

**KAJIAN AKTIVITAS DAN SENYAWA AKTIF
DAUN TEMPUYUNG (*SONCHUS ARVENSIS* (LINN.))
SEBAGAI ANTIHIPERTENSI**

DISERTASI

**Karya tulis sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Doktor dari
Institut Teknologi Bandung**

**Oleh
SURYANI
NIM: 30716304
(Program Studi Doktor Farmasi)**



**INSTITUT TEKNOLOGI BANDUNG
Juni 2021**

ABSTRAK

KAJIAN AKTIVITAS DAN SENYAWA AKTIF DAUN TEMPUYUNG (*Sonchus arvensis* (Linn.)) SEBAGAI ANTIHIPERTENSI

Oleh
SURYANI
NIM: 30716304
(Program Studi Doktor Farmasi)

Tempuyung dengan nama latin *Sonchus arvensis* (Linn.) telah digunakan secara empiris untuk menurunkan tekanan darah dan memiliki efek diuretik sebagai salah satu mekanisme obat antihipertensi. Tujuan dari penelitian ini adalah menelaah kandungan senyawa bioaktif daun tempuyung yang berperan menghasilkan aktivitas farmakologi dalam mengatur regulasi tekanan darah dan mengkaji potensi daun tempuyung sebagai antihipertensi melalui penelusuran beberapa mekanisme kerja, diantaranya antioksidan, *beta*-bloker, *angiotensin converting enzyme* (ACE) *inhibitor* dan *angiotensin II receptor blocker* (ARB) yang dilakukan secara *in vivo*, *in vitro*, dan *ex vivo*.

Telaah kandungan senyawa bioaktif daun tempuyung dimulai dengan ekstraksi daun menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Rendemen ekstrak daun tempuyung (EESA) 7,79%. Fraksinasi terhadap EESA dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat sehingga menghasilkan fraksi n-heksana (FHSA), fraksi etil asetat (FESA), dan fraksi air (FASA) dengan rendemen berturut-turut adalah 42,74, 8,72 dan 28,01%. Hasil penapisan fitokimia dan kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan ketiga pelarut dapat memisahkan senyawa dalam EESA berdasarkan kepolaran, salah satunya adalah keberadaan senyawa flavonoid. FESA dan FASA mengandung flavonoid sedangkan FHSA tidak terdeteksi adanya flavonoid. Hasil analisis KLT dan KCKT menunjukkan kandungan senyawa flavonoid dalam daun tempuyung yang tersari dalam EESA dan FESA diantaranya adalah luteolin, luteolin-7-O-glikosida, apigenin, apigenin-7-O-glikosida, kemferol, rutin dan kuersetin karena memiliki bercak pada KLT dan waktu retensi pada KCKT yang sama dengan standar. Luteolin merupakan salah satu kandungan flavonoid di dalam tempuyung yang terdeteksi dalam EESA yaitu sebesar $6,44 \pm 0,61$ µg/mg. Kadar flavonoid total pada EESA $26,08 \pm 3,03$ µg/mg ekstrak dan FESA $36,49 \pm 2,08$ µg/mg fraksi dihitung sebagai kesetaraan dengan luteolin.

Aktivitas antioksidan dilakukan melalui peredaman radikal 2,2-Difenil-1-1-Pikril Hidrasil (DPPH). EESA memiliki aktivitas antioksidan yang rendah dengan nilai $IC_{50} > 250$ µg/mL. FESA ($IC_{50} = 226,77 \pm 6,91$ µg/mL) memiliki aktivitas

antioksidan yang lebih besar dibandingkan EESA. FASA memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah ($IC_{50} = 971,34 \pm 12,33 \mu\text{g/mL}$) dan FHSA ($IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) tidak menunjukkan adanya aktivitas antioksidan. FESA memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi lainnya walaupun lebih rendah secara bermakna terhadap vitamin C.

Uji aktivitas ACE inhibitor dinyatakan dengan kemampuan menghambat pembentukan asam hipurat sebagai hasil hidrolisis substrat hipuril-histidil-leusin (HHL) oleh ACE. Hasil menunjukkan pada konsentrasi $100 \mu\text{g/mL}$ EESA menghambat ACE sebesar $66,19 \pm 1,98 \%$, sedangkan FASA $28,62 \pm 13,95 \%$, FHSA $69,36 \pm 0,60 \%$ dan FESA $78,59 \pm 7,01 \%$. Komponen fitokimia di dalam FESA memiliki aktivitas lebih kuat sebagai ACE inhibitor dan terbukti pada subfraksi FESA (SF) nomor 4-9 memiliki aktivitas ACE inhibitor di atas 50% pada konsentrasi $50 \mu\text{g/mL}$. Hasil KLT menunjukkan SF nomor 4-9 memiliki kandungan luteolin, apigenin, kuersetin dan kemferol.

Pengujian aktivitas daun tempuyung sebagai beta-bloker dilakukan pada tikus Wistar jantan dengan metode hipertensi akut yang diinduksi epinefrin dilanjutkan dengan uji aktivitas relaksasi pada otot jantung kodok yang diinduksi norepinefrin dan analisis inhibitor jalur pensinyalan *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) pada sel HEK 269 *overekspresi* β reseptor terhadap fosforilasi *Extracellular signal Regulated Kinase* (ERK1/2) yang diinduksi isoproterenol. EESA dosis 100 mg/kg bb mampu menghambat epinefrin $0,25 \text{ mg/kg}$ bb dalam menaikkan tekanan darah secara bermakna ($p < 0,05$) dan dosis tersebut dijadikan dasar penentuan dosis uji pada fraksi. FESA 16 mg/kg bb menunjukkan aktivitas antihipertensi yang bermakna dan setara dengan obat standar yaitu atenolol $4,5 \text{ mg/kg}$ bb ($p < 0,05$), dengan daya inhibisi terhadap kenaikan tekanan darah sistolik dan diastolik sebesar 58,56 dan 68,24%. Kontraksi otot jantung kodok yang telah diinduksi norepinefrin menurun dengan pemberian FESA $0,9 \text{ mg/mL}$ (27,7%). Peningkatan tekanan darah dapat ditekan karena kandungan senyawa dalam FESA dapat menghambat stimulasi adrenalin mengaktifasi β reseptor, sehingga kenaikan kontraksi otot jantung dapat dicegah. Hal tersebut dapat terjadi karena kandungan senyawa dalam EESA yang tersari dalam FESA yaitu luteolin, apigenin dan kuersetin berpotensi sebagai antagonis reseptor β dengan menghambat beta agonis (isoproterenol) mengaktifasi fosforilasi ERK1/2 pada jalur pensinyalan MAPK yang berperan dalam proses kontraksi dan pergerakan sel.

Aktivitas daun tempuyung sebagai *angiotensin II receptor blocker* (ARB) dilakukan secara *in vitro* melalui analisis mekanisme seluler pada sel CHO-AT1r dan sel otot polos vaskular (VSMC) A7R5 dengan induktor angiotensin II (Ang II). Ang II menstimulasi jalur pensinyalan MAPK melalui fosforilasi ERK1/2 yang berperan dalam kontraksi dan pertumbuhan sel meliputi proliferasi, diferensiasi, dan migrasi sel. EESA $100 \mu\text{g/mL}$ menghambat fosforilasi ERK1/2 secara bermakna ($p < 0,01$) dan FESA $100 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan aktivitas lebih tinggi yang setara dengan olmesartan. Kandungan senyawa dalam daun tempuyung yaitu luteolin, apigenin, kemferol dan rutin ($5-40 \mu\text{g/mL}$) mampu menghambat fosforilasi ERK1/2. Inhibisi jalur pensinyalan MAPK oleh daun tempuyung terjadi karena luteolin, apigenin, kemferol dan rutin menghambat fosforilasi protein tirosin

kinase setelah Ang II berikatan dengan AT1r, selain itu luteolin mampu menghambat Ang II dalam menginduksi internalisasi reseptor AT1r ke sitoplasma. Aktivitas tersebut ditunjukkan melalui posisi reseptor AT1r yang tetap pada permukaan membran sel berdasarkan hasil analisis mikroskopis imunofluoresensi. Analisis *upstream signal* pada sitoplasma menunjukkan bahwa penghambatan fosforilasi ERK1/2 akan menyebabkan berkurangnya translokasi ke dalam nukleus. Hal tersebut dikonfirmasi dengan hasil analisis *downstream signal* berupa rendahnya ekspresi faktor transkripsi CREB dan c-fos secara bermakna ($p < 0,01$).

Penghambatan jalur pensinyalan MAPK dapat menurunkan ekspresi faktor transkripsi sehingga dapat mengendalikan pertumbuhan dan pergerakan sel. Luteolin (5-10 $\mu\text{g/mL}$), apigenin (20 $\mu\text{g/mL}$) dan kemferol (20 $\mu\text{g/mL}$) terbukti menghambat Ang II dalam menstimulasi proliferasi dan kecepatan migrasi sel VSMC secara bermakna ($p < 0,01$). Luteolin mampu menekan ekspresi CREB dan c-fos mencapai 3x lipat yang ditunjukkan dengan berkurangnya proliferasi sel (59,85%) dan kecepatan migrasi sel VSMC (82,58%). Apigenin dan kemferol menunjukkan aktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan luteolin. Proliferasi dan migrasi sel otot polos vaskular yang terkendali dapat mencegah remodeling vaskular yang dapat memicu kenaikan tekanan darah.

Hasil pengujian menunjukkan FESA memiliki aktivitas antioksidan, ACE inhibitor, antagonis reseptor β dan ARB lebih kuat secara bermakna dibandingkan dengan FASA dan FHSA. FESA memiliki kandungan flavonoid tertinggi sehingga flavonoid berpotensi sebagai senyawa yang berperan dalam efek farmakologi yang dihasilkan. Luteolin, apigenin dan kemferol yang tersari di dalam EESA dan terpisahkan dalam FESA adalah senyawa bioaktif di dalam SA yang memiliki efek farmakologi sebagai antihipertensi. Luteolin adalah senyawa biomarker dalam SA dan memiliki aktivitas tertinggi dibandingkan kandungan senyawa flavonoid lainnya yang terkandung dalam SA.

Informasi yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini adalah kandungan senyawa fitokompleks yang dimiliki oleh suatu tanaman menjadikan daun tempuyung memiliki potensi sebagai antihipertensi dengan berbagai mekanisme kerja diantaranya antioksidan, ACE inhibitor, beta-bloker dan *angiotensin II receptor blocker* (ARB). Fraksi etil asetat adalah fraksi terpilih yang dapat dikembangkan menjadi suatu obat herbal terstandar untuk membantu terapi hipertensi yang berasal dari daun tempuyung karena mengandung senyawa bioaktif sebagai antihipertensi dengan aktivitas terbaik dalam uji farmakologi yang telah dilakukan.

Kata kunci : ACE inhibitor, ARB, beta-bloker, luteolin, hipertensi, tempuyung

ABSTRACT

STUDY OF ACTIVITY AND ACTIVE COMPOUNDS IN TEMPUYUNG (*Sonchus arvensis* (Linn.)) LEAVES AS ANTIHYPERTENSIVE AGENT

By

SURYANI

Student ID : 30716304

(Doctoral Program in Pharmacy)

Tempuyung (Sonchus arvensis Linn.) has been used empirically to lower blood pressure and have a diuretic effect. Diuretic is one of the action mechanisms of antihypertensive drugs. The purpose of this study was to examine the pharmacological activity of the bioactive compounds of tempuyung leaves as an antihypertensive agent. The study was carried out through several mechanisms such as antioxidants, β -blockers, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, and angiotensin receptor blockers (ARB) conducted in vitro, in vivo, and ex vivo study.

The investigation was started by tempuyung leaves extraction using maceration methods with ethanol 96% as a solvent. The yield of tempuyung leaves extract was 7.79%. Fractionation of tempuyung leaves extract was performed by liquid-liquid extraction method using n-hexane, ethyl acetate, and water, respectively. Aqueous fraction, ethyl acetate fraction, and n-hexane fraction were obtained from this method with the yield of 28.01, 8.72, and 42.74%, respectively. Phytochemical screening and thin-layer chromatography (TLC) screening revealed that all three solvents could separate compounds in tempuyung leaves extract based on polarity; one of them was the presence of flavonoid. Aqueous fraction and ethyl acetate fraction showed the presence of flavonoids, but not detected on n-hexane fraction. The TLC and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis were demonstrated that the flavonoid compounds found in extract and ethyl acetate fraction were luteolin, luteolin-7-O-glycosides, apigenin, apigenin-7-O-glycosides, kaempferol, rutin, and quercetin. The concentration of luteolin as the primary component in tempuyung leaves was $6.44 \pm 0.61 \mu\text{g/mg}$. Total flavonoid content in tempuyung leaves extract, and ethyl acetate fraction was $26.08 \pm 3.03 \mu\text{g/mg}$ and $36.49 \pm 2.08 \mu\text{g/mg}$, respectively, they counted as equality with luteolin.

The antioxidant activity in tempuyung leaves extracts and their three fractions was measured with the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. The examination of antioxidant activity of aqueous fraction and ethyl acetate fraction showed the values varied from 971.34 ± 12.33 to $226.77 \pm 6.91 \mu\text{g/mL}$. In comparison, the tempuyung leaves extract ($\text{IC}_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$) and n-hexane fraction ($\text{IC}_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) were the lowest and the highest antioxidant activity

compared to other fractions in this study. Ethyl acetate fraction has greater antioxidant activity than other fractions although it is significantly lower for vitamin C.

The ACE inhibition activity of the extract and fractions was evaluated as the liberation of hippuric acid (HA) from hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL). The study revealed that tempuyung leaves (100 $\mu\text{g/mL}$) inhibited ACE by $66.19 \pm 1.98\%$, while aqueous fraction by $28.62 \pm 13.95\%$, n-hexane fraction by $69.36 \pm 0.60\%$, and ethyl acetate fraction by $78.59 \pm 7.01\%$. The ethyl acetate subfractions (50 $\mu\text{g/mL}$) showed that subfraction numbers 4-9 had an ACE inhibitor activity of more than 50%. TLC analysis demonstrated that these subfractions had luteolin, apigenin, quercetin, and kaempferol content.

Tempuyung leaves activity as a β receptor antagonist was conducted in male Wistar rats using epinephrine-induced acute hypertension method followed by a relaxation activity test on the heart muscle of norepinephrine-induced frogs. Moreover, Mitogen signaling pathway inhibitors Activated Protein Kinase (MAPK) in HEK 269 cells overexpression β receptors was also analyzed against isoproterenol-induced Extracellular signal Regulated Kinase (ERK) phosphorylation. Tempuyung leaves extract (100 mg /kg BW) was able to inhibit epinephrine 0.25 mg/kg BW in raising blood pressure ($p < 0.05$). Ethyl acetate fraction (16 mg/kg BW) exhibited antihypertensive activity ($p < 0.05$), with systolic and diastolic blood pressure inhibition of 58.56 and 68.24%. Contraction of frog heart muscles induced by norepinephrine decreased with the administration of ethyl acetate fraction (27.7%). Bioactive compounds (luteolin, apigenin and quercetin) in ethyl acetate fraction might suppress blood pressure because of β receptor activation through adrenalin stimulation and prevent the increase in heart muscle contractions. Thus, these bioactive compounds might be potential as β receptor antagonists by inhibiting the phosphorylation of ERK1/2 of MAPK signaling pathways which plays a role in contraction process and cell movement.

In vitro activity of bioactive compounds of tempuyung leaves as an ARB was performed by a cellular mechanism in CHO-AT1r cells and vascular smooth muscle cells (VSMC) A7R5 with angiotensin II inductors (Ang II). Ang II stimulates MAPK signaling pathways through ERK1/2 phosphorylation, which plays a role in cell contraction, proliferation, differentiation, and cell migration. Tempuyung leaves extract (100 $\mu\text{g/mL}$) significantly inhibited ERK1/2 phosphorylation ($p < 0.01$) while ethyl acetate fraction 100 $\mu\text{g/mL}$ exhibited higher activity than tempuyung leaves extract and equivalent to olmesartan. Luteolin, apigenin, kaempferol, and rutin (5-40 $\mu\text{g/mL}$) found in tempuyung leaves could inhibit phosphorylation ERK1/2. Inhibition of MAPK signaling pathways occurs because luteolin, apigenin, kaempferol, and rutin can inhibit phosphorylation tyrosine kinase protein, and luteolin inhibit Ang II-induced the internalization of AT1r receptors into the cytoplasm. Microscopic immunofluorescence analysis revealed that AT1r receptors found on the surface of cell membranes indicated the mechanism of action of bioactive compounds of tempuyung leaves. Upstream signal analysis of the

cytoplasm suggested that inhibition of ERK1/2 phosphorylation reduced its translocation into the nucleus. Moreover, the downstream signal analysis demonstrated this by expressing the CREB transcription factor and low c-fos ($p < 0.01$). Inhibition of MAPK signaling pathways decreased transcription factors' expression, resulting in reduced cell growth and migration. Luteolin (5-10 $\mu\text{g/mL}$), apigenin (20 $\mu\text{g/mL}$), and kaempferol (20 $\mu\text{g/mL}$) was found to inhibit Ang II, thus significantly reducing the proliferation and migration rate of VSMC cells ($p < 0.01$). Luteolin suppressed CREB and c-fos expression up to 3-fold by reducing cell proliferation (59.85%) and VSMC cell migration (82.58%). Apigenin and kaempferol showed lower activity compared to luteolin. Control of proliferation and migration of vascular smooth muscle cells can prevent vascular remodeling. The rise in blood pressure can be triggered by vascular remodeling.

Ethyl acetate fraction had significant antioxidant activity, ACE inhibitors, β receptor antagonist, and angiotensin II receptor antagonist compared to aqueous fraction and n-hexane fraction. The highest flavonoid content in the ethyl acetate fraction might contribute to the pharmacological effects produced by this fraction. Luteolin, apigenin, and kaempferol found in ethyl acetate fraction revealed to have pharmacological effects as antihypertensives. Luteolin is a biomarker compound in tempuyung leaves and has the highest activity compared to other flavonoid compounds in tempuyung leaves.

The information that can be provided from this study is the complex phytochemical content contained in a plant makes tempuyung leaves has the potential as an antihypertensive with more than one of mechanisms of action including antioxidants, ACE inhibitors, β -blocker, and ARB. Ethyl acetate fraction is the selected fraction that can be developed into an herbal medicine to help hypertension therapy derived from tempuyung leaves because it contains bioactive compounds as antihypertensives which produce the best activity in the pharmacological tests.

Keywords: ACE inhibitor, ARB, beta-blocker, hypertension, luteolin, tempuyung.

**KAJIAN AKTIVITAS DAN SENYAWA AKTIF
DAUN TEMPUYUNG (*Sonchus arvensis* (Linn.))
SEBAGAI ANTIHIPERTENSI**

Oleh
SURYANI
NIM: 30716304
(Program Studi Doktor Farmasi)

Institut Teknologi Bandung

Menyetujui
Tim Pembimbing

Tanggal 28 Juni 2021

Ketua

(Prof. Dr. apt. Elin Yulinah Sukandar)

Anggota

(Dr. apt. Neng Fisher Kurniati, M.Si)

Anggota

(Dr. apt. Muhamad Insanu, M.Si)