamasi dan anti-aterosklerotik dari NO yang diturunkan dari endothelium (Förstermann & Sessa, 2012).

II.3. Kunyit (*Curcuma longa*)

II.3.1. Morfologi

Kunyit dengan nama latin *Curcuma longa L*, merupakan anggota famili jahe (*Zingiberaceae*) dan tumbuh di iklim tropis (Kocaadam & Şanlıer, 2017). *Curcuma longa* memiliki batang pendek, daun berumbai dengan rimpang pendek dan tebal, panjang tanaman dari akar ke daun sekitar 2 meter, daun berurat dalam yang menjorok ke atas dari batang yang tumbuh dari dasar tanaman. Warna daun hijau tua dan permukaan mengkilap serta halus. Bunganya berwarna putih hingga kuning muda dan membentuk lonjakan tinggi. Rimpang berada di bawah tanah yang strukturnya seperti akar memiliki permukaan coklat dan daging bagian dalam berwarna oranye terang atau kuning dan setelah dipotong berbentuk umbi berbentuk silinder atau lonjong yang melengkung dengan panjang 2 atau 3 inci, dan diameter satu inci, runcing atau meruncing di salah satu ujungnya, kekuningan di bagian luar, dengan cincin paralel melintang di bagian dalam berwarna oranye tua atau coklat kemerahan, ditandai dengan titik-titik bersinar, padat, pendek, retak granular, membentuk bubuk kuning lemon (Kumar & Sakhya, 2013).



Gambar II.2. Tanaman Kunyit

Sumber : (Roihatul Mutiah, 2015)

Klasifikasi Biologi Kunyit (USDA, 2020)

<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae</i>
<i>Subkingdom</i>	: <i>Tracheobionta</i>
<i>Superdivisi</i>	: <i>Spermatophyta</i>
<i>Divisi</i>	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Liliopsida</i>
Subkelas	: <i>Zingiberidae</i>
Ordo	: <i>Zingiberales</i>
<i>Family</i>	: <i>Zingiberaceae</i>
Genus	: <i>Curcuma L.</i>
Spesies	: <i>Curcuma longa L.</i>

II.3.2. Khasiat

Kunyit adalah bahan yang populer di negara Asia biasanya digunakan untuk menambah warna kuning, baik sebagai penyedap rasa maupun sebagai pengawet, selain itu digunakan juga sebagai obat herbal untuk mengatasi berbagai penyakit. Kunyit memiliki sifat anti-inflamasi yang sangat baik, selain penggunaan kurkumin sebagai anti radang, kunyit juga telah digunakan untuk mengobati penyakit gastrointestinal (GI) seperti gangguan pencernaan, perut kembung, diare, dan bahkan tukak lambung dan duodenum. Pengobatan dengan kurkumin juga mengarah pada perbaikan parameter metabolik yang melibatkan penyakit terkait penuaan

seperti aterosklerosis, diabetes, penyakit kardiovaskular, dan penyakit ginjal kronis (Kwiecien dkk., 2019). Berdasarkan studi menggunakan model hewan, dan tinjauan data klinis, kurkumin mungkin memiliki potensi sebagai agen terapeutik pada penyakit seperti rheumatoid arthritis, penyakit radang usus, pankreatitis, dan uveitis anterior kronis serta beberapa jenis kanker. Selain itu, bahan aktif kunyit memiliki sifat pelindung saraf, anti tumor, anti asidogenik, dan antiinflamasi yang sangat baik. Oleh karena itu kurkumin memiliki potensi terapeutik dalam mengobati berbagai penyakit kronis yang mengandung unsur peradangan, termasuk kanker usus besar, kanker paru-paru, kanker payudara, dan penyakit radang usus (Dasgupta, 2018). Efek farmakologis dari kunyit telah terbukti menunjukkan sifat antioksidan, analgesik, antibakteri, antijamur, antivirus, antiparasitik, antiinflamasi, dan pelindung pencernaan (Belwal dkk., 2018)

II.3.3. Kandungan

Senyawa bioaktif adalah unsur alami dari bahan tumbuhan yang meningkatkan kesehatan yang berkontribusi pada fungsi dalam tumbuhan itu sendiri dan bertindak dalam pencegahan dan/atau pemberantasan penyakit. Senyawa fenol seperti flavonoid, antosianin dan tanin, asam organik, dan vitamin dianggap sebagai senyawa bioaktif utama (Braga dkk., 2018). Konstituen aktif kunyit terdiri dari kurkumin flavonoid (diferuloylmethane) dan berbagai minyak atsiri, termasuk tumerone, atlantone, dan zingiberone (Akram dkk., 2010). Kurkumin terdiri dari beberapa komponen yaitu kurkuminoid yang terdiri dari tiga kelompok yaitu 76,9% kurkumin, 17,6% demethoxycurcumin, dan 5,5% bis demethoxycurcumin. Selain itu, mengandung minyak atsiri (turmerone, atlantone, dan zingiberone), gula, protein, dan resin. Kurkumin sulit larut dalam air karena merupakan polifenol lipofilik dan cukup konstan dalam pH asam lambung (Belwal dkk., 2018). Curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione), juga disebut diferuloylmethane, adalah polifenol alami utama yang ditemukan pada rimpang *C. longa* (kunyit) dan di tempat lain *Curcuma spp.* Komposisi kimiawi kunyit terdiri dari protein (6,3%), lemak (5,1%), mineral (3,5%), dan karbohidrat (69,4 %). Mengandung minyak atsiri (5,8%) yang diperoleh dengan destilasi uap rimpang memiliki a-phellandrene (1%), sabinene (0,6%), cineol (1%), borneol (0,5%), zingiberene (25%), dan sesquiterpen (53 %) (Kanase & Khan, 2018).

II.4. Pegagan

Centella asiatica (L.) Urban (*Syn. Centella coriacea* Nann fd., *Hydrocotyle asiatica* L., *Hydrocotyle lunata* Lam., dan *Trisanthus cochinchinensis* Lour.) merupakan tanaman obat tropis dari famili *Apiaceae* yang berasal dari negara-negara Asia Tenggara seperti India, Sri

Lanka, Cina, Indonesia, dan Malaysia serta Afrika Selatan dan Madagaskar. *C. asiatica*, umumnya dikenal sebagai “Gotu kola (India), bua bok (Thailand), *Asiatic pennywort*, *Indian pennywort*, *Indian water navelwort*, *wild violet*, dan *tiger herb* (dalam bahasa Inggris)” merupakan tumbuhan yang telah berhasil dibudidayakan karena kepentingan medisnya di beberapa negara termasuk Turki, dan telah lama digunakan dalam pengobatan ayurveda dan tradisional Cina sejak berabad-abad (Orhan, 2012).

II.4.1. Morfologi

Daun berwarna hijau kekuningan, tipis, berseling dengan tangkai daun yang panjang, dan berbentuk reniform, orbicular, atau lonjong-elips dengan tujuh urat. Tanaman ini tumbuh secara horizontal melalui stolon hijau ke merah yang bergabung satu sama lain dan berakar di bawah tanah (Orhan, 2012).



Gambar II.3. Tanaman Pegagan

Sumber : (Belwal dkk., 2018)

Klasifikasi Biologi Pegagan (*Centella asiatica*) (Delbo & Calapai, 2010):

- Kingdom* : Eukaryota
- Subkingdom* : Embryophyta
- Divisi* : Spermatophyta
- Subdivisi* : Angiospermae
- Kelas* : Dicotyledoneae
- Subkelas* : Rosidae
- Superorder* : Aralianae
- Order* : Araliaceae (Umbelliferae)
- Family* : Apiaceae atau Umbelliferae

Subfamily : *Hydrocotyle*
Genus : *Centella*
Species : *Centella asiatica*

II.4.2. Khasiat

Ekstrak pegagan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat seperti yang ditunjukkan oleh berbagai pengujian. *Centella asiatica* mengandung kandungan total fenolik yang tinggi yang disumbangkan oleh flavonoid seperti quercetin, kaempferol, catechin, rutin, apigenin dan naringin dan dikatakan memiliki efek langsung dalam menurunkan tekanan darah dan sering disebut sebagai obat peremajaan di Farmakope Ayurveda (Cristovao dkk., 2012). Beberapa penelitian telah menunjukkan berbagai efek biologis dari asam asiatik seperti aktivitas antioksidan, antidiabetes, antihiperlipidemia dan hepatoprotektor. Asam asiatik dapat mencegah kematian sel yang diinduksi β dengan mengurangi konsentrasi radikal bebas intraseluler yang diinduksi H_2O_2 . Asam asiatik dapat mengurangi tekanan darah dan mengurangi stres oksidatif dengan memulihkan subunit eNOS dan NADPH oksidase. Kemudian akan meningkatkan ketersediaan hayati NO pada tikus hipertensi (Bunbupha dkk., 2015). Selain itu telah dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis yang diinginkan untuk kesehatan manusia seperti penyembuhan luka, anti-inflamasi, antipsoriasis, antiulcer, hepatoprotektif, antikonvulsan, obat penenang, imunostimulan, kardioprotektif, antidiabetik, sitotoksik dan antitumor, antivirus, antibakteri, insektisida, antijamur, antioksidan, dan untuk lepra serta pengobatan defisiensi vena (Orhan, 2012).

II.4.3. Kandungan

Kandungan fitokimia *C. asiatica* adalah golongan triterpen saponosida. Senyawa utamanya dikenal sebagai asam asiatik, asam madekasik (asam 6-hidroksi-asiatik), asiaticosida, madekasosida, dan asam madasiatik, asam betulinat, asam terimaunat, dan asam isothankunik. Namun yang berperan penting adalah asam asiatik. Selain itu, ada beberapa triterpen lain seperti asam brahmik, centellin, centellicin, asiaticin, bayogenin, asam terminolik, 3β , 6β , 23-trihydroxyolean-12-en-28-oic acid, 3β , 6β , 23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid, 3-O- [α -L-arabinofuranosyl] 2α , 3β , 6β , 23-atetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid, centellasapogenol A, centellasaponins AD, ursolic acid, pomolic acid, 3-epimas-linic acid, 23-O-acetylmadecassoside, dan 23-O-acetylasiatikoside B. Adanya beberapa turunan flavonoid seperti quercetin, kaempferol, patuletin, rutin, apigenin, castilliferol, castillicetin, dan myricetin (Cristovao dkk., 2012).

II.5. Nori

Nori merupakan produk yang berasal dari alga kering yang dikonsumsi setelah dikeringkan dan dipanggang biasanya untuk makanan tradisional (Kuda dkk., 2005). Nori adalah suatu olahan berupa lembaran tipis yang dibuat dari rumput laut yang dikeringkan atau dipanggang (Teddy, 2009). Nori merupakan makanan tradisional Jepang berbentuk lembaran yang dibuat dengan cara menghaluskan, memberi bumbu dan mengeringkan rumput laut jenis *Porphyra* (Valentine dkk., 2020). Nori adalah suatu sediaan berupa lembaran tipis dari rumput laut yang diolah dengan pengeringan, biasanya terbuat dari alga merah jenis *Porphyra* (Lalopua, 2017). *Porphyra* memiliki berbagai sebutan seperti *purple laver* (di Inggris, AS, dan Kanada), karengo (di Selandia Baru), nori (di Jepang), kim (di Korea), dan zicai (di China).

Alga merah atau *Porphyra sp.* adalah salah satu jenis tanaman laut yang paling banyak tersedia serta dipasarkan dan dikenal sebagai sayuran laut. Alga merah memiliki pigmen *phycoerythrin* yang membuat alga memantulkan warna merah selain itu mengandung pula pigmen klorofil. Tanaman ini dapat melakukan fotosintesis dan dapat hidup di kedalaman yang lebih dalam daripada jenis alga lainnya. Negara Jepang, Korea, dan Cina merupakan Negara yang banyak membudidayakan alga merah. *Porphyra sp.* (nori) mengandung banyak nutrisi termasuk vitamin B12 dan senyawa bioaktif. B12 adalah satu-satunya vitamin yang tidak ada pada sumber makanan nabati. (Kuda dkk., 2005). Di Indonesia ketersediaan *Porphyra* dalam jumlah sedikit karena tidak cocok hidup di iklim tropis, melainkan lebih sesuai hidup pada iklim sub tropis. Indonesia memiliki variasi jenis rumput laut, namun belum dimanfaatkan secara optimal, saat ini budidaya hanya terbatas pada jenis dari genus *Eucheuma* dan *Gracilaria*. (Lalopua, 2017). Kandungan kimia rumput laut terdiri dari protein 5,91%; lemak 0,28%; karbohidrat 63,84%; serat pangan total 78,94% dan iodium 282,93%, karena kandungan iodium dan serat yang tinggi dalam rumput laut maka konsumsi makanan yang berasal dari rumput laut dapat mencegah gangguan akibat kekurangan yodium serta penyakit degeneratif akibat kekurangan serat (Astawan dkk., 2004).

II.5.1. Nori Artifisial

Nori artifisial merupakan nori tiruan dengan bahan penyusun bukan dari rumput laut jenis *Porphyra* namun dengan rumput laut jenis lain atau mengandung bahan tambahan lain. Nori artifisial perlu dikembangkan karena di Indonesia ketersediaan bahan baku pembuatan nori yaitu *Porphyra* sangat terbatas sehingga digunakan jenis rumput laut lain seperti *Eucheuma* dan *Gracilaria* untuk membuat nori. Nori artifisial membutuhkan penambahan bahan lain untuk meningkatkan kualitas nori agar seperti nori yang dibuat dari *Porphyra*.

II.5.2. Komposisi Nori Artifisial

a. Rumput Laut

- *Eucheuma cottonii* merupakan rumput laut coklat yang mengandung karagenan dengan pigmen utama *phycoerythrin*, pigmen *phycoerythrin* tidak stabil terhadap cahaya namun stabil pada pH 4 - pH 10 dan suhu hingga 40°C (Sajida, 2016).

b. Bahan Aktif

- Rimpang kunyit
- Daun pegagan

c. Bahan tambahan

- Gliserol

Gliserol adalah senyawa alkohol polihidrat dan mempunyai sifat mudah larut dalam air (hidrofilik), dapat meningkatkan viskositas larutan, mengikat air. Gliserol memiliki berat molekul kecil sehingga mampu menurunkan gaya intermolekuler sepanjang 5 rantai polimernya, menyebabkan film dari pati akan lentur dan mudah ketika dibengkokkan (Lismawati, 2017).

II.6. PCR

II.6.1. Deskripsi

PCR adalah teknik amplifikasi yang dapat menghasilkan pasokan yang cukup dari segmen DNA tertentu (yaitu, ampikon) berasal dari sedikit bahan awal (yaitu, cetakan DNA atau urutan target). Meskipun mudah dan umumnya bebas masalah, terdapat hambatan yang mempersulit reaksi sehingga dapat menghasilkan hasil palsu. Jika PCR gagal, hal itu dapat menyebabkan banyak produk DNA non-spesifik dengan berbagai ukuran yang muncul sebagai noda pita pada gel agarosa. Terkadang tidak ada produk noda pita sama sekali. Masalah potensial lainnya terjadi ketika mutasi secara tidak sengaja dimasukkan ke dalam ampikon, menghasilkan populasi produk PCR yang heterogen (Lorenz, 2012). PCR menyerupai bentuk replikasi DNA in vitro dan elementer, proses fisiologis yang digunakan oleh semua sel hidup untuk menduplikasi materi genetik mereka sebelum pembelahan sel. Ini melibatkan siklus berulang pemanasan dan pendinginan campuran reaksi yang mengandung cetakan DNA, DNA polimerase, primer, dan nukleotida (Jalali dkk., 2017).

Template DNA adalah DNA yang mengandung urutan target. Primer adalah rantai pendek nukleotida yang menemukan DNA target spesifik yang diinginkan dan mengikatnya setelah pendinginan, melalui pasangan basa komplementer. Template DNA primer bertindak sebagai titik awal DNA polimerase untuk membuat untai komplementer baru. DNA polimerase adalah

enzim yang mensintesis untaian baru pelengkap DNA ke urutan target. Setiap siklus PCR terdiri dari tiga tahap yaitu (Jalali dkk., 2017):

- a. Denaturasi: campuran reaksi yang dipanaskan hingga lebih dari 90°C untuk melepaskan heliks ganda DNA dengan memecah ikatan hidrogen
- b. Annealing primer: campuran reaksi didinginkan hingga 45–65°C untuk memungkinkan annealing primer. Primer maju dan mundur berhibridisasi melalui pasangan basa komplementer ke untaian DNA yang berlawanan. Mereka harus melengkapi ujung 3' dari untai antiparalel DNA template
- c. Ekstensi: campuran reaksi dipanaskan hingga 72°C menuju suhu optimal untuk aktivitas enzim DNA polimerase. Polimerase mengikat kompleks hibrida templat-primer dan kemudian menyusun untai komplementer baru menggunakan nukleotida bebas dalam campuran reaksi.

Setelah tahap ekstensi, reaksi akan kembali ke tahap denaturasi dan PCR berlanjut. Setiap siklus kira-kira menggandakan jumlah DNA, sebagai untai DNA baru kemudian bertindak sebagai cetakan untuk replikasi dalam siklus berikutnya. Ini menghasilkan peningkatan eksponensial dalam kuantitas DNA. Misalnya, setelah 6 siklus ada 26 eksemplar. Sebanyak 25–40 siklus PCR dilakukan tergantung pada hasil yang diharapkan dari produk PCR (Jalali dkk., 2017).

II.6.2. Analisis Produk PCR

Produk PCR atau "amplikon" dapat divisualisasikan dan dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa, yang memisahkan produk DNA berdasarkan ukuran dan muatan, qPCR tidak memerlukan analisis post amplifikasi seperti itu dan sebagai gantinya produk dianalisis di seluruh reaksi secara "waktu nyata". Elektroforesis gel melibatkan pemisahan molekul bermuatan dalam medan listrik pada gel agarosa, diikuti dengan pewarnaan dengan etidium bromida. Produk sampingan PCR seperti dimer primer muncul sebagai pita noda yang menyebar di dekat bagian bawah gel. Cara lain untuk memvalidasi reaksi PCR adalah dengan langsung mengurutkan amplikon (Jalali dkk., 2017).

II.6.3. Variasi Metode PCR

Reverse Transcription PCR

Reverse transcription (RT)-PCR digunakan untuk memperkuat target RNA. Template RNA diubah menjadi DNA komplementer (cDNA) oleh enzim reverse transcriptase, cDNA nantinya berfungsi sebagai template untuk amplifikasi eksponensial menggunakan PCR. RT-PCR dapat dilakukan dalam satu atau dua langkah. RT-PCR satu langkah menggabungkan reaksi RT dan

reaksi PCR dalam tabung yang sama. Hanya urutan primer khusus yang dapat digunakan. Selama dua langkah RT-PCR, cDNA yang disintesis dipindahkan ke tabung kedua untuk PCR. Oligo (dT), hexamer acak atau gen primer spesifik dapat digunakan. Primer oligo (dT) umumnya lebih disukai karena mereka berhibridisasi dengan ekor 3' poli (A) di mRNA (urutan gen yang ditranskripsi), sedangkan primer acak mendahului apapun termasuk RNA ribosom. Ada keuntungan dan kerugian dari kedua metode tersebut. Reaksi satu langkah lebih mudah diatur dan ideal untuk hasil penyaringan tinggi. Reaksi dua langkah ideal untuk mendeteksi beberapa pesan dari sampel RNA tunggal (Jalali dkk., 2017).

Quantitative PCR

Metode qPCR memungkinkan deteksi dan kuantifikasi DNA target. Berbagai kimia fluoresensi berkorelasi terhadap konsentrasi produk PCR dengan intensitas fluoresensi. Pewarna pengikat DNA fluoresen yang paling umum digunakan adalah SYBR Green I. Pewarna ini memancarkan fluoresensi saat terikat pada DNA beruntai ganda dan intensitas fluoresensi meningkat secara proporsional dengan konsentrasi produk PCR. Selain itu, “kurva leleh” diperlukan saat menggunakan metode berbasis pewarna untuk memvalidasi hasil dan memastikan produk yang spesifik. Pada akhir proses PCR, campuran reaksi terkena gradien suhu dari sekitar 60 °C hingga 95 °C dan pembacaan fluoresensi terus menerus dikumpulkan. Pada suhu tertentu, produk yang diperkuat akan sepenuhnya terpisah. Hal ini mengakibatkan penurunan yang cepat dalam emisi fluoresensi, karena SYBR Green I terdisosiasi (Jalali dkk., 2017).

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium hewan dan laboratorium instrument Universitas Bhakti Kencana pada bulan Maret hingga Mei tahun 2021

B. Subyek Penelitian

Tikus Wistar jantan (umur 3 bulan atau lebih) dengan bobot 200-300 gram sebanyak 25 ekor tikus yang dibagi kedalam 5 kelompok. Tikus diperoleh dari penyedia hewan *D'Wistar*.

C. Metode Pengumpulan Data

Uji aktivitas antihipertensi dari sediaan nori yang mengandung kombinasi kunyit (*Curcuma longa*) dan pegagan (*Centella asiatica*) dilakukan secara *in vivo* untuk pengukuran parameter non invasif dan secara *in vitro* untuk melihat ekspresi gen eNOS, iNOS dan ACE serta pengukuran kadar NO. Pengukuran tekanan darah sistolik dan diastolik dilakukan dengan menggunakan alat CODA dan pengukuran PWV serta sudut spasial dengan menggunakan alat EKG. Penelitian dilakukan dengan menggunakan tikus Wistar jantan (200-300 g) yang berumur 3-4 bulan. Tikus dibagi menjadi lima kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus, yaitu kelompok kontrol negatif (Na CMC 0,5%), kelompok kontrol positif (L-NAME 40 mg/kgBB), kelompok suplemen (Nori 5%), kelompok uji diberi nori 5% dan induksi dengan L-NAME 40 mg/kgBB (Arredondo-Mendoza dkk., 2020), serta kelompok pembanding diobati dengan penghambat enzim pengubah angiotensin yaitu kaptopril 2,5 mg/kgBB/hari (Hasimun, Sulaeman, dkk., 2020) dan L-NAME. Pengukuran parameter non invasive dilakukan pada hari ke 0, 14 dan 28. Pada akhir penelitian dilakukan pengambilan darah melalui sinus orbital mata pada semua tikus untuk pengukuran kadar NO dengan menggunakan reagen griess, selanjutnya tikus dibedah untuk isolasi organ aorta untuk penentuan ekspresi gen eNOS dan iNOS serta organ ginjal untuk penentuan ekspresi gen ACE menggunakan metode semikuantitatif PCR basis gel.

D. Analisis Data

Data yang telah didapatkan diuji normalitas dengan *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas variasi kemudian diolah dengan menggunakan analisis statistik One Way ANOVA dengan *post hoc test Least Significance Different* (LSD) signifikansi sebesar $p < 0,05$.