

EFEK VASODILATASI DAN INHIBISI ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME DARI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI DAUN BINAHONG (*ANREDERA CORDIFOLIA* (TEN). V. STEENIS)

*Afrillia Nuryanti Garmana, Elin Yulinah Sukandar, Irda Fidrianny

Informasi Penulis

Sekolah Farmasi
Institut Teknologi
Bandung
Jl. Ganesa 10 Bandung
40132

*Korespondensi

Afrillia Nuryanti
Garmana
E-mail:
afrillia@fa.itb.ac.id

ABSTRAK

Efek antihipertensi binahong pada model hewan hipertensi yang diinduksi dengan adrenalin dan deksametason telah dibuktikan pada penelitian sebelumnya. Pada penelitian ini, dikaji mekanisme kerja lebih lanjut dari efek antihipertensi ekstrak etanol daun binahong dan fraksinya. Pengujian secara *ex vivo* dilakukan dengan menggunakan aorta kelinci yang diinduksi dengan norepinefrin, metilen biru- norepinefrin, dan kalium klorida. Efek pemberian ekstrak etanol daun binahong (EEDB), fraksi n-heksana (FH), fraksi etil asetat (FE), dan fraksi air (FA) diamati pada kimograf lalu dihitung persen relaksasi dan waktu relaksasi. Pengujian secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan Hip-His-Leu sebagai substrat dan mengukur produk yang terbentuk secara spektrofotometri UV-sinar tampak pada panjang gelombang 228 nm. Dari data absorbansi, dihitung persen inhibisi *angiotensin converting enzyme* (ACE) dan ditentukan nilai IC_{50} . Pada kontraksi yang diinduksi norepinefrin, EEDB, FH, FE, dan FA menunjukkan persen relaksasi berturut-turut sebesar 60,9; 39,2; 48,2; dan 52,5%. Waktu relaksasi pada semua kelompok uji menurun secara signifikan terhadap kelompok yang diinduksi norepinefrin ($p < 0,05$). Pada kontraksi yang diinduksi norepinefrin dengan pretreatment metilen biru, persen relaksasi yang terjadi akibat pemberian EEDB, FH, FE, dan FA berturut-turut sebesar 21,4; 30,7; 21,6; dan 23,8% serta tidak terjadi penurunan waktu relaksasi. Pada kontraksi yang diinduksi KCl, persen relaksasi yang terjadi akibat pemberian EEDB, FH, FE, dan FA berturut-turut sebesar 42,2; 20,4; 49,1; dan 35,8%, akan tetapi tidak terjadi penurunan waktu relaksasi. Nilai IC_{50} pada pemberian EEDB, FH, FE, dan FA berturut-turut sebesar 22,63; 242,60; 115,77; dan 97,53 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak etanol daun binahong memiliki efek vasodilatasi melalui jalur NO, inhibisi kanal kalsium (lemah), dan inhibisi ACE (sedang). Fraksi n-heksana tidak menunjukkan efek inhibisi kanal kalsium dan inhibisi ACE, tetapi menunjukkan efek vasodilatasi melalui jalur NO. Fraksi etil asetat menunjukkan efek vasodilatasi melalui jalur NO, inhibisi kanal kalsium (lemah), serta inhibisi ACE (lemah). Fraksi air menunjukkan efek vasodilatasi melalui jalur NO serta inhibisi ACE (lemah), tetapi tidak menunjukkan efek inhibisi kanal kalsium.

Kata kunci: *Anredera cordifolia*, binahong, vasodilatasi, nitrit oksida, inhibisi kanal kalsium, inhibisi *angiotensin converting enzyme*

VASODILATATION AND ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITION EFFECT OF ETHANOL EXTRACT AND FRACTION FROM MADEIRA VINE (*ANREDERA CORDIFOLIA* (TEN). V. STEENIS) LEAF

ABSTRACT

The antihypertensive effects of *Anredera cordifolia* (madeira vine) on adrenaline-induced and dexamethasone-induced hypertensive rat have been demonstrated in previous studies. In this study, mechanism of antihypertensive effect of ethanol extract of madeira vine leaves and its fraction studied further. *Ex vivo* experiment was performed using rabbit aortic rings induced with norepinephrine, methylene blue-norepinephrine, and potassium chloride. The respond of aortic rings to ethanol extract of madeira vine (EEMV), n-hexane fraction (HF), ethyl acetate fraction (EF), and water fraction (WF) were observed in the kymograph, then percentage of relaxation and relaxation time were calculated from the graph obtained. *Angiotensin converting enzyme* (ACE) inhibitor activity test was performed *in vitro* using Hip-His-Leu as the substrate. The product of enzymatic reaction measured using UV-visible spectrophotometry at wavelength 228 nm. From the absorbance data, percentage of enzyme inhibition was calculated and IC_{50} value was determined. In norepinephrine-induced contraction, EEMV, HF, EF, and WF showed percentage of relaxation 60.9; 39.2; 48.2; and 52.5%, respectively. Relaxation time of all groups were significantly decrease compared to norepinephrine group ($p < 0.05$). In norepinephrine-induced contraction with methylene blue pretreatment, the percent of relaxation were 21.4; 30.7; 21.6; and 23.8%, respectively for EEMV, HF, EF, and WF, and there was no reduction in relaxation time. In KCl-induced contraction, the percentage of relaxation of EEMV, HF, EF, and WF were 42.2; 20.4; 49.1; and 35.8%, respectively, but no reduction in relaxation time. IC_{50} of EEMV, HF, EF, and WF were 20.76, 198.13, 115.77, and 88.41 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The ethanol extract of madeira vine leaves showed vasodilator effect through the endothelium-dependent pathway, inhibition of calcium channel (weak), and ACE inhibition (moderate). The n-hexane fraction showed no inhibitory effect of calcium channel and ACE, but showed vasodilation effect via endothelium-dependent pathway. Vasodilation effect of ethyl acetate fraction occurred through the endothelium-dependent pathway, inhibition of calcium channel (weak), and ACE inhibition (weak). The water fraction showed vasodilation effect through endothelium-dependent pathway and inhibition of ACE (weak), but did not show calcium channel inhibition effect.

Key words: *Anredera cordifolia*, madeira vine, vasodilatation, nitric oxide, calcium channel blocker, angiotensin converting enzyme inhibition

Pendahuluan

Hipertensi merupakan penyakit kardiovaskular yang paling umum terjadi. Prevalensi hipertensi di Indonesia menurut Riskesdas 2013 adalah 26,5%. Prevalensi hipertensi meningkat dengan bertambahnya usia. Menurut Riskesdas 2008, hipertensi merupakan penyebab kematian utama ketiga di Indonesia untuk semua usia (6,8%), setelah *stroke* (15,4%) dan tuberkulosis (7,5%). Menurut WHO, prevalensi hipertensi pada orang dewasa > 25 tahun adalah 32,5 % pada pria dan 29,3 % pada wanita (WHO 2012).

Terapi non-farmakologi merupakan komponen penting dalam pengobatan pasien hipertensi. Perubahan pola hidup tersebut dapat memudahkan pengaturan tekanan darah (Brunton *et al.* 2011). Terapi farmakologi diberikan pada pasien yang tidak berhasil diterapi dengan terapi non-farmakologi atau pasien hipertensi tahap 1 dan 2 serta pasien yang memiliki faktor resiko kardiovaskular tambahan, terutama yang memiliki target tekanan darah kurang dari 130/80 mmHg atau 120/80 mmHg yang belum dapat mencapai target tersebut. Terapi farmakologi melibatkan obat antihipertensi yang bekerja dengan cara menurunkan resistensi perifer, *cardiac output*, atau kedua-duanya.

Penggunaan obat herbal untuk menangani berbagai penyakit semakin meningkat selama dekade terakhir. Alasan utama terjadinya fenomena tersebut adalah obat herbal merupakan alternatif pengobatan yang lebih murah dengan efek samping yang lebih sedikit. Adanya kandungan berbagai komponen aktif yang diketahui memiliki efek terapeutik tertentu di dalam obat herbal menjadi alasan lain penggunaan obat herbal dalam mengobati penyakit (Disi *et al.* 2015).

Tanaman yang digunakan secara tradisional untuk menurunkan tekanan darah sangat banyak. Akan tetapi, belum semua tanaman terbukti efek antihipertensinya secara ilmiah. Di sisi lain, beberapa tanaman sudah terbukti efek antihipertensi atau hipotensinya pada manusia diantaranya umbi bawang putih (*Allium sativum* L.), *Crataegus* spp., kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), ginseng (*Panax*

quinquefolius L.), putik bunga safran/kuma-kuma (*Crocus sativus* L.), dan biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) (Disi *et al.* 2015). Selain itu, umbi lapis kucai (*Allium schoenoprasum* L.) (Amalia 2008), herba seledri (*Apium graveolens* L.), dan daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.) pun telah melewati tahap uji klinis.

Pembuktian efek antihipertensi dari suatu tanaman dapat dilakukan melalui pengujian praklinis baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Pengujian secara *in vivo* dilakukan di dalam tubuh makhluk hidup (hewan percobaan) sedangkan pengujian *in vitro* dilakukan di laboratorium menggunakan tabung reaksi atau alat gelas lainnya (*vitro* = kaca), pada kondisi percobaan terkontrol (menyerupai kondisi fisiologis) (WebMD 2008, Cohen 2003). Dari pengujian tersebut, dapat diketahui efek dan mekanisme kerja tanaman yang diuji.

Binahong merupakan tanaman yang mulai banyak diteliti. Berbagai macam efek binahong telah diteliti, baik secara *in vitro*, *in vivo*, maupun *ex vivo*. Salah satu efek binahong yang telah diteliti adalah efek antihipertensi. Ekstrak etanol daun binahong telah terbukti dapat menurunkan kecepatan denyut jantung pada model hewan hipertensi yang diinduksi adrenalin (Garmana *et al.* 2016). Ekstrak, fraksi etil asetat, dan fraksi air dapat menurunkan tekanan darah pada model hewan hipertensi yang diinduksi dengan deksametason (Garmana 2017). Pada penelitian ini, akan dikaji mekanisme kerja lebih lanjut dari efek vasodilatasi ekstrak etanol daun binahong dan fraksinya.

Percobaan

Pembuatan ekstrak dan fraksi

Lima kg simplisia diekstraksi dengan etanol 96 % menggunakan alat reluks selama 2 jam kemudian disaring. Residu diekstraksi kembali dua kali dengan etanol 96 %. Filtrat yang diperoleh disatukan kemudian dipisahkan dengan rotavapor. Kemudian pemekatan ekstrak dilanjutkan di atas tangas air bersuhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental. Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair dengan pelarut n-heksana dan etil asetat. Sebanyak 100 gram

ekstrak dimasukkan dalam 500 mL aquadest mendidih lalu diaduk dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh didinginkan lalu dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambahkan n-heksana dengan perbandingan volume 1:1, dan dikocok perlahan. Fraksi n-heksana dipisahkan, sedangkan lapisan air diekstraksi kembali dengan menggunakan n-heksana sampai 3 kali. Lapisan air kemudian diekstraksi lebih lanjut dengan menambahkan etil asetat dengan perbandingan volume 1:1, dilakukan sebanyak 3 kali dan diperoleh fraksi etil asetat. Lapisan air yang tersisa merupakan fraksi air. Fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat dipekatkan dengan rotavapor, sedangkan fraksi air dikeringkan dengan alat *freeze dryer*.

Pengujian Efek Vasodilatasi secara *Ex Vivo*

Kelinci albino lokal jantan dengan bobot 2-3 kg digunakan dalam percobaan ini. Kelinci dimasukkan dalam *chamber* lalu dialiri gas karbon dioksida 100% selama 2-3 menit. Setelah dilakukan konfirmasi kematian, kelinci dibedah, lalu diisolasi aortanya. Aorta dibersihkan dari jaringan lain yang menempel lalu dimasukkan dalam dapar Krebs's dan dipotong-potong dengan lebar ± 3 mm.

Untuk menguji efek perintangan reseptor alfa pada pembuluh darah, cincin aorta ditempatkan dalam *organ bath* yang terhubung pada alat kimograf lalu diinduksi dengan norepinefrin agar terjadi kontraksi. Setelah itu, zat uji diteteskan pada *organ bath* dan diamati terjadinya relaksasi. Zat yang diuji adalah ekstrak etanol daun binahong (1,57 mg/mL), fraksi air (0,64 mg/mL), fraksi etil asetat (0,03 mg/mL), dan fraksi n-heksana (0,004 mg/mL). Terazosin (1,41 μ g/mL) digunakan sebagai pembanding (Sukandar *et al.* 2016).

Apabila terjadi relaksasi akibat pemberian zat uji, dilanjutkan dengan pengujian keterlibatan NO dalam vasodilatasi tersebut dengan cara menambahkan metilen biru (100 μ M) sebelum pemberian norepinefrin pada cincin aorta (Hassan *et al.* 2013). Untuk menguji adanya efek perintangan kanal kalsium, digunakan kalium klorida (KCl) 80 mM sebagai induktor kontraksi

pada cincin aorta (Woode *et al.* 2013, Iwalokun *et al.* 2011). Ekstrak, fraksi, atau pembanding (nifedipin 7,05 μ g/mL) ditambahkan setelah terjadi kontraksi.

Parameter yang diamati adalah waktu relaksasi dan % relaksasi. Waktu relaksasi merupakan waktu yang diperlukan untuk mencapai relaksasi 100%, dihitung sejak penambahan ekstrak atau fraksi atau obat pembanding. Nilai persen relaksasi dihitung menggunakan persamaan berikut ini:

$$\% \text{ relaksasi} = \frac{\text{delta amplitudo}}{\text{amplitudo}} \times 100\%$$

Pengujian Efek Inhibisi Angiotensin Converting Enzyme (ACE) secara *In Vitro*

Pengujian secara *in vitro* dilakukan dengan mengukur absorbansi yang dihasilkan dari reaksi zat uji dengan substrat Hipuril-L-histidil-L-leusin (HHL) dan ACE lalu ditentukan aktivitas inhibisi enzimnya. Sejumlah 50 μ L zat uji ditambahkan dengan 150 μ L larutan HHL 8 mM dalam dapar Na-borat (pH 8,3) lalu ditambahkan 50 μ L larutan ACE (25 mU/mL) dan diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Reaksi enzimatis dihentikan dengan penambahan 250 μ L HCl 1M. Hasil reaksi berupa asam hipurat diekstraksi dengan 1,7 mL etil asetat. Sebanyak 1 mL lapisan etil asetat diambil lalu diuapkan pada tangas air. Hasilnya dilarutkan dengan 3 mL aquadeion lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometri uv-sinar tampak pada panjang gelombang 228 nm (Muthia *et al.* 2017, Mao and Li 2015, Jamhari *et al.* 2013, Prasanna *et al.* 2012). Persen inhibisi dihitung melalui persamaan:

$$\text{Aktivitas inhibisi ACE (\%)} = 100 - [100 \times (C - D)/(A - B)]$$

dengan A = hasil absorbansi dengan ACE, tanpa inhibitor ACE (komposisi: ACE+substrat); B = hasil absorbansi tanpa ACE dan tanpa inhibitor ACE (komposisi: substrat); C = hasil absorbansi dengan ACE dan inhibitor ACE (komposisi: ACE+substrat+sampel); dan D = hasil absorbansi dengan inhibitor ACE, namun tanpa substrat (komposisi: sampel+ACE).

Hasil dan Pembahasan

Pengujian Efek Vasodilatasi secara *Ex Vivo*

Pada penelitian sebelumnya, diketahui bahwa ekstrak etanol daun binahong dan ketiga fraksinya diketahui memiliki efek antihipertensi pada model hewan hipertensi yang diinduksi deksametason (Garmana 2017). Induksi dengan deksametason dapat menyebabkan gangguan fungsional pada sel otot polos pembuluh darah sehingga meningkatkan resistensi perifer pada pembuluh darah (Ong *et al.* 2009). Secara umum, obat-obat yang menyebabkan vasodilatasi dapat mengantagonis hipertensi akibat pemberian deksametason. Efek vasodilatasi dapat dicapai melalui beberapa cara, diantaranya melalui peningkatan kadar nitrit oksida, inhibisi reseptor $\alpha 1$ pada pembuluh darah, inhibisi enzim ACE atau reseptor AT1 pada pembuluh darah, atau inhibisi saluran kalsium. Efek penurunan resistensi perifer pun dapat dihubungkan dengan efek antioksidan yang dimiliki oleh ekstrak etanol daun binahong. Sifat antioksidan ekstrak etanol daun binahong dapat meredam superoksida yang terbentuk saat terjadi stres oksidatif pada pembuluh darah.

Untuk mengkaji mekanisme kerja lebih lanjut dari efek vasodilatasi ekstrak etanol dan fraksi daun binahong, dilakukan pengujian secara *ex vivo* pada aorta kelinci dengan menggunakan induktor yang berbeda-beda yaitu norepinefrin, norepinefrin dengan pretreatment metilen biru, dan kalium klorida. Induktor tersebut akan menyebabkan kontraksi pada cincin aorta kelinci.

Kontraksi otot polos pada pembuluh darah dapat terjadi melalui beberapa *signaling pathway*. Proses utama pada kontraksi otot polos adalah peningkatan kalsium intraselular yang kemudian akan berikatan dengan kalmodulin sehingga MLC (*myosin light chain*) kinase teraktivasi dan memfosforilasi myosin rantai pendek sehingga dapat berikatan dengan aktin dan terjadi kontraksi otot polos pada pembuluh darah (Tortora and Derrickson 2012, Webb 2003). Peningkatan konsentrasi kalsium intraselular dapat dicapai melalui pelepasan kalsium intraselular dari tempat penyimpanan (misalnya retikulum sarkoplasma dan mitokondria), masuknya ion kalsium melalui *voltage-operated Ca²⁺ channels*,

atau masuknya kalsium melalui *receptor-operated Ca²⁺ channels* (Hassan *et al.* 2013).

Norepinefrin menyebabkan vasokonstriksi terutama melalui aktivasi kanal kalsium yang diperantarai reseptor (*receptor-operated Ca²⁺ channels*). Norepinefrin dapat berikatan dengan reseptor $\alpha 1$ (*large arteries*) atau reseptor $\alpha 2$ (*small arteries and arterioles*) (Loscalzo *et al.* 2015) di pembuluh darah. Reseptor $\alpha 1$ terhubung dengan protein Gq yang mengaktifkan kontraksi otot melalui jalur transduksi sinyal IP₃ (inositol 1,4,5-trisfat) yang dihasilkan dari aktivitas fosfolipase C. IP₃ berikatan dengan reseptor pada retikulum sarkoplasma dan menyebabkan dilepaskannya ion kalsium ke dalam sitoplasma (Webb 2003).

Hasil percobaan menunjukkan bahwa baik ekstrak maupun fraksi daun binahong dapat merelaksasi cincin aorta yang berkontraksi akibat pemberian norepinefrin. Efek vasodilatasi kuat dimiliki oleh ekstrak atau fraksi bila terjadi relaksasi otot >50% (Victório *et al.* 2009, Badyal *et al.* 2003). Efek relaksasi otot pada ekstrak lebih kuat daripada fraksi. Hal ini terlihat dari nilai persen relaksasi ekstrak yang lebih besar daripada fraksi (Tabel 1).

Tabel 1. Pengaruh pemberian ekstrak etanol atau fraksi daun binahong pada cincin aorta yang diinduksi dengan norepinefrin.

Perlakuan	% relaksasi	Waktu (menit)
Norepinefrin 2,9 x 10 ⁻³ mM	0,0 ± 0,0	52,9 ± 3,0
Terazosin 1,41 µg/mL	100 ± 0,0	15,3 ± 1,1*
Ekstrak etanol 1,57 mg/mL	60,9 ± 1,4	24,2 ± 0,7*
Fraksi n-heksana 0,004 mg/mL	39,2 ± 3,8	39,3 ± 1,9*
Fraksi etil asetat 0,03 mg/mL	48,2 ± 3,8	32,1 ± 6,3*
Fraksi air 0,64 mg/mL	52,5 ± 4,7	33,6 ± 4,9*

* = berbeda bermakna terhadap perlakuan norepinefrin, n=3

Berdasarkan parameter waktu, dapat dilihat bahwa baik ekstrak maupun fraksi dapat mengantagonis kontraksi akibat norepinefrin sehingga waktu yang diperlukan untuk kembali ke

kondisi awal (relaksasi 100%) lebih pendek. Hasil pengujian ini sejalan dengan penelitian Sukandar (2016). Hasil pengujian secara statistik menunjukkan bahwa nilai persen relaksasi aorta yang diberi terazosin, ekstrak atau fraksi berbeda bermakna terhadap aorta yang diberi norepinefrin saja. Efek relaksasi ini dapat terjadi karena inhibisi pada reseptor adrenergik, inhibisi masuknya ion kalsium melalui *voltage-operated Ca²⁺ channels*, atau akibat pengaruh vasodilator endogen seperti senyawa NO.

Selanjutnya, dilakukan pengujian mekanisme vasodilatasi lainnya yaitu keterlibatan senyawa NO atau EDRF (*Endothelium-derived relaxing factor*) (Loscalzo 2013) pada relaksasi cincin aorta. Untuk mengetahui hal tersebut, digunakan metilen biru yang berperan sebagai inhibitor enzim guanilat siklase. Pada kondisi normal, keberadaan NO akan menstimulasi enzim guanilat siklase untuk menghasilkan cGMP yang selanjutnya akan mengaktifkan PKG yang menghambat influks kalsium melalui *voltage-operated Ca²⁺ channels* atau pengeluaran kalsium yang diperantarai IP₃ sehingga terjadi relaksasi otot (Zhao *et al.* 2015).

Hasil percobaan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol maupun fraksi daun binahong menunjukkan vasodilatasi yang lemah. Berdasarkan parameter waktu, dapat dilihat bahwa pemberian ekstrak etanol maupun fraksi tidak mempercepat kembalinya cincin aorta ke kondisi awal (Tabel 2).

Tabel 2. Pengaruh pemberian ekstrak etanol atau fraksi daun binahong pada cincin aorta yang diinduksi dengan norepinefrin dengan pretreatment metilen biru.

Perlakuan	% relaksasi	Waktu (menit)
Norepinefrin - metilen biru	0,0 ± 0,0	23,8 ± 1,4
Ekstrak etanol 1,57 mg/mL	21,4 ± 4,1	26,9 ± 4,0
Fraksi n-heksana 0,004 mg/mL	30,7 ± 4,5	25,1 ± 2,1
Fraksi etil asetat 0,03 mg/mL	21,6 ± 3,1	33,4 ± 4,8
Fraksi air 0,64 mg/mL	23,8 ± 5,1	34,9 ± 4,0

Hal ini menunjukkan adanya pengaruh NO pada relaksasi akibat pemberian ekstrak atau fraksi. Pengujian *in vivo* pada tikus menunjukkan bahwa pemberian ekstrak dan fraksi air dapat meningkatkan kadar NO pada serum tikus (Garmana 2017). Pada fraksi etil asetat, pengujian *in vivo* tidak menunjukkan peningkatan kadar NO yang signifikan. Hal ini mungkin disebabkan oleh terbentuknya senyawa yang tidak aktif akibat metabolisme di dalam tubuh tikus sehingga peningkatan kadar NO akibat pemberian fraksi etil asetat tidak signifikan.

Untuk mengkaji mekanisme lebih lanjut dari relaksasi aorta tersebut, dilakukan pengujian dengan menggunakan KCl sebagai induktor kontraksi cincin aorta. Pemberian KCl dapat mengaktifkan kanal kalsium yang bergantung pada potensial (*voltage-operated Ca²⁺ channels*) sehingga menyebabkan influks ion kalsium ke dalam sel otot (Xue *et al.* 2011). Hasil penelitian menunjukkan hanya nifedipin yang mempunyai efek vasodilator kuat, sedangkan ekstrak dan fraksi daun binahong memberikan efek lebih lemah (Tabel 3).

Tabel 3. Pengaruh pemberian ekstrak etanol atau fraksi daun binahong pada cincin aorta yang diinduksi dengan KCl.

Perlakuan	% relaksasi	Waktu (menit)
KCl 80 mM	0,0 ± 0,0	11,9 ± 0,8
Nifedipin 7,05 µg/mL	59,0 ± 6,1	5,8 ± 0,6*
Ekstrak etanol 1,57 mg/mL	42,2 ± 6,7	10,1 ± 0,6
Fraksi n-heksana 0,004 mg/mL	20,4 ± 3,8	13,0 ± 1,4
Fraksi etil asetat 0,03 mg/mL	49,1 ± 2,4	10,5 ± 0,8
Fraksi air 0,64 mg/mL	35,8 ± 0,9	14,1 ± 2,0

* = berbeda bermakna terhadap perlakuan KCl, n=3

Berdasarkan parameter waktu, dapat dilihat bahwa hanya nifedipin yang mempercepat kembalinya cincin aorta ke kondisi awal secara signifikan. Pada EEDB dan fraksi etil asetat daun binahong, waktu relaksasi menurun namun tidak signifikan, sedangkan pada fraksi n-heksana dan fraksi air daun binahong waktu relaksasi

meningkat. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol dan ketiga fraksi daun binahong, tidak bekerja dengan menghambat kanal kalsium. Berdasarkan parameter persen relaksasi, dapat dilihat bahwa EEDB dan fraksi etil asetat daun binahong memiliki persen relaksasi berturut-turut sebesar 42,2 dan 49,1 %, yang menunjukkan bahwa EEDB dan fraksi etil asetat memiliki efek penghambatan *voltage-operated Ca²⁺ channels* yang lemah. Efek tersebut dapat disebabkan oleh kandungan senyawa apigenin di dalam ekstrak etanol daun binahong atau fraksi etil asetat. Apigenin dapat menurunkan waktu relaksasi pada aorta kelinci yang diinduksi oleh KCl (Sukandar *et al.* 2016, Ko *et al.* 1991).

Hasil penelitian Lin (1997) menunjukkan bahwa EEDB dapat menurunkan kontraksi otot gastrik yang diinduksi oleh serotonin, prostaglandin, dan bradikinin tetapi tidak dapat menurunkan kontraksi otot gastrik yang diinduksi oleh barium klorida, kalium klorida, dan karbakol. Hasil penelitian Sukandar (2016) juga menunjukkan bahwa EEDB tidak memiliki efek penghambatan kanal kalsium. Pada penelitian tersebut, parameter yang digunakan untuk menilai efek hanya waktu relaksasi; tidak ditentukan nilai persen relaksasi.

Pengujian Efek Inhibisi ACE secara *In Vitro*

Salah satu mekanisme yang berperan dalam mengatasi hipertensi pada tikus yang diinduksi deksametason adalah inhibisi ACE. Pemberian deksametason pada tikus dapat menyebabkan peningkatan PRA (*plasma renin activity*) dan pembentukan angiotensinogen. Renin akan mengubah angiotensinogen menjadi angiotensin I yang selanjutnya diubah menjadi angiotensin II oleh ACE. Dengan demikian, pemberian suatu senyawa ACEI dapat mengatasi hipertensi yang diinduksi deksametason (Safaeian *et al.* 2015, Olatunji and Soladoye 2008).

Konsentrasi sampel yang dapat memberikan hambatan terhadap aktivitas enzim sebesar 50% disebut *inhibition concentration* 50 atau disingkat IC₅₀. Nilai ini dapat digunakan untuk memperkirakan potensi inhibisi suatu senyawa. Hasil pengujian aktivitas inhibisi ACE dapat dilihat pada Tabel 4. Nilai IC₅₀ EEDB, fraksi n-heksana,

fraksi etil asetat, dan fraksi air berturut-turut adalah 20,76; 198,13; 115,77; dan 88,41 µg/mL sedangkan IC₅₀ kaptopril adalah 1,63 µg/mL. Dengan demikian, potensi inhibisi terhadap ACE kaptopril > EEDB > fraksi air > fraksi etil asetat > fraksi n-heksana.

Tabel 4. Persen inhibisi ACE ekstrak etanol dan fraksi daun binahong.

Zat uji	Konsentrasi (µg/mL)	% Inhibisi ACE	IC ₅₀ (µg/mL)
Kaptopril	1	46,86 ± 2,27	1,63
	5	59,45 ± 1,39	
	10	62,65 ± 2,67	
	50	79,61 ± 3,93	
	100	88,16 ± 2,96	
Ekstrak etanol daun binahong	6,25	26,72 ± 1,53	20,76
	12,5	36,45 ± 1,78	
	25	56,91 ± 3,82	
	50	66,58 ± 2,56	
	100	72,01 ± 4,67	
Fraksi n-heksana	25	7,67 ± 3,22	198,13
	50	20,01 ± 8,27	
	100	26,40 ± 2,00	
	200	50,33 ± 7,10	
	6,25	3,99 ± 1,28	
Fraksi etil asetat	12,5	10,26 ± 2,06	115,77
	25	37,40 ± 4,52	
	50	39,10 ± 2,56	
	100	48,94 ± 3,39	
	200	53,35 ± 3,89	
Fraksi air	6,25	30,11 ± 4,85	88,41
	12,5	33,33 ± 1,90	
	25	37,91 ± 8,41	
	50	43,85 ± 2,56	
	100	51,82 ± 8,08	

Efek ekstrak tanaman dalam menghambat ACE diperkirakan akibat keberadaan senyawa flavonoid yang dapat membentuk kompleks khelat pada sisi aktif ACE (Guerrero *et al.* 2012, Loizzo *et al.* 2007). Williams *et al.* (1997) menunjukkan bahwa komponen yang memiliki aktivitas inhibisi ACE paling aktif terdapat pada ekstrak atau fraksi polar dan sangat polar (Barbosa-Filho *et al.* 2006, Williams *et al.* 1997). Keberadaan beberapa gugus fungsional yang dapat berperan sebagai donor

atau akseptor ikatan hidrogen, seperti gugus hidroksil dan karboksil, nampaknya meningkatkan potensi inhibisi ACE. Di sisi lain, keberadaan gugus metoksi akan menurunkan kemampuan inhibisinya (Shukor *et al.* 2013).

Hasil penelitian Guerrero *et al.* (2012) menunjukkan kekuatan relatif dari beberapa flavonoid yang memiliki efek inhibisi ACE. Nilai IC_{50} apigenin K dan rhoifolin (apigenin 7-O-glikosida) berturut-turut 196 dan 183 μ M. Hasil penelitian Shimada (2014) menunjukkan bahwa asam ursolat memiliki IC_{50} sebesar 3,05 mM. Nilai IC_{50} ini lebih besar dibandingkan apigenin (2,93 mM) dan asam rosmarinat (1,67 mM).

Berdasarkan aktivitas inhibisi ACE, suatu senyawa dinyatakan mempunyai aktivitas lemah, sedang, dan kuat jika memiliki persen inhibisi berturut-turut 30-50%, >50-80%, dan >80%. Senyawa yang memiliki persen inhibisi <30% pada konsentrasi 100 μ g/ml dinyatakan tidak aktif (Martins *et al.* 2013). Dengan demikian, ekstrak etanol daun binahong merupakan inhibitor ACE sedang, fraksi etil asetat dan fraksi air merupakan inhibitor lemah sedangkan fraksi n-heksana tidak memiliki aktivitas inhibisi ACE. Walaupun aktivitas inhibisi ekstrak dan fraksi daun binahong tidak memiliki potensi seperti obat antihipertensi, tetapi Guerrero *et al.* (2012) menyatakan bahwa sampel uji yang memiliki aktivitas inhibisi ACE sedang dapat dipertimbangkan sebagai makanan fungsional (*naturally functional foods*) atau suplemen makanan.

Kesimpulan

Ekstrak etanol daun binahong memiliki efek vasodilatasi melalui jalur NO, inhibisi kanal kalsium (lemah), dan inhibisi ACE (sedang). Fraksi n-heksana tidak menunjukkan efek inhibisi kanal kalsium dan inhibisi ACE, tetapi menunjukkan efek vasodilatasi melalui jalur NO. Fraksi etil asetat menunjukkan efek vasodilatasi melalui jalur NO, inhibisi kanal kalsium (lemah), serta inhibisi ACE (lemah). Fraksi air menunjukkan efek vasodilatasi melalui jalur NO serta inhibisi ACE (lemah), tetapi tidak menunjukkan efek inhibisi kanal kalsium.

Daftar Pustaka

- Amalia L, 2008, Kajian antihipertensi ekstrak etanol umbi lapis kucai (*Allium schoenoprasum* L.), Disertasi Doktor, Sekolah Farmasi ITB, Bandung.
- Badyal DK, Dadhich AP, Lata H, 2003, Animal models of hypertension and effect of drugs, *Indian J Pharmacol* 35(6): 349-362.
- Barbosa-Filho JM, Martins VKM, Rabelo LA, Moura MD, Silva MS, Cunha EVL, Souza MFV, Almeida RN, Medeiros IA, 2006, Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980 – 2000, *Rev bras farmacogn* 16(3): 421-446.
- Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC (eds), 2011, Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, 12th edn, The McGraw-Hill Companies, Inc., New York.
- Cohen BJ, 2003, Medical terminology: An illustrated guide, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Disi SSA, Anwar MA, Eid AH, 2015, Anti-hypertensive herbs and their mechanisms of action: Part I, *Front Pharmacol* 6: 323.
- Garmana AN, 2017, Kajian mekanisme kerja binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) v. Steenis) sebagai antihipertensi, Disertasi Doktor, Sekolah Farmasi ITB, Bandung.
- Garmana AN, Sukandar EY, Fidrianny I, 2016, Preliminary study of blood pressure lowering effect of *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) on Wistar rats, *Int J Pharmacog Phytochem Res* 8(2): 300-304.
- Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, Garcia-Vallvé S, Arola L, Pujadas G, Mugerza B, 2012, Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: Structure-activity relationship studies, *PLoS One* 7(11): 1-11.
- Hassan HM, Eldin IMT, Ahmed EM, Mohamed AEH, Sirag N, 2013, Effects of methanolic extract of yohimbe bark (*Pausinystalia yohimbe*) on isolated rabbit aortic strip and rat uterus, *Health* 5(6):1016-1020.

- Iwalokun BA, Hodonu SA, Nwoke S, Ojo O, Agomo PU, 2011, Evaluation of the possible mechanisms of antihypertensive activity of *Loranthus micranthus*: An African mistletoe, *Biochem Res Int*: 1-9.
- Jamhari, Yusiati LM, Suryanto E, Cahyanto MN, Erwanto Y, Muguruma M, 2013, Comparative study on angiotensin converting enzyme inhibitory activity of hydrolysate of meat protein of Indonesian local livestock, *J Indonesian Trop Anim Agric* 38(1): 27-33.
- Ko FN, Huang TF, Teng CM, 1991, Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta, *Biochim Biophys Acta* 1115(1): 69-74.
- Lin WC, Wu SC, Kuo SC, 1997, Inhibitory effects of ethanolic extracts of *Boussingaultia gracilis* on the spasmogen-induced contractions of the rat isolated gastric fundus, *J Ethnopharmacol* 56: 89-93.
- Loizzo MR, Said A, Tundis R, Rashed K, Statti GA, Hufner A, Menichini F, 2007, Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae), *Phytother Res* 21(1): 32-36.
- Loscalzo J, 2013, The identification of nitric oxide as endothelium-derived relaxing factor, *Circ Res* 113(2): 100-103.
- Loscalzo J, Libby P, Epstein JA, 2015, Basic biology of the cardiovascular system, In: Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscalzo J (eds), *Harrison's principles of internal medicine*, McGraw-Hill Education, New York, 265e-4.
- Mao S, Li C, 2015, Hypotensive and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of *Eisenia fetida* extract in spontaneously hypertensive rats, *J Evid Based Complementary Altern Med*: 1-7.
- Martins MLL, Pacheco HP, Perini IG, Lenz D, Andrade TU, Endringer DC, 2013, In vivo hypotensive effect and in vitro inhibitory activity of some Cyperaceae species, *Braz J Pharm Sci* 49(4): 803-809.
- Muthia R, Suganda AG, Sukandar EY, 2017, Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of several Indonesian medicinal plants, *Res J Pharm Biol Chem Sci* 8(1S): 192-199.
- Olatunji LA, Soladoye AO, 2008, Oral contraceptive-induced high blood pressure is prevented by renin-angiotensin suppression in female rats but not by sympathetic nervous system blockade, *Indian J Exp Biol* 46: 749-754.
- Ong SL, Zhang Y, Whitworth JA, 2009, Mechanisms of dexamethasone-induced hypertension, *Curr Hypertens Rev* 5: 61-74.
- Prasanna R, Nandhini B, Praveesh BV, Angayarkanni J, Palaniswamy M, 2012, Novel angiotensin converting enzyme inhibitor from *Aspergillus* sp. by solid state fermentation, *Int J Pharm Pharm Sci* 4(4): 371-377.
- Safaeian L, Ghasemi-Dehkordi N, Javanmard SH, Namvar H, 2015, Antihypertensive and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract obtained from aerial parts of *Otostegia persica* (Burm.) Boiss., *Res Pharm Sci* 10(3):192-199.
- Shimada A, Inagaki M, 2014, Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of ursolic acid isolated from *Thymus vulgaris*, L., *Food Sci Technol Res* 20(3): 711-714.
- Shukor N, Van Camp J, Gonzales GB, Staljanssens D, Struijs K, Zotti MJ, Raes K, Smagghe G, 2013, Angiotensin-converting enzyme inhibitory effects by plant phenolic compounds: A study of structure activity relationships, *J Agric Food Chem* 61(48): 11832-11839.
- Sukandar EY, Ridwan A, Sukmawan YP, 2016, Vasodilatation effect of ethanolic extract of *Anredera cordifolia*, *Sonchus arvensis* L., and ursolic acid on isolated rabbit aortic and frog heart, *Int J Pharm Pharm Sci* 8(2): 145-149.
- Tortora GJ, Derrickson B, 2012, *Principles of anatomy and physiology*, 13th edn, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Victório CP, Kuster RM, Moura RS, Lage CL, 2009, Vasodilator activity of extracts of field *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum and *A. zerumbet*

(Pers.) Burt et Smith cultured *in vitro*, Braz J Pharm Sci 45(3): 507-514.

Webb RC, 2003, Smooth muscle contraction and relaxation, Adv Physiol Educ 27(4): 201-206.

WebMD, 2008, Webster's New World™ Medical Dictionary, Wiley Publishing, Inc., Hoboken.

WHO, 2012, World health statistics 2012, WHO Press, Geneva.

Williams LAD, Gossell-Williams M, Barton EN, Fleischhacker R, 1997, Angiotensin converting enzyme inhibiting and anti-dipsogenic activities of *Euphorbia hirta* extracts, Phytother Res 11: 401-402.

Woode E, Amisshah F, Agyapong G, Ainooson GK, 2013, Myorelaxant effect of an alcoholic extract of *Sphenocentrum jollyanum* roots in rabbit aortic strip and corpus cavernosum, Pharmacologia 4(5): 371-382.

Xue YL, Shi HX, Murad F, Bian K, 2011, Vasodilatory effects of cinnamaldehyde and its mechanism of action in the rat aorta, Vasc Health Risk Manag 7:273-280.

Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW, 2015, Vascular nitric oxide: Beyond eNOS, J Pharmacol Sci 129 (2): 83-94.