

**EFEK ANTIHIPERTENSI DAN MODULASI GEN iNOS eNOS EKSTRAK
ETANOL RIMPANG KUNYIT (*Curcuma longa Linn*) DAN
KOMBINASINYA DENGAN DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) PADA
MODEL HEWAN HIPERTENSI**

Laporan Tugas Akhir

**Nenden Jesie Jayanti
11171158**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2021**

ABSTRAK

EFEK ANTIHIPERTENSI DAN MODULASI GEN iNOS eNOS EKSTRAK ETANOL RIMPANG KUNYIT (*Curcuma longa Linn*) DAN KOMBINASINYA DENGAN DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) PADA MODEL HEWAN HIPERTENSI

Latar Belakang dan Tujuan : Hipertensi merupakan faktor risiko utama yang dapat dimodifikasi untuk gagal ginjal, penyakit kardiovaskular, stroke dan kelainan multifaktorial yang terkait dengan peningkatan ekspresi dan aktivitas *nitric oxide synthase (NOS)*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh ekstrak rimpang kunyit dosis tunggal 50mg/kgBB, 100mg/kgBB dan kombinasinya dengan daun pegagan (50+50mg/kgBB) terhadap ekspresi gen *iNOS eNOS* dan efektivitasnya sebagai antihipertensi pada model hewan hipertensi yang diinduksi Fruktosa 20% dan NaCl 4%. **Bahan dan Metode :** Penelitian ini dilakukan pada tikus putih jantan galur wistar dan dilakukan pengujian aktivitas antihipertensi dengan parameter uji yang dilakukan yaitu pengukuran TDS, TDD dan MAP menggunakan alat *CODA Non Invasive*. Dan pengukuran kekakuan arteri dengan parameter HR, PWV dan sudut spasial Q-RST menggunakan alat *Pulse Wave Velocity*. Analisis ekspresi gen *iNOS* dan *eNOS* yang berhubungan erat dengan patogenesis hipertensi dilakukan menggunakan metode PCR. **Hasil :** Ekstrak etanol rimpang kunyit dan kombinasinya dengan daun pegagan menunjukkan aktivitasnya sebagai antihipertensi dan mempertahankan produksi NO di sel endotel. **Kesimpulan :** Ekstrak etanol rimpang kunyit 50mg/kgBB, 100mg/kgBB dan kombinasinya dengan pegagan (50+50mg/kgBB) memiliki aktivitas antihipertensi.

Kunci : Antihipertensi, Tekanan Darah, Kekakuan Arteri, iNOS eNOS, *Curcuma longa L*, *Centella asiatica*

Oleh :
Nenden Jesie Jayanti
11171158

ABSTRACT

ANTIHYPERTENSION EFFECT AND *i*NOS *e*NOS GEN MODULATION ETHANOL EXTRACT OF TURMERIC RHIZOME (*Curcuma longa* Linn) AND THE COMBINATION WITH GOTU KOLA LEAVES (*Centella asiatica*) ON ANIMAL MODEL OF HYPERTENSION

Background and Purpose: Hypertension is a major modifiable risk factor for renal failure, cardiovascular disease, stroke and multifactorial disorders associated with increased nitric oxide synthase (NOS) expression and activity. The purpose of this study was to determine the effect of turmeric rhizome extract 50mg/kgBB, 100 mg/kgBB and their combination with gotu kola leaves (50+50mg/kgBB) on the expression of the *i*NOS *e*NOS gene and its activities as antihypertensive in animal models of hypertension induced by 20% Fructose and 4% NaCl. **Materials and Methods :** This research was conducted on male white rats of the wistar strain and tested for antihypertensive activity with the test parameters carried out namely SBP, DBP and MAP using tools CODA Non Invasive. And measurement of arterial stiffness with parameters HR, PWV, and the spatial angle Q-RST using tools Pulse Wave Velocity. Analysis of *i*NOS and *e*NOS gene expression closely related to the pathogenesis of hypertension carried out using the PCR method. **Result :** Ethanol extract of turmeric rhizome and its combination with gotu kola leaves demonstrated its activity as antihypertensive and maintain NO production in endothelial cells. **Conclusion :** Ethanol extract of turmeric rhizome 50mg/kgBB, 100mg/kgBB and their combination with gotu kola (50:50mg/kgBB) has antihypertensive activity.

Keywords: Antihypertensive, Blood Pressure, Arterial Stiffness, *i*NOS *e*NOS, *Curcuma longa* L, *Centella asiatica*

By:
Nenden Jesie Jayanti
11171158

**EFEK ANTIHIPERTENSI DAN MODULASI GEN iNOS eNOS EKSTRAK
ETANOL RIMPANG KUNYIT (*Curcuma longa* Linn) DAN KOMBINASINYA
DENGAN DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) PADA MODEL HEWAN
HIPERTENSI**

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan Sarjana Farmasi

**Nenden Jesie Jayanti
11171158**

Bandung, Juli 2021

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



(Dr. apt. PATONAH, M.Si.)

NIDN. 0402087302

Pembimbing Serta,



(SONI MUHSININ, M.Si.)

NIDN. 0402068407

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahrabbi'alamiin, dengan menyebut nama Allah yang maha pengasih lagi maha penyayang, penulis panjatkan puji dan syukur kehadirat Allah SWT. Karena berkat rahmat dan hidayah-Nya penulis mampu menyusun laporan tugas akhir dengan judul “**Efek Antihipertensi dan Modulasi Gen iNOS eNOS Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit (*Curcuma longa* Linn) dan Kombinasinya dengan Daun Pegagan (*Centella asiatica*) pada Model Hewan Hipertensi**” sebagai salah satu syarat untuk mengikuti sidang tugas akhir. Tak lupa shalawat dan salam semoga tetap terlimpah curahkan kepada Nabi besar Muhammad SAW

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi masih banyak kekurangan dan tidak lepas dari adanya kerjasama dan bantuan dari berbagai pihak untuk menyelesaikan tugas akhir ini. Maka dengan segala kerendahan hati izinkanlah penulis untuk menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Allah SWT, karena atas ridho dan rahmat-Nya peneliti diberikan kesehatan, rezeki dan kesempatan baik untuk menyelesaikan penelitian tugas akhir
2. Kedua orang tua tercinta Ayah dan Bunda serta adikku tersayang Ayu Wandari, Adzkira Alsha Meyzea dan semua keluarga yang turut mendo'akan dan memberikan dukungan baik moril maupun materil
3. Ibu Dr. Apt. Patonah, M.Si. selaku pembimbing utama yang ikhlas menyempatkan waktu untuk membimbing dan memberi arahan untuk menyelesaikan laporan tugas akhir ini
4. Bapak Bapak Soni Muhsinin, M.Si sebagai pembimbing serta yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama proses penelitian
5. Semua karyawan dan staff laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana yang sangat banyak membantu demi kelancaran penelitian ini
6. Tim penelitianku Nurlisa Amelia
7. Teman-teman rubi farmakologi yang sudah berkerja sama
8. Teman-teman Explosive angkatan 2017
9. Sahabat-sahabat yang selalu memberi semangat dan dukungan
10. Semua pihak yang ikut membantu dalam proses penelitian yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu

Semoga laporan tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi penulis dan semua pihak yang membaca sehingga menjadikannya sebagai ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan

Penulis

Nenden Jesie Jayanti

DAFTAR ISI

Contents	
ABSTRAK	2
ABSTRACT	3
KATA PENGANTAR	5
DAFTAR ISI	6
DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI	9
DAFTAR TABEL	10
DAFTAR LAMPIRAN	11
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	12
BAB I. PENDAHULUAN	15
1.1 Latar belakang.....	15
1.2 . Rumusan masalah	16
1.3. Tujuan dan manfaat penelitian.....	16
1.4. Hipotesis penelitian	16
1.5. Tempat dan waktu Penelitian	16
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	17
II.1 Hipertensi.....	17
II.1.1 Definisi dan Klasifikasi Hipertensi	17
II.1.2 Prevalensi Hipertensi di Indonesia.....	17
II.1.3 Patogenesis Kekakuan Arteri pada Hipertensi.....	17
II.2 Ekspresi Gen.....	18
II.3 Gen Regulasi Tekanan Darah	18
II.4 Tanaman Kunyit (<i>Curcuma longa</i> Linn).....	18
II.4.1 Morfologi dan Taksonomi Kunyit.....	19
II.4.2 Kandungan Senyawa Kunyit.....	20
II.4.3 Efek Farmakologi Kunyit.....	21
II.5 Tanaman Pegagan.....	23
II.5.1 Morfologi dan Taksonomi Pegagan	23
II.5.2 Kandungan Senyawa Pegagan	24
II.5.3 Efek Farmakologi Pegagan	24
II.6 Pengukuran Kekakuan Arteri Non Invasif	25
II.6.1 Alat mengukur PWV	25
II.6.2 Pengukuran PWV Non Invasif	25
II.7 Pengukuran Tekanan Darah.....	27

II.8 Metode Analisis Molekular.....	27
II.8.1 Definisi PCR (Polymerase Chain Reaction).....	27
II.8.2 Siklus PCR.....	28
II.8.3 Reverse transcriptase (RT) PCR.....	28
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN.....	30
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN.....	31
IV.1 Pengumpulan alat dan bahan.....	31
IV.1.1 Alat.....	31
IV.1.2 Bahan.....	31
IV.2 Pengumpulan Bahan dan Determinasi Tanaman.....	31
IV.3 Karakterisasi Ekstrak.....	31
IV.3.1 Penetapan Kadar Flavonoid.....	31
IV.3.2 Penetapan Kadar Kurkumin.....	32
IV.3.3 Penetapan Kadar Asiatikosida.....	33
IV.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan.....	33
IV.4 Pemilihan dan Penyiapan Hewan Uji.....	34
IV.5 Aklimatisasi Hewan Uji.....	35
IV.6 Tekanan Darah, Denyut Jantung dan PWV.....	35
.....	35
.....	35
IV.7 Pengukuran Kadar Nitrit Oksida (NO).....	36
IV.7.1 Pembuatan Larutan Pereaksi Griess.....	36
IV.7.2 Pembuatan Larutan Baku Natrium Nitrit (NaNO ₂).....	36
IV.7.3 Pembuatan Seri Konsentrasi Natrium Nitrit (NaNO ₂).....	36
IV.7.4 Pembuatan Kurva Baku.....	36
IV.7.5 Penyiapan Serum.....	36
IV.7.6 Penentuan Kadar NO Serum.....	37
IV.8 Analisis Molekular Gen iNOS eNOS.....	37
IV.8.1 Persiapan Organ (sampel).....	37
IV.8.2 Isolasi RNA dan Purifikasi (Protokol promega).....	37
IV.8.3 Sintesis cDNA (Reverse Transcriptase).....	39
IV.8.4 Karakterisasi PCR dengan elektroforesis.....	40
IV.9 Analisis Semi Kuantitatif Hasil PCR.....	41
IV.10 Analisis Data.....	41
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	42
V.1 Identifikasi Tanaman.....	42

V.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Rimpang Kunyit dan Daun Pegagan	42
V.3 Karakterisasi Kuantitatif Ekstrak Rimpang Kunyit dan Daun Pegagan.....	42
V.4 Pengujian Aktivitas Hipertensi.....	43
V.4.1 Pengukuran Tekanan Darah.....	44
V.4.2 Pengukuran Kekakuan Arteri	53
V.5 Pengukuran Kadar Nitrit Oksida (NO) Serum	60
V.6 Pengukuran Ekspresi Gen iNOS eNOS	62
V.7 Pengukuran Kenaikan BB Tikus Selama 28 Hari.....	65
VI.1 Kesimpulan.....	68
VI.2 Saran	68
LAMPIRAN	76

DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI

Gambar II 1 Daun Pegagan.....	19
Gambar II 2 Buah Kunyit	19
Gambar II 3 Biji Kunyit.....	20
Gambar II 4 Bunga kunyit	20
Gambar II 5 Daun Pegagan.....	23
Gambar II 6 Alat PWV	25
Gambar II 7 Sistem pengukuran PWV pembuluh aorta pada hewan tikus. PWV dihitung dengan membagi jarak (L) dengan waktu propagasi (PTT)	26
Gambar IV 1 Proses Isolasi RNA dan Purifikasi.....	37
Gambar V 1 Grafik Hasil Pengukuran Ekspresi Gen eNOS Ginjal yang diukur pada t28	63
Gambar V 2 Grafik Hasil Pengukuran Ekspresi Gen iNOS Ginjal yang diukur pada t28.....	64

DAFTAR TABEL

Tabel IV 1 Kelompok hewan uji.....	34
Tabel V 1 Hasil skrining fitokimia Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit dan Daun Pegagan	42
Tabel V 2 Hasil pengujian kuantitatif ekstrak rimpang kunyit dan daun pegagan	42
Tabel V 3 Hasil pengukuran tekanan darah sistolik (TDS)	44
Tabel V 4 Hasil pengukuran tekanan darah diastolic (TDD).....	46
Tabel V 5 Hasil pengukuran tekanan arteri rata-rata (MAP).....	49
Tabel V 6 Hasil pengukuran denyut jantung (HR)	53
Tabel V 7 Hasil pengukuran Pulse Wave Velocity (PWV)	56
Tabel V 8 Hasil pengukuran Sudut Spasial QRST	58
Tabel V 9 Hasil pengukuran Nitrit Oksida (NO).....	61
Tabel V 10 Hasil pengukuran kenaikan BB tikus selama 28 hari.....	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Perhitungan Dosis Hewan Percobaan.....	76
Lampiran 2 Persetujuan Etik Penelitian.....	78
Lampiran 3 Hasil Skrining Fitokimia	79
Lampiran 4 Analisis Data TDS, TDD, MAP, HR, PWV,Sudut Spasial QRST.....	81
Lampiran 5 Analisis Data NO Serum	82
Lampiran 6 Analisis Data Ekspresi Gen iNOS eNOS	83
Lampiran 7 Perlakuan Hewan Uji.....	83
Lampiran 8 Pengujian Antihipertensi	84
Lampiran 9 Pengujian Ekspresi Gen iNOS eNOS.....	84
Lampiran 10 Hasil Blast Primer iNOS eNOS.....	86

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	NAMA
NOS	Nitric Oxide Synthase
RAAs	Renin Angiotensin Aldosterone
RAS	Renin Angiotensin
NO	Nitrit Oksida
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
Enos	Endothelial Nitric Oxide Synthase
NaCl	Natrium Klorida
mmHg	Milimeter Merkuri Hydrargyrum
SBP	Systolic Blood Pressure
DBP	Diasctolic Blood Pressure
MAP	Mean Arterial Pressure
VPR	Volume Pressure Recording
HR	Heart Rate
PWV	Pulse Wave Velocity
EKG	Elektrokardiogram
PPG	Photoplethysmogram
ADC	Analog to Digital Converter
PAT	Pulse Arrival Time
PEP	Periode Pra-Ejeksi
ICG	Impedance Cardiography
PTT	Pulse Transit Time
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACEI	Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor
DRI	Direct Renin Inhibitor
AGT	Angiotensinogen
PRR	Pro Reseptor Renin
ARB	Angiotensin Receptor Blocker
COX-2	Cyclooxygenase-2
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1

MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
ATCC	American Type Culture Collection
IMPDH	Inosine'-Monophosphate Dehydrogenase
A549	Adenocarcinoma-549
GABA	Gamma Aminobutyric Acid
RNA	Ribonukleat Acid
snRNA	Small-nuclear Ribonukleat Acid
rRNA	Ribosomal Ribonukleat Acid
tRNA	Transfer Ribonukleat Acid
NF-kB	Nuclear Faktor-kappaB
HR	Hipoksia Reoksigenasi
DNA	Deoxyribonucleat Acid
cDNA	Complementary Deoxyribonucleat Acid
ITB	Institut Teknologi Bandung
CMC	Carboxymethyl Cellulose
KLT	Kromatografi Lapis Tips
TPTZ	2,4,6-tripyridil-striazine
HCl	Hydrochloric Acid
FeCl ₃ . 6H ₂ O	Ferric Chloride
FeSO ₄ .7H ₂ O	Ferrosulfat Heptahidrat
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
UV-Vis	Ultra Violet-Visible
NaNO ₂	Natrium Nitrit
CO	Karbon Monoksida
ZnSO ₄	Zinc Sulfate
TAE	Tris-acetate EDTA
AUC	Area Under the Curve
ROS	Reactive Oxygen Spesies
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
FHI	Farmakope Herbal Indonesia
JNC 8	Eight Joint National Committee
THC	Tetrahydrocurcumin
2K-1C	2 Kidney One Clip

MS	Metabolik Sekunder
TNF α	Tumor Necrosis Faktor- α
MCP-1	Monosit Chemoattractant Protein-1
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor tipe-1

BAB I. PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang

Hipertensi merupakan faktor yang menjadi risiko utama dan dapat dimodifikasi untuk gagal ginjal, penyakit kardiovaskular, dan stroke (Montezano and Touyz, 2012). Hipertensi adalah kelainan multifaktorial yang terkait dengan peningkatan ekspresi dan aktivitas nitric oxide synthase (NOS) yang dapat diinduksi. Hal ini yang mempengaruhi sekitar 1 miliar subjek, dan bertanggung jawab atas lebih dari 7 juta kematian per tahun di seluruh dunia. (Oliveira-Paula et al., 2013)

Berbagai aspek yang mengendalikan tekanan darah berkontribusi pada pengembangan htn primer. Dua aspek utama termasuk permasalahan mekanisme hormonal [hormon natriuretik, sistem reninangiotensin- aldosterone (rAAs)] ataupun kendala elektrolit (kalium, klorida dan natrium). Hormon natriuretik menimbulkan kenaikan konsentrasi natrium dalam sel yang menimbulkan peningkatan tekanan darah (BP). RAA mengendalikan natrium, kalium, serta volume darah, yang pada kesimpulannya hendak mengendalikan tekanan darah di arteri (pembuluh darah yang bawa darah menghindari dari jantung). Angiotensin II dan aldosterone merupakan hormone yang berada pada system rAAs. Angiotensin II mengakibatkan pembuluh darah menyempit, meningkatkan pelepasan bahan kimia yang mengakibatkan peningkatan tekanan darah (BP), serta meningkatkan pengeluaran aldosterone. Pembuluh darah yang menyempit dapat meningkatkan tekanan darah (ruang lebih sedikit, sedangkan jumlah darah sama), dan memberikan tekanan terhadap jantung. Aldosterone melepaskan air dan natrium yang terdapat di dalam darah. Dampaknya, volume darah menjadi lebih besar, dan meningkatkan tekanan pada jantung serta tingkatkan tekanan darah (BP). (Kayce Bell et al., 2015)

Nitrit oksida (NO) merupakan vasodilator penting yang diproduksi oleh endotel vaskular. Kadar NO yang tinggi yang dihasilkan terkait dengan aktivitas iNOS mungkin memiliki konsekuensi yang merugikan pada sistem kardiovaskular dan berkontribusi pada hipertensi. Jumlah NO yang berlebihan yang dihasilkan oleh regulasi iNOS dapat bereaksi dengan anion superoksida yang membentuk peroksinitrit, sehingga meningkatkan stres nitrosatif dan disfungsi endotel. Selain itu, aktivitas iNOS yang abnormal dapat meningkatkan aktivitas arginase dan menghasilkan bioavailabilitas NO. Semua perubahan yang dimediasi oleh iNOS ini tampaknya berkontribusi pada hipertensi dan komplikasinya. Penghambatan iNOS tampaknya memberikan efek antihipertensi, mengurangi stres oksidatif dan nitrosatif, dan meningkatkan fungsi vaskular. Kemungkinan bahwa iNOS merupakan target farmakologis potensial pada hipertensi (Oliveira-Paula et al., 2014). Nitric oxide (NO) juga merupakan vasodilator kuat yang membantu mengurangi resistensi perifer total dan tekanan darah. Mayoritas NO endotel diproduksi oleh sintase oksida nitrat endotel (eNOS). Penurunan NO merupakan ciri utama dari disfungsi endotel yang berkontribusi pada hipertensi. (Ugusman et al., 2020)

Curcuma longa L. terdiri dari 3 kurkuminoid utama yaitu kurkumin, demethoxycurcumin dan bisdemethoxycurcumin (Illuri et al., 2015). Selain itu, dilaporkan kombinasi *Curcuma longa* dan *Centella asiatica* dalam sediaan jus, bekerja secara sinergis sebagai diuretik, menurunkan

tekanan darah sistolik dan diastolik serta memperbaiki kekakuan arteri (Hasimun et al., 2019). Sehingga tanaman ini sering digunakan sebagai sediaan obat tradisional di Asia Tenggara (Adekoya et al., 2019).

Melalui penelitian ini, akan dilakukan induksi model hewan hipertensi dengan fruktosa dan NaCl untuk mengetahui pengaruh ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn) dan kombinasinya dengan daun pegagan (*Centella asiatica*) sebagai antihipertensi. Dilaporkan bahwa penggabungan fruktosa dan asupan tinggi garam menghasilkan peningkatan tekanan darah yang cepat dan signifikan (Zenner et al., 2018). Selain itu, akan dilakukan analisis ekspresi gen iNOS dan eNOS yang berhubungan erat dengan patogenesis hipertensi menggunakan metode PCR. Parameter yang akan diukur pada penelitian ini adalah tekanan darah, nilai PWV dan ekspresi gen iNOS dan eNOS. Penurunan tekanan darah dan nilai PWV menjadi parameter efektivitas rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn) dan kombinasinya dengan daun pegagan (*Centella asiatica*). Hasil dari penelitian rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn) dan kombinasinya dengan daun pegagan (*Centella asiatica*) diharapkan memiliki pengaruh yang sinergis terhadap penurunan tekanan darah.

1.2. Rumusan masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn) dan kombinasinya dengan daun pegagan (*Centella asiatica*) memiliki pengaruh terhadap kekakuan arteri dan sudut frontal QRS-T pada model hewan hipertensi yang diinduksi fruktosa dan NaCl?
2. Bagaimana pengaruh ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn) dan kombinasinya dengan daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi gen *iNOS* *eNOS* pada model hewan hipertensi yang diinduksi fruktosa dan NaCl?

1.3. Tujuan dan manfaat penelitian

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn) dan kombinasinya dengan daun pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi gen iNOS eNOS dan efektivitasnya sebagai antihipertensi pada model hewan hipertensi yang diinduksi fruktosa dan NaCl. Ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn) dan kombinasinya dengan daun pegagan (*Centella asiatica*) diharapkan memiliki pengaruh yang terhadap ekspresi gen *iNOS* *eNOS* dan penurunan tekanan darah sehingga digunakan sebagai bahan penelitian lebih lanjut untuk strategi terapeutik baru dalam pengelolaan resiko penyakit hipertensi.

1.4. Hipotesis penelitian

Ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa* Linn) dan kombinasinya dengan daun pegagan (*Centella asiatica*) diduga memiliki pengaruh terhadap ekspresi gen *iNOS* *eNOS* dan penurunan tekanan darah pada model hewan hipertensi yang diinduksi fruktosa dan NaCl.

1.5. Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari hingga Mei 2021, bertempat di Universitas Bhakti Kencana Bandung.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Hipertensi

II.1.1 Definisi dan Klasifikasi Hipertensi

Hipertensi adalah penyebab utama morbiditas dan mortalitas yang terkait dengan penyakit kardiovaskular (Hussaana et al., 2016). Menurut JNC VII hipertensi adalah peningkatan tekanan darah di atas 140/90 mmHg, sedangkan menurut Brunner dan Suddarth hipertensi juga diartikan sebagai tekanan darah persisten dimana tekanan darahnya diatas 140/90 mmHg. (Kayce Bell et al., 2015)

Tabel II.1 Klasifikasi Hipertensi

Klasifikasi	TD Sistolik	TD Diastolik
Normal	<120 mmHg	<80 mmHg
Pre-Hipertensi	120-139 mmHg	80-89 mmHg
Hipertensi stage-1	140-159 mmHg	80-99 mmHg
Hipertensi stage-2	\geq 160 mmHg	\geq 100 mmHg

II.1.2 Prevalensi Hipertensi di Indonesia

Berdasarkan Riskesdas pada tahun 2018, prevalensi hipertensi pada penduduk usia diatas 18 tahun sebesar 34,1%, Kalimantan Selatan menjadi daerah dengan kasus hipertensi yang cukup tinggi (44,1%), sedangkan papua menjadi daerah dengan prevalensi terendah (22,2%). Dari prevalensi hipertensi sebesar 34, 1% dikenal kalau 8, 8% terdiagnosa hipertensi, 13, 3% orang yang terdiagnosis hipertensi tidak konsumsi obat dan 32, 3% tidak teratur dalam konsumsi obat. (Riskesdas, 2018)

II.1.3 Patogenesis Kekakuan Arteri pada Hipertensi

Kekakuan arteri telah lama dipandang sebagai komplikasi hipertensi yang memadukan efek samping jangka panjang dari tekanan darah tinggi dan faktor risiko lainnya (Mitchell, 2014). Studi epidemiologi mengkonfirmasi bahwa kekakuan arteri adalah prediktor independen dari kejadian kardiovaskular yang buruk yang berkontribusi secara signifikan terhadap hipertensi sistolik, disfungsi diastolik, gangguan suplai oksigen di miokardium dan perkembangan penyakit ginjal (Hasimun et al., 2020). Penuaan kardiovaskular merupakan faktor penting yang menentukan masa hidup. Dinding arteri saluran besar, terutama aorta, menebal dan kehilangan elastisitas seiring waktu, dan proses ini menghasilkan peningkatan kecepatan gelombang nadi, ukuran kekakuan arteri yang penting dan andal. Peningkatan kekakuan arteri, apapun penyebab yang mendasarinya, akan mengurangi fungsi reservoir / buffering dari arteri saluran di dekat jantung dan meningkatkan kecepatan gelombang nadi, yang keduanya meningkatkan tekanan sistolik dan nadi. Pengerasan arteri, setidaknya,

mencerminkan fragmentasi bertahap dan hilangnya serat elastin dan akumulasi serat kolagen yang lebih kaku di media arteri besar dan terjadi secara independen dari aterosklerosis. Penuaan dikaitkan dengan penurunan rasio elastin / kolagen, yang sebagian disebabkan oleh peningkatan degradasi elastin dan peningkatan akumulasi kolagen yang lebih kaku. Degradasi elastin dikaitkan dengan pengerasan aorta progresif dan kematian karena semua penyebab. (Sun, 2015)

II.2 Ekspresi Gen

Ekspresi gen adalah proses penerjemahan informasi di dalam gen yang banyak digunakan dan ampuh untuk menyelidiki perilaku transkripsi sistem biologis, untuk mengklasifikasikan status sel dalam penyakit, dan untuk banyak tujuan lainnya (Lovén et al., 2012). Berikut senyawa pada produk gen yaitu protein, senyawa RNA fungsional yang bukan merupakan kode protein, seperti snRNA (small-nuclear RNA), rRNA (ribosomal RNA), dan tRNA (transfer RNA). (Dairaku et al., 2010)

Inducible NO synthase (iNOS) adalah prototipe mediator proinflamasi yang dapat diatur dengan kuat oleh berbagai rangsangan termasuk hipoksia-reoksigenasi (HR) di makrofag, yang sering dimediasi oleh NF- κ B (Yang et al., 2020). *Nitric oxide synthases (NOS)* adalah famili isoform yang bertanggung jawab untuk sintesis dilator potensial oksida nitrat (NO). Ekspresi NOS yang dapat diinduksi (*iNOS*) terjadi pada kondisi inflamasi, dan menghasilkan sejumlah besar NO (Lind et al., 2017). *iNOS* dapat menjadi enzim yang berbahaya dalam kondisi patologis dan dianggap sebagai penyumbang utama penyakit pada sistem kardiovaskular, seperti aterosklerosis dan hipertensi. Dalam penyakit vaskular *iNOS* berperan dengan mengkatalisasi produksi NO (Zhao et al., 2020).

Endothelial NO synthase (eNOS) adalah enzim utama yang bertanggung jawab untuk produksi oksida nitrat, variasi ekspresi dan aktivitasnya dapat dikaitkan dengan hipertensi (Arora et al., 2009). Kemudian dilaporkan bahwa pelepasan *eNOS* berkontribusi pada hipertensi, dan bagaimana pemulihan *eNOS* dapat berfungsi sebagai strategi terapi baru dan efektif untuk hipertensi. (Li et al., 2016)

II.3 Gen Regulasi Tekanan Darah

Ginjal merupakan pengatur tekanan darah yang penting dan dapat terlibat dalam patogenesis hipertensi. Gen ginjal yang terlibat dalam hipertensi bertanggung jawab untuk fungsi-fungsi seperti resorpsi natrium, aktivitas sistem renin-angiotensin (RAS), dan regulasi katekolamin. Gen yang terlibat dalam fisiologi ginjal dan mekanisme pengaturan tekanan darah terkait dengan RAS dan terdiri dari enzim pengubah angiotensin 1 dan 2 (ACE dan ACE2; Ace dan Ace2), angiotensinogen (AGT; Agt), reseptor angiotensin tipe-1a, tipe-1b, dan tipe-2 (AT1Ra, AT1Rb, dan AT2R; Agr1a, Agr1b, dan Agr2), (pro) reseptor renin (PRR; Atp6ap2), Reseptor Mas (Mas; Mas1), dan renin (Ren). (Williamson et al., 2017)

II.4 Tanaman Kunyit (*Curcuma longa* Linn)

Curcuma longa L., umumnya dikenal sebagai kunyit, adalah ramuan rhizomatous dari keluarga Zingiberaceae, yang banyak digunakan sebagai bumbu, zat pewarna dan banyak

digunakan untuk pengobatan tradisional seperti Ayurveda, Unani, dan lain-lain (Kumar et al., 2017).

Kunyit dibudidayakan di seluruh dunia di daerah tropis maupun subtropis dan berasal dari Indwanga, Asia Tenggara dan Indonesia (Amalraj et al., 2017). *C. longa* terdiri dari karbohidrat (69,4% dari total massa), kurkuminoid (kurkumin, demethoxycurcumin dan bisdemethoxycurcumin), dan minyak esensial. (Illuri et al., 2015)

II.4.1 Morfologi dan Taksonomi Kunyit

Kunyit merupakan rempah terapeutik abadi yang dapat mencapai ketinggian sekitar 1 m. Daun palemnya berbentuk lonjong, berselang-seling dan tersusun dalam dua baris, yang selanjutnya terbagi menjadi selubung daun kemudian membentuk batang semu, tangkai daun (panjang 50–115 cm), dan helai daun (panjang 76–115 cm). Tanaman memiliki rimpang tersegmentasi kasar, berwarna kuning sampai jingga, berbentuk silinder dan aromatik dengan panjang 2,5–7,0 cm dan berdiameter hampir 2,5 cm. Rimpang primer sebagian besar berbentuk buah pir yang dikenal dengan sebutan "bulb" sedangkan rimpang sekunder berbentuk silinder. Bunganya berwarna kuning kusam, dikelompokkan bersama dalam struktur spikelike padat dan panjang 10–15 cm. (Kumar et al., 2017)



Gambar II 1 Daun Pegagan



Gambar II 2 Buah Kunyit



Gambar II 3 Biji Kunyit



Gambar II 4 Bunga kunyit

(Prasad Yadav et al., 2017)

Table 1Klasifikasi Tanaman Kunyit

Kingdom	Plantae
Divisio	Spermatophyta
Sub division	Angiospermae
Class	Monocotyledonae
Ordo	Zingiberales
Family	Zingiberaceae
Genus	Curcuma
Species	Curcuma domestica Val

(Kusbiantoro and Purwaningrum, 2018)

II.4.2 Kandungan Senyawa Kunyit

Curcuma longa L. mempunyai isi senyawa yang efektif untuk obat, ialah kurkuminoid yang terdiri dari kurkumin, desmetoksikumin 10% serta bisdesmetoksikurkumin 1–5% serta zat-

zat lain yang berguna semacam minyak atsiri yang terdiri dari keton sesquiterpen, tumeon 60%, turmeron, zingiberen sebanyak 25%, sabinen, sineol, borneol, serta felandren. *Curcuma longa L.* pula mempunyai isi karbohidrat 3%, protein 30%, Vit C sebanyak 45-55%, lemak sebanyak 1–3%, pati 8%, serta garam mineral semacam fosfor, kalsium, serta zat besi (Kusbiantoro and Purwaningrum, 2018). Analisis nutrisi menunjukkan bahwa 100 g kunyit mengandung protein (8g), gula (3g), mineral (3,5g), karbohidrat (69,9%), serat makanan (21g), kelembaban (13,1%) dan jumlah yang signifikan dari vitamin. Analisis biokimia rimpang kuning menunjukkan adanya senyawa fenolik alami seperti kurkuminoid (kurkumin, demethoxycurcumin dan bisdemethoxycurcumin). (Kumar et al., 2017)

II.4.3 Efek Farmakologi Kunyit

Table 2 Efek Farmakologi Kunyit

Efek farmakologi	Keterangan	Referensi
Antiinflamasi	Dapat menghambat beberapa molekul yang terlibat dalam peradangan seperti fosfolipase, lipoxigenase, COX-2, leukotrien, tromboksan, prostaglandin, nitrit oksida, kolagenase, elastase, hyaluronidase, MCP-1, <i>interferon-inducible protein</i> , faktor nekrosis tumor, dan interleukin-12	(LIMA et al., 1982)
Antioksidan	Dapat menunjukkan efektivitasnya sebagai antioksidan pada sistem emulsi asam linoleat. Efek dari konsentrasi (15–45 g / mL) kurkumin mampu menghambat peroksidasi lipid emulsi asam linoleat, dimana telah ditemukan efektivitasnya sebesar 97,3, 98,8 dan 99,2%.	(Iwahori, A., Hirota, Y., Sampe, 1970)
Antibakteri	konsentrasi MIC (minimum inhibitory concentration) dari 4-16 g/L dan MBC dari 16-32 g/L terhadap <i>pneumoniae</i> ATCC 10031, <i>E. pneumoniae</i> ATCC 10031 <i>Coli</i> ATCC	(N.Niamsa and Sittiwet, 2009)

	25922, <i>Staph . aureus</i> ATCC 25923, <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228, dan <i>Klebsiella</i>	
Antivirus	Aktivitas terhadap penghambatan enzim IMPDH, baik secara kompetitif ataupun tidak kompetitif ditunjukkan sebagai senyawa antivirus yang kuat. Kecepatan aktivitas enzim dehidrogenase inosine monophosphate (IMPDH) dalam proses sintesis nukleotida guanin memiliki batasan, sehingga enzim ini direkomendasikan sebagai tujuan terapi untuk antivirus dan antikanker.	(Dairaku et al., 2010)
Antifungi	Penambahan serbuk kunyit pada kultur jaringan tanaman dapat menunjukkan pada kunyit dengan konsentrasi 0,8 dan 1,0 g/L mempunyai aktivitas dalam menghambat kontaminasi jamur.	(Kim et al., 2003)
Antimalaria	Pada dosis kurkumin yang ditingkatkan mampu menurunkan viabilitas <i>P. falciparum</i> . Dari percobaan aktivitas antimalaria kurkumin yang menggunakan tikus yang diinfeksi oleh <i>P. berghei</i> dan pengujian secara in vivo , menunjukkan bahwa kurkumin memiliki efek dalam penghambatan terhadap <i>P. Falciparum</i> yang signifikan.	(Vathsala et al., 2012)

II.5 Tanaman Pegagan

Pegagan (*Centella asiatica* (L) adalah tanaman yang masuk ke dalam suku *umbelliferae* atau *apiaceae*. Pegagan cukup banyak digunakan sebagai bahan untuk obat tradisional. Khasiat ilmiah dari pegagan ini telah banyak diteliti dengan menggunakan hewan coba dan didapat kesimpulan bahwa pegagan bisa digunakan sebagai antioksidan, antigastritis, antitumor, penyembuhan luka, imunomodulator, antiproliferasi. Pada Saintifikasi Jamu terdapat kesimpulan bahwa pegagan merupakan salah satu komponen ramuan antihipertensi. (Maruzy et al., 2020)

II.5.1 Morfologi dan Taksonomi Pegagan

Tanaman pegagan (*Centella asiatica* (L.) berasal dari daerah tropis di Asia (Heyne 1987). Pegagan memiliki nama yang berbeda-beda pada setiap daerah. Di Jakarta dan Aceh namanya pegagan, di Jawa Barat tanaman ini bernama antanan, di Sumatera mereka menyebutnya kaki kuda sedangkan pada masyarakat manura tanaman ini dikenal dengan nama tikusan dan di Bali bernama taiduh (Wijayakusuma et al. 1994).



Gambar II 5 Daun Pegagan

Sumber (www.google.com)

Berdasarkan klasifikasi taksonomi, pegagan termasuk ke dalam : (Heyne 1987)

Table 3 Klasifikasi taksonomi pegagan

Kingdom	Plantae
Divisio	Spermatophyta
Sub divisio	Angiospermae
Class	Dicotyledonae
Ordo	Umbilicales
Family	Umbelliferae (Apiaceae)
Genus	Centella
Species	Centella asiatica (L.) Urban atau

	Hydrocotyle asiatica Linn
--	---------------------------

II.5.2 Kandungan Senyawa Pegagan

Menurut Winarto dan Surbakti (2003), *Centella asiatica* memiliki kandungan dalam bahan aktif, berupa: flavonoid, fitosterol, saponin, triterpenoid, triterpenoid genin, minyak atsiri, dan bahan aktif lainnya. Kandungan terpenting yang terdapat dalam bahan aktif adalah saponin dan triterpenoid, yang meliputi: sentelosida, asiatikosida, madekosida, dan asam asiatic dengan komponen lain seperti flavonoid, tannin, minyak volatil, fitosterol, karbohidrat dan asam amino. Seluruh kandungan bioaktif tanaman *Centella asiatica* merupakan antioksidan yang memiliki manfaat untuk tubuh manusia dalam meningkatkan sistem imun. Senyawa yang paling penting dalam tanaman pegagan adalah triterpenoid. Fungsi dari triterpenoid yaitu mampu memberikan efek menenangkan dan peningkatan fungsi mental. Senyawa ini juga mampu merevitalisasi pembuluh darah sehingga melancarkan peredaran darah menuju otak.

II.5.3 Efek Farmakologi Pegagan

Table 4 Efek Farmakologi Pegagan

Efek Farmakologi	Hasil	Referensi
Antiproliferatif	Ekstrak dari pegagan menunjukkan hasil antiproliferatif melawan A549 dan tidak ada efek sitotoksik fibroblas normal manusia sel IMR90.	(Belwal et al., 2018)
Fungsi Kognitif	Pegagan mampu meningkatkan pembelajaran, memori dan meningkatkan properti antioksidan.	
Antiinflamasi	Pegagan memiliki efek yang positif sebagai antiinflamasi.	
Antikanker	Efek dari pegagan mampu memperlambat perkembangan terjadinya tumor dan efek dari pegagan mampu meningkatkan masa hidup tikus.	
Antioksidan	Pegagan memiliki efek mampu mencegah terjadinya stres oksidatif.	

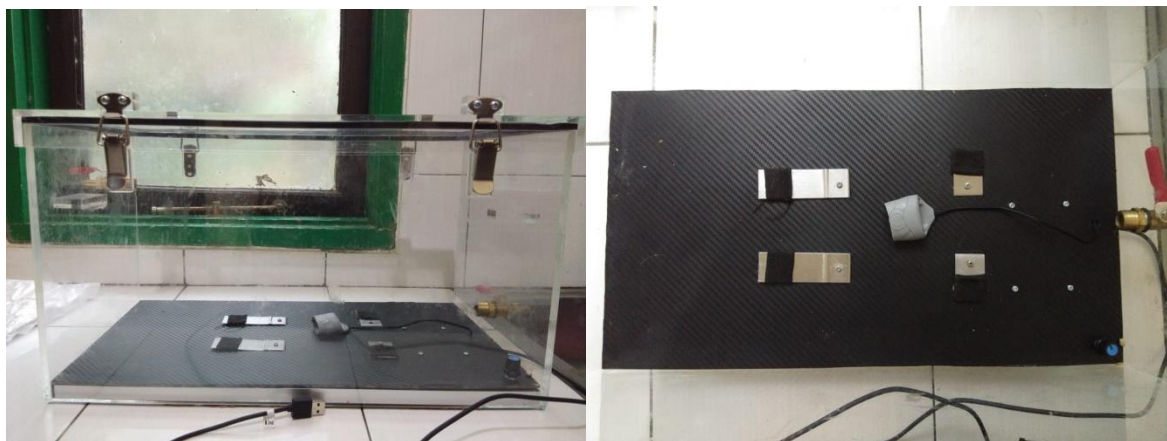
Pelindung Saraf	Efek pegagan mampu mempertahankan neuronal motilitas.	
Antiulcer	Pegagan mampu menjadi pelindung yang cukup signifikan untuk melawan maag.	
Penyembuhan Luka	Asiatikosida dari pegagan mampu memfasilitasi penyembuhan luka.	

II.6 Pengukuran Kekakuan Arteri Non Invasif

II.6.1 Alat mengukur PWV

Alat kecepatan gelombang nadi (PWV) digunakan untuk menilai kekakuan arteri sebagai indeks kerusakan organ target kardiovaskular terkait hipertensi. Peningkatan kekakuan arteri terkait dengan modifikasi hemodinamik pada tingkat aorta, yang menyebabkan peningkatan afterload jantung, penurunan perfusi koroner, dan peregangan dinding aorta yang berlebihan. (Milan et al., 2011)

Perancangan alat ukur PWV diperlukan sebuah sensor yang dapat mengukur kondisi arteri untuk mendapatkan sinyal perolehan waktu dan mendapatkan selisih waktu dari sinyal gelombang pulsa. Nilai PWV (*Pulse Wave Velocity*) yang tinggi menunjukkan adanya kekakuan arteri yang lebih tinggi. Kekakuan arteri menyebabkan dinding arteri menjadi tidak fleksibel karena energi dari nadi setiap tekanan darah tidak dapat disimpan di dinding pembuluh darah yang fleksibel. Maka pada pengukuran PWV ini digunakan sensor elektrokardiogram (EKG) dan photoplethysmogram (PPG). (Hasimun et al., 2020)



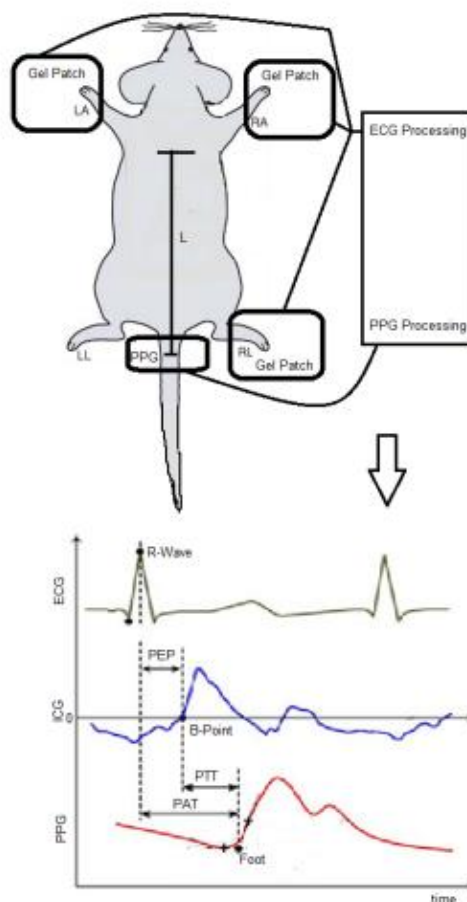
Gambar II 6 Alat PWV

II.6.2 Pengukuran PWV Non Invasif

Pulse Wave Velocity (PWV) adalah indeks penting untuk menentukan risiko disfungsi kardiovaskular dan digunakan sebagai peringatan dini untuk kemungkinan faktor risiko. Metode pengukuran PWV yang kami gunakan adalah non-invasif. Pengukuran PWV

dilakukan dengan menggunakan metode *non-invasif*. Metode ini dilakukan dengan mengukur kecepatan aliran darah yang keluar dari jantung menuju pangkal ekor hewan uji menggunakan sensor elektrokardiogram (EKG) dan photoplethysmogram (PPG). Peningkatan waktu yang dibutuhkan menunjukkan kekakuan arteri. Metode ini tentunya merupakan metode yang mudah untuk menentukan kekakuan arteri secara akurat, tanpa perlu uji bedah pada hewan. Berdasarkan nilai PWV yang didapat menjadi gambaran betapa kerasnya jantung bekerja dan juga dapat menjadi acuan untuk menentukan diagnosis kekakuan arteri. (Hasimun et al., 2020)

Elektroda EKG (tambalan gel) dipasang pada kaki kiri dan kanan depan serta kaki kanan belakang hewan uji. Sedangkan sensor PPG ditempatkan pada ekor tikus. Sinyal EKG analog dan PPG diteruskan ke analog to digital converter (ADC) berbasis Arduino dan sinyal digital direkam oleh komputer dengan kecepatan 1000 sampel / detik.



Gambar II 7 Sistem pengukuran PWV pembuluh aorta pada hewan tikus. PWV dihitung dengan membagi jarak (L) dengan waktu propagasi (PTT)

Dengan membandingkan bentuk gelombang EKG dan PPG, waktu kedatangan pulsa (PAT) dapat ditentukan. PAT adalah durasi waktu dari titik waktu referensi pertama (gelombang-R) ke titik waktu referensi kedua (Kaki PPG). Diperlukan waktu yang singkat dari saat ventrikel berkontraksi hingga darah benar-benar keluar dari katup jantung. Durasi pendek ini disebut

periode pra-ejeksi (PEP). Impedance cardiography (ICG) dapat digunakan untuk mengukur waktu ketika darah benar-benar keluar dari jantung (B-Point). Nilai PEP untuk hewan tikus sekitar 15 ms dan relatif tidak berubah dengan perubahan kekakuan pembuluh darah. Waktu propagasi adalah perbedaan waktu antara awal peningkatan tekanan darah / bentuk gelombang volume dari jantung ke dasar ekor (Pulse Transit Time = PTT).

PWV dihitung dengan rumus :

$$PWV = \frac{L}{PAT - PEP}$$

Keterangan :

L : panjang segmen arteri (dari titik posisi jantung ke posisi sensor PPG di pangkal ekor)

PAT : waktu kedatangan pulsa

PEP : periode pra-ejeksi (untuk tikus diperkirakan mencapai 15 ms)

Nilai PWV dengan kekakuan pembuluh darah dapat diekspresikan dalam persamaan Moens-Korteweg :

$$PWV = \frac{Eh}{2rp}$$

Keterangan : E, ρ , h dan r merupakan kekakuan dan kepadatan pembuluh darah, ketebalan dan jari-jari pembuluh darah. Nilai rata-rata PWV untuk mencit normal adalah sekitar 300 - 500 cm/s.

II.7 Pengukuran Tekanan Darah

Parameter tekanan darah sistolik, tekanan darah diastolik, MAP, HR, volume darah, dan aliran darah pada ekor dapat diukur secara bersamaan pada pengukuran tekanan darah. (Nugroho et al., 2018). Pengukuran dilakukan menggunakan Sistem Pemantauan Ekor *Non-invasif Coda High Throughput* (Kent Scientific, Torrington, CT, USA). (Peleli et al., 2017).

II.8 Metode Analilis Molekular

II.8.1 Definisi PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR adalah uji enzimatik yang sederhana dan memungkinkan amplifikasi fragmen DNA spesifik dari kumpulan DNA kompleks. Setiap pengujian PCR harus dilengkapi dengan adanya DNA template, primer, nukleotida, dan DNA polimerase. DNA polimerase adalah enzim kunci yang menggabungkan nukleotida individu bersama-sama dalam membentuk produk PCR. Nukleotida termasuk empat basa yaitu adenin, timin, sitosin, dan guanin (A, T, C, G) yang ditemukan dalam DNA. Hal ini bertindak sebagai blok bangunan yang digunakan oleh DNA polimerase untuk membuat produk PCR yang dihasilkan (Carriço et al., 2013). Dengan munculnya PCR, sejumlah kecil RNA, yang diubah menjadi cDNA melalui reaksi transkripsi balik, dapat diperkuat. (VanGuilder et al., 2008)

II.8.2 Siklus PCR

1. Denaturasi
Proses pemisahan kedua untai DNA menggunakan temperatur yang tinggi. Dan DNA terdenaturasi pada suhu 90-97°C.
2. Primer annealing
Penempelan primer pada pita DNA terjadi pada suhu 55-60°C selama 30 detik.
3. Extension
Proses ekstensi oleh enzim DNA polimerase pada suhu 72°C dengan waktu yang disesuaikan pada panjang atau pendeknya ukuran DNA yang diinginkan sebagai produk amplifikasi. (Joshi and Deshpande, 2011).

Setelah ekstensi, reaksi dikembalikan ke tahap denaturasi dan PCR berlanjut. Setiap siklus kira-kira melipatgandakan jumlah DNA, sebagai untai DNA baru kemudian bertindak sebagai cetakan untuk replikasi dalam siklus berikutnya. Ini menghasilkan peningkatan eksponensial dalam kuantitas DNA. Produk PCR atau "amplikon" dapat divisualisasikan dan dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa, yang memisahkan produk DNA berdasarkan ukuran dan muatan. (Wangler and Bellen, 2017)

II.8.3 Reverse transcriptase (RT) PCR

Reaksi berantai polimerase transkriptase balik berbasis fluoresensi waktu nyata (RT-PCR) adalah salah satu teknologi yang memungkinkan pada zaman genomik dan telah menjadi metode pilihan untuk mendeteksi mRNA. RT-PCR juga digunakan untuk mengubah RNA menjadi cDNA. Reaksi berantai polimerase transkriptase balik waktu nyata (RT-PCR) menggunakan molekul pelapor fluoresen untuk memantau produksi produk amplifikasi selama setiap siklus reaksi PCR. Ini menggabungkan langkah amplifikasi dan deteksi asam nukleat menjadi satu pengujian homogen dan meniadakan kebutuhan elektroforesis gel untuk mendeteksi produk amplifikasi. (Bustin et al., 2005)

II.8.4 Studi Literatur Primer Gen *iNOS* *eNOS*

Dalam proses PCR diperlukan beberapa kajian pustaka sebagai landasan untuk menentukan desain primer. Primer Gen *iNOS* *eNOS* yang digunakan dalam Metode PCR :

Table 5 Primer gen *iNOS* *eNOS*

Gen	Primer	Referensi
<i>Inos</i>	F : AGCATCACCCCTGTGTTCCACCC R : TGGGGCAGTCTCCATTGCCA	(Wang et al., 2017)
<i>iNOS</i>	F :CGGAAGAGACGCACAGGCAGAGGTT R : AAGGCAGCAGGCACACGCAATGATG	(Ding et al., 2017)
<i>iNOS</i>	F : ATGGAACAGTATAAGGCAAACACC R : GTTTCTGGTCGATGTCATGAGCAAAGG	(Dianat et al., 2016)

<i>iNOS</i>	F : CTCACTGGGACTGCACAGAA R : TGTTGAAGGGTGTCGTGAAA	(Schaffner et al., 2018)
<i>eNOS</i>	F : GCAAGACCGATTACACGACA R : GTCCTCAGGAGGTCTTGACAC	(Farhangkhoe et al., 2006)
<i>eNOS</i>	F : AGCGGCTGGTACATGAGTTC R : CCGGGTGTCTAGATCCATGC	(Ugusman et al., 2020b)
<i>eNOS</i>	F : AAGTGGGCAGCATCACCTAC R : GCCTGGGAACCACTCCTTTT	(Schaffner et al., 2018)
<i>eNOS</i>	F : TGCACCCTTCCGGGGATTCT R : GGATCCCTGGAAAAGGCGGT	(De Gennaro Colonna et al., 2002)

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek antihipertensi dan modulasi gen *iNOS* *eNOS* ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma longa linn*) dan kombinasinya dengan daun pegagan (*Centella asiatica*) pada model hewan hipertensi yang diinduksi dengan fruktosa dan NaCl selama 28 hari dengan metode eksperimental *non invasiv*. Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini yaitu menyiapkan ekstrak kunyit dan ekstrak pegagan yang diperoleh dari Markherb School of Pharmacy Institut Teknologi Bandung (ITB).

Penelitian ini dilakukan selama 42 hari pada 36 tikus putih jantan galur wistar yang dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok, yang kemudian diberikan perlakuan berupa aklimatisasi, induksi dan pengobatan. Tahap selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antihipertensi dengan parameter uji yang dilakukan yaitu pengukuran tekanan darah menggunakan alat *CODA Non Invasive Blood Pressure Kent Scientific Corporation*, pengukuran elastisitas arteri menggunakan alat *Pulse Wave Velocity* dan pengukuran denyut jantung.

Tahap berikutnya yaitu analisis molekular yang dilakukan dengan isolasi RNA gen *iNOS* *eNOS* dari korteks ginjal dan aorta tikus menggunakan alat isolation kit (Promega). Kemudian RNA diamplifikasi melalui proses transkripsi balik (reverse transcriptase) menjadi cDNA dengan menggunakan alat instrumen *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan dilakukan evaluasi hasil PCR dengan elektroforesis gel. Selanjutnya analisis semi-kuantitatif produk hasil PCR ekspresi gen *iNOS* *eNOS* dengan aplikasi Image J dan analisis data secara statistik menggunakan aplikasi SPSS untuk melihat hubungan antar kelompok perlakuan dengan analisis variansi One Way ANOVA.

Kemudian dilakukan pengukuran kadar *Nitric Oxyde* (NO) dari darah tikus yang diambil melalui sinus orbital mata dengan menggunakan kapiler hematokrit. Dan direaksikan dengan pereaksi griess, lalu absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Selain itu dilakukan pengukuran kenaikan bobot badan tikus selama 28 hari, guna untuk mengetahui tikus yang digunakan mengalami obesitas atau tidak selama perlakuan.