

**UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULATOR FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK  
ETANOL KELOPAK BUNGA ROSELLA  
(*Hibiscus sabdariffa* L.) TERHADAP PROLIFERASI SEL LIMFOSIT MENCIT  
GALUR SWISS SECARA *IN VITRO* BESERTA IDENTIFIKASI KANDUNGAN  
SENYAWA KIMIANYA**

**Nirmalasari<sup>1)</sup>, Maria Ulfah<sup>1)</sup>, Ediati Sasmito<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup> Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

<sup>2)</sup> Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada Yogyakarta

---

---

**INTISARI**

Agen imunostimulator berperan penting dalam pengobatan penyakit infeksi akibat patogen. Kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai minuman kesehatan untuk meningkatkan sistem imun tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunostimulator fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella terhadap proliferasi sel limfosit mencit galur swiss beserta identifikasi kandungan senyawa kimianya.

Ekstraksi kelopak bunga rosella dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian dilanjutkan fraksinasi secara bertingkat dengan menggunakan *n*-heksana dan etil asetat. Fraksi etil asetat dibuat dengan konsentrasi 10, 20, 50, 100, 200, 400 µg/mL dan kontrol positif PHA 10 µg/mL untuk diujikan terhadap kultur sel limfosit. Uji aktivitas imunostimulator menggunakan metode *MTT Assay*. Aktivitas proliferasi sel limfosit dianalisis secara statistik terhadap nilai *Optical Density* (OD) dari *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) reader menggunakan *Kruskal Wallis Test* dilanjutkan *Mann Whitney Test* ( $p < 0,05$ ). Identifikasi kandungan senyawa fenolik dan flavonoid dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas proliferasi sel limfosit pada konsentrasi 50, 100, 200, dan 400 µg/mL. Fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella mengandung senyawa fenolik dan flavonoid.

**Kata kunci : kelopak bunga rosella, fraksi etil asetat, MTT Assay, imunostimulator**

**ABSTRACT**

Immunostimulatory agent has an important role in the treatment of infectious disease caused by pathogen. Roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.) used by community as a health drink to enhance body's immune system. The aims of this research was to know immunostimulatory activity of ethyl acetate fraction of ethanolic extract of roselle calyx on lymphocyte cell proliferation swiss strain mice and to identified the chemical compounds of the fraction.

Roselle calyx was extracted by maceration method using ethanol 96% as a solvent. The ethanolic extract was partitioned gradually by *n*-hexan and ethyl acetate. Series of ethyl acetate fraction were made to concentration 10, 20, 50, 100, 200, 400 µg/mL and positive control PHA 10 µg/mL for tested to lymphocyte cell culture. Immunostimulatory activity test was done according to *MTT Assay* method. Lymphocyte proliferation activity was analyzed statistically to the value of *Optical Density* (OD) result of the *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) reader using *Kruskal Wallis Test* continued by *Mann Whitney Test* ( $p < 0,05$ ). Identification of the contents phenolic compounds and flavonoids performed by *Thin Layer Chromatography* (TLC).

The result of the research showed that ethyl acetate fraction had lymphocyte cell proliferation activity at the concentration of 50, 100, 200, and 400 µg/mL. The ethyl acetate fraction of roselle calyx contained phenolic compounds and flavonoids.

**Key words : roselle calyx, ethyl acetate fraction, MTT Assay, immunostimulatory**



## PENDAHULUAN

Kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) secara tradisional dapat digunakan sebagai obat dan dapat dimanfaatkan sebagai produk makanan dan minuman (Ismail *et al.*, 2008). Mahadevan *et al.* (2009) menyatakan bahwa kelopak bunga rosella mengandung beberapa senyawa fenolik dan flavonoid. Senyawa fenolik dan flavonoid merupakan senyawa yang dapat digunakan sebagai imunostimulator, hal tersebut telah dikemukakan oleh Chiang *et al.* (2003).

Penelitian mengenai aktivitas imunomodulator kelopak bunga rosella telah dilakukan oleh Fakeye *et al.* (2008), menggunakan metode *Haemagglutination test* secara *in vivo*. Fakeye *et al.*, juga melakukan pengukuran terhadap konsentrasi *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) sebagai sitokin pro inflamasi dan Interleukin-10 (IL-10) sebagai sitokin anti inflamasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelopak bunga rosella mampu meningkatkan sistem imun. Hal itu terjadi akibat adanya peningkatan produksi IL-10 sehingga mampu menekan produksi TNF- $\alpha$  dan berpengaruh terhadap sel limfosit B untuk menghasilkan antibodi.

Penelitian ini berbeda dengan yang dilakukan oleh Fakeye *et al.* (2008) yaitu untuk mengetahui mekanisme aksi aktivitas imunostimulator fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella terhadap proliferasi sel limfosit secara keseluruhan dengan metode MTT *Assay*, sehingga dapat memberikan tambahan bukti secara ilmiah mengenai manfaat tumbuhan rosella terhadap sistem imun.

## METODE PENELITIAN

### Bahan Penelitian

Simplisia kelopak bunga rosella kering etanol 96%, *n*-heksana, etil asetat, air (Brataco), *Silica gel* 60 F<sub>254</sub>, metanol, asam formiat, butanol, asam asetat, ferri chloride, uap amoniak, asam galat (Merck), kuersetin (Sigma), organ limpa dari mencit jantan galur swiss berumur 2 bulan, etanol 70% (Merck), *Medium Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco), RPMI 1640 media komplet berisi *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% (v/v) (Caisson), *Phosfat Buffer Saline* (PBS) (Gibco), vaksin hepatitis B (Engerix), *Phytohemagglutinin-P* (PHA-P, Sigma), MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, Sigma), *stopper* 10% *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) (Merck), HCl (Merck) 0.01 N, penicillin-streptomycin (Gibco), fungizon/amphoterasin B (Gibco), tween 80 0,5% (Merck).

### Alat Penelitian

Seperangkat alat maserasi (Pyrex), blender (Maspion), timbangan elektrik (Ohaus), *moisture balance* 23 (Ohaus), *vacuum rotary evaporator* (Heidolph WE 2000), bejana KLT (Camag), kertas

penjenuh, pipa kapiler, alat penampak bercak, lampu UV 254 nm dan 366 nm, timbangan elektrik (Mettler Toledo), alat-alat bedah steril (Smicss), tabung mikropipet (Gibco), *ependorf tube* (Extragen), sentrifugasi (Sorvall), pipet pastur (Brand), petri dish steril 50 mm (Costar), spuit injeksi 10 mL (Terumo), tabung sentrifugasi 15 mL (Nunc), *vortex* (Bio-Rad), *laminar air flow* (Nuair), *hemocytometer* (Neubauer), *inverted microscope* (Olympus), inkubator CO<sub>2</sub> 5% (Heraeus), mikroplate 96 (Costar), *microplate reader* (Bio-Rad), mikropipet (Gibson) *ependorf tube* (Extragen), *vortex* (Brandstead), *laminar air flow* (Nuair), *white tip*, *yellow tip*, *blue tip* (Brand).

## Jalannya Penelitian

### 1. Identifikasi Kelopak Bunga Rosella

Identifikasi kelopak bunga rosella dilakukan untuk mengetahui identitas dari simplisia yang akan digunakan sebelum penelitian berlangsung. Identifikasi simplisia dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Obat dan Obat Tradisional (B<sub>2</sub>P<sub>2</sub>TO<sub>2</sub>T), Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

### 2. Pembuatan Serbuk Simplisia Kelopak Bunga Rosella

Kelopak bunga rosella kering diukur kadar airnya dengan *moisture balance*, kemudian sebanyak 1 kg simplisia diserbukkan sampai halus dengan blender atau alat penyerbuk, kemudian diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh.

### 3. Ekstraksi Kelopak Bunga Rosella

Serbuk simplisia sebanyak 502 gram diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan 4,5 L cairan penyari etanol 96% yang dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama 3,375 L etanol digunakan untuk maserasi awal dibiarkan selama tiga hari dalam bejana tertutup dengan pengadukan sehari minimal 2 kali dan kemudian disaring sehingga didapat filtrat I. Setelah tiga hari ampas diperas, ampas ditambah etanol sebanyak 1,125 L, diaduk dan dibiarkan dalam bejana tertutup selama dua hari. Ampas dan endapan dipisah dari filtratnya dengan kertas saring, filtrat I dan II dicampur dan dienaptungkan selama dua hari untuk selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental

kemudian dihitung rendemennya dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

## Berat simplisia

### 4. Fraksinasi Etil Asetat Kelopak Bunga Rosella

Ekstrak kental kelopak bunga rosella sebanyak 40,13 gram dilarutkan ke dalam air:etanol (9:1) sebanyak 150 mL. Selanjutnya dipartisi secara bertingkat dengan menggunakan corong pisah menggunakan pelarut *n*-heksana dilanjutkan etil asetat. Jumlah pelarut yang digunakan untuk fraksinasi sebanding dengan jumlah air yang ditambahkan ke dalam ekstrak etanol (perbandingan 1:1). Proses fraksinasi berakhir pada saat pelarut etil asetat yang berada pada lapisan atas berubah menjadi jernih. Fraksi etil asetat yang diperoleh kemudian ditampung dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu tidak lebih dari 50°C kemudian fraksi etil asetat kental yang diperoleh siap untuk diuji aktivitas imunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit.

### 5. Uji Aktivitas Imunostimulator

Uji aktivitas imunostimulator, meliputi :

#### a. Preparasi Sampel Uji Fraksi Etil Asetat

Sampel uji fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella dibuat larutan stok dengan konsentrasi 5 mg/mL dengan pelarut 0,5% tween 80 dan RPMI. Kemudian dibuat pengenceran dengan empat seri konsentrasi yaitu 10, 20, 50, 100, 200 dan 400 µg/mL.

#### b. Preparasi Kontrol Positif PHA

Larutan stok PHA dengan konsentrasi 1 mg/mL digunakan sebagai kontrol positif, kemudian dibuat sampel uji dengan konsentrasi 10 µg/mL dalam *phosphat buffer saline*.

#### c. Isolasi dan Kultur Sel Limfosit

Jaringan limpa diisolasi secara aseptis dari mencit galur swiss dan diletakkan dalam petri dish berdiameter 50 mm yang berisi 10 mL medium RPMI. Media RPMI dipompakan ke dalamnya sehingga limfosit ikut keluar bersama media. Suspensi sel dimasukkan dalam tabung sentrifugasi 10 mL dan disentrifus pada 3000 rpm 4°C selama 5 menit. Pellet yang didapat disuspensikan dalam 5 mL buffer tris ammonium klorida untuk melisis eritrosit. Sel dicampur hingga homogen dan didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit atau sampai warnanya berubah menjadi agak kekuningan. Kemudian tambahkan RPMI ad 10 mL, disentrifugasi pada 3000 rpm 4°C selama 5 menit, supernatan dibuang. Pelet yang didapat dicuci 2 kali dengan RPMI. Sel dihitung dengan

hemositometer. Selanjutnya sel limfosit siap untuk dikultur (Hay and Westwood, 2002).

### d. Uji Proliferasi Sel Limfosit dengan Metode MTT Assay

Sel limfosit ( $1,5 \times 10^6$  sel/mL) sebanyak 100 µL didistribusikan ke dalam sumuran mikroplate 96-wells dan ditambahkan vaksin hepatitis B sebanyak 10 µL tiap sumuran, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C, setelah inkubasi 24 jam fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella masing-masing konsentrasi 10, 20, 50, 100, 200, 400 µg/mL dan PHA sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 10 µg/mL ditambahkan sebanyak 100 µL. Semua perlakuan tersebut diinkubasi lagi selama 48 jam. Setelah inkubasi 48 jam, masing-masing sumuran ditambahkan larutan 10 µL MTT 5 mg/mL. Kemudian diinkubasi lagi 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambah reagen stopper yaitu larutan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10% dalam asam klorida 0,01N sebanyak 100 µL pada tiap sumuran dan didiamkan sampai 24 jam. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan mikroplat *reader* pada panjang gelombang 550 nm (Hay and Westwood, 2002).

### 6. Identifikasi Kandungan Kimia dengan KLT

Identifikasi kandungan kimia menggunakan KLT dilakukan dengan cara menjenuhkan bejana kromatografi terlebih dahulu dengan fase gerak. Sampel uji dan baku pembanding ditotolkan pada lempeng KLT dengan jarak 1 cm dari dasar lempeng, kemudian dielusi dengan fase gerak sampai batas atas pengembangan, diambil, dikeringkan, diamati baik secara visibel maupun pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya dideteksi dengan penampak bercak dan dihitung masing-masing harga *R<sub>f</sub>*-nya.

#### Analisis hasil

Data yang didapat dari hasil pembacaan ELISA *reader* berupa absorbansi atau *Optical Density* (OD). Nilai OD dianalisis dengan statistik non parametrik *Kruskal Wallis Test* dilanjutkan *Mann Whitney Test*. Analisis hasil identifikasi golongan senyawa aktif dari sampel uji dilakukan dengan cara membandingkan warna bercak yang ditimbulkan setelah elusi dengan yang terdapat pada literatur dan dibandingkan bercak senyawa uji dengan bercak senyawa standar.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Identifikasi Tumbuhan dan Pembuatan

#### Sampel Uji

Berdasarkan surat keterangan hasil determinasi dari B<sub>2</sub>P<sub>2</sub>TO<sub>2</sub>T membuktikan bahwa tumbuhan yang digunakan adalah rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). Pengukuran kadar air simplisia adalah sebesar 4,08%. Secara umum kadar air simplisia tanaman obat adalah 10% (Gunawan *and* Mulyani, 2004). Serbuk yang dihasilkan sebesar 752,12 gram dari 1 kg simplisia. Hasil ekstraksi diperoleh ekstrak kental sebanyak 68,21 gram dari 502 gram serbuk simplisia dengan

rendemen hasil yang diperoleh sebesar 13,59%. Secara makroskopis ekstrak etanol yang dihasilkan berwarna merah darah dan berbau asam. Fraksi etil asetat yang diperoleh setelah proses penguapan adalah 13,68 gram dari ekstrak kental sebesar 40,13 gram.

### B. Uji Aktivitas Immunostimulator Terhadap Proliferasi Sel Limfosit

Nilai OD yang dihasilkan menunjukkan besarnya aktivitas proliferasi sel limfosit dapat dilihat pada Tabel I.

**Tabel I.** Nilai OD hasil pembacaan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm terhadap proliferasi sel limfosit mencit galur swiss

Replikasi	OD							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	0,357	0,383	0,374	0,386	0,412	0,600	0,585	0,637
2	0,313	0,330	0,369	0,346	0,367	0,403	0,591	0,826
3	0,318	0,327	0,319	0,335	0,443	0,398	0,425	0,778
4	0,310	0,321	0,333	0,339	0,369	0,401	0,554	0,768
Rata-rata	0,324	0,340	0,349	0,351	0,398*	0,450*	0,539*	0,725*
SD	0,022	0,029	0,027	0,023	0,037	0,100	0,077	0,040

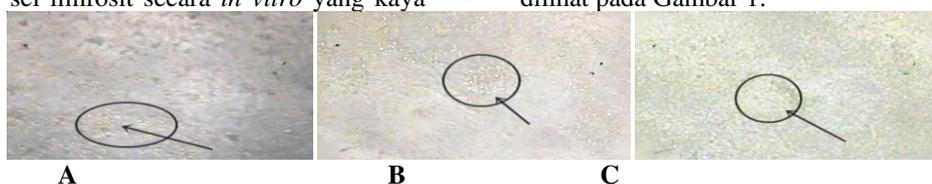
Keterangan:

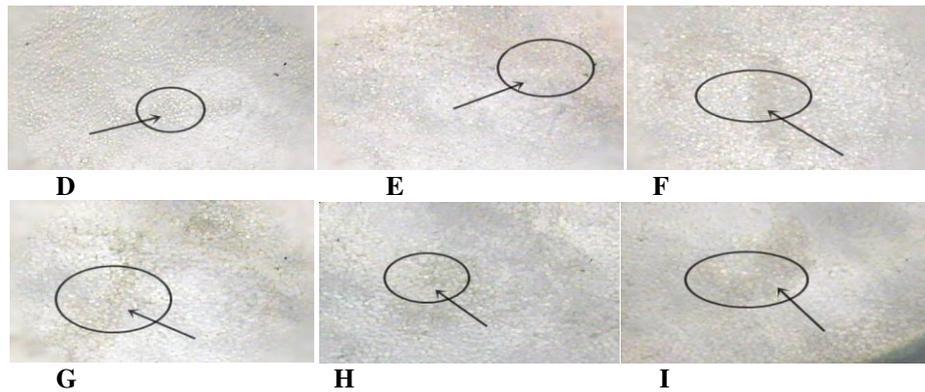
- (A) Kelompok kontrol negatif : sel limfosit dengan vaksin
  - (B) Kelompok kontrol positif : phytohemagglutinin konsentrasi 10 µg/mL
  - (C) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 10 µg/mL
  - (D) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 20 µg/mL
  - (E) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 50 µg/mL
  - (F) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 100 µg/mL
  - (G) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 200 µg/mL
  - (H) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 400 µg/mL
- \* = berbeda bermakna dengan kontrol negatif, p<0,05

Berdasarkan data nilai OD pada Tabel I. menunjukkan bahwa pada pemberian sampel uji memberikan hasil peningkatan aktivitas proliferasi sel limfosit jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang berbeda bermakna (p<0,05). Perbedaan bermakna proliferasi sel limfosit terlihat pada kelompok kontrol negatif terhadap kelompok sampel uji pada konsentrasi 50, 100, 200 dan 400 µg/mL.

Pengamatan aktivitas immunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit pada penelitian ini dilakukan selama 48 jam. Hal ini berkaitan dengan nutrisi yang menjadi asupan sel limfosit selama proses pengkulturan. RPMI 1640 merupakan media untuk kultur sel limfosit secara *in vitro* yang kaya

akan garam-garam organik, asam amino, vitamin, glukosa (Yang *and* Xiong, 2012). MacIver *et al.* (2008) menyatakan bahwa glukosa memiliki peranan penting dalam menyediakan energi untuk kerja sel limfosit. Penggunaan glukosa yang terbatas pada sel limfosit selama lebih dari 48 jam menyebabkan sel limfosit tidak bisa melakukan proliferasi secara baik, sehingga berdampak besar terhadap kelangsungan hidup sel limfosit. Jika pengamatan aktivitas immunostimulator dilakukan lebih dari 48 jam, dikhawatirkan sel limfosit banyak yang mati atau berproliferasi dengan tidak maksimal. Perbedaan Proliferasi sel limfosit mencit galur swiss secara *in vitro* setelah 48 jam dapat dilihat pada Gambar 1.





**Gambar 1.** Perbedaan proliferasi sel limfosit mencit galur swiss secara *in vitro* setelah 48 jam

Keterangan:

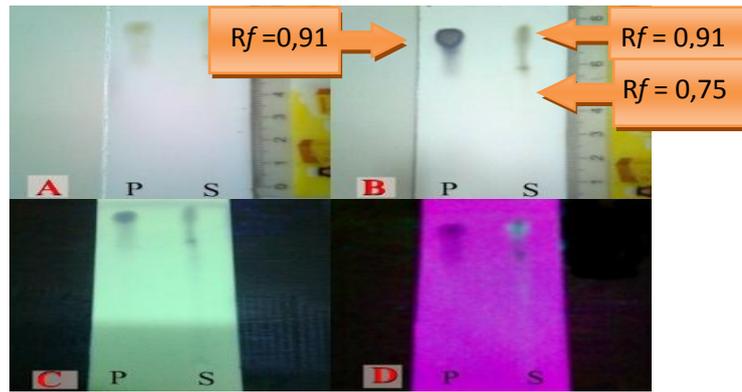
- (A) Kelompok kontrol sel limfosit
  - (B) Kelompok kontrol negatif : sel limfosit dengan vaksin
  - (C) Kelompok kontrol positif : phytohemagglutinin konsentrasi 10 µg/mL
  - (D) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 10 µg/mL
  - (E) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 20 µg/mL
  - (F) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 50 µg/mL
  - (G) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 100 µg/mL
  - (H) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 200 µg/mL
  - (I) Kelompok fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella konsentrasi 400 µg/mL
- : proliferasi sel limfosit

Sel limfosit yang diambil dari organ limpa hewan uji pada penelitian ini belum mendapatkan suatu paparan dari antigen, karena mencit dikorbkan secara langsung tanpa perlakuan apapun. Hal tersebut menggambarkan bahwa sel limfosit yang akan digunakan untuk pengkulturan belum memiliki suatu respon imun. Vaksin hepatitis B merupakan suatu mitogen yang diberikan terlebih dahulu untuk menimbulkan terjadinya respon imun terhadap sel limfosit tersebut. Berdasarkan Gambar 1., terlihat pada pemberian vaksin hepatitis B (Gambar 1.B) sel limfosit mengalami perbanyakkan jumlah dibanding dengan kelompok kontrol sel limfosit (Gambar 1.A). Hal tersebut menunjukkan bahwa respon imun telah timbul akibat pemberian vaksin hepatitis B pada sel limfosit. Suatu senyawa dikatakan sebagai imunostimulator, jika senyawa tersebut mampu meningkatkan respon imun yang telah terbentuk sebelumnya akibat adanya paparan dari suatu antigen. Proliferasi sel limfosit juga terlihat pada pemberian phytohemagglutinin dengan konsentrasi 10 µg/mL (Gambar 1.C), begitu juga dengan pemberian fraksi etil asetat dengan konsentrasi 10, 20, 50, 100, 200 dan 400 µg/mL. Makin tinggi pemberian konsentrasi fraksi etil asetat aktivitas proliferasi sel limfosit semakin meningkat, hal itu ditunjukkan dengan jumlah sel limfosit yang banyak, cenderung bergerombol dan rapat (Gambar 1. D-I).

Mekanisme terjadinya proliferasi sel limfosit secara umum, yaitu ketika suatu antigen berikatan dengan permukaan sel T dan sel B, bersama dengan interleukin-1 (IL-1) dari *Antigen Presenting Cell* (APC) dapat mengaktifasi G-protein yang kemudian memproduksi fosfolipase C. Enzim ini menghidrolisis fosfatidil inositol bifosfat (PIP<sub>2</sub>) menjadi diasil gliserol (DAG) dan inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>). Reaksi tersebut berlangsung dalam membran plasma. DAG mengaktifasi secara langsung protein kinase C dengan cara memfosforilasi residu asam amino (serin atau treonin) pada sel target. IP<sub>3</sub> kemudian menstimulasi pelepasan Ca<sup>2+</sup> ke dalam sitoplasma sehingga konsentrasi Ca<sup>2+</sup> meningkat. Peningkatan Ca<sup>2+</sup> ini berperan penting dalam menstimulasi kerja enzim protein kinase C dan 5-lipoxygenase. Protein kinase C menstimulasi produksi interleukin-2 (IL-2), IL-2 ini kemudian mengaktifasi proliferasi sel limfosit (Roitt, 1997).

### C. Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia

Identifikasi senyawa fenolik menggunakan penampak bercak FeCl<sub>3</sub>, yang akan menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat (Harborne, 1987). Perubahan warna yang terjadi dikarenakan adanya gugus hidroksi pada inti aromatis yang bisa berikatan dengan Fe. Kromatogram identifikasi senyawa fenolik sampel uji dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Kromatogram identifikasi senyawa fenolik

Keterangan :

A. Pengamatan secara visibel sebelum disemprot  $\text{FeCl}_3$

B. Pengamatan secara visibel setelah disemprot  $\text{FeCl}_3$

C. Pengamatan pada sinar UV 254 nm

D. Pengamatan pada sinar UV 366 nm

Fase Diam : *Silica gel 60 F<sub>254</sub>* p.a

Fase Gerak : Metanol:asam formiat 10% (95:5)

Penampak Bercak:  $\text{FeCl}_3$

Pembanding (P) : Asam galat

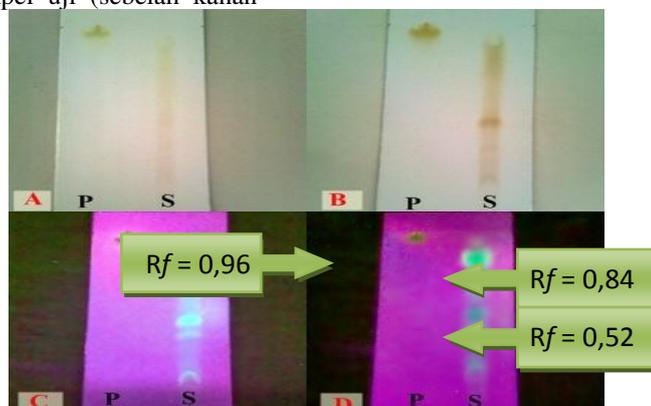
Sampel uji (S) : Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella

Berdasarkan Gambar 2., pada pengamatan secara visibel sebelum disemprot menggunakan  $\text{FeCl}_3$  bercak pembanding maupun sampel uji berwarna coklat muda. Bercak berwarna ungu timbul pada pembanding dan berwarna abu-abu pada sampel uji setelah disemprot menggunakan  $\text{FeCl}_3$ . Hal ini menunjukkan bahwa sampel uji mengandung senyawa fenolik. Bercak sampel uji di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm menghasilkan dua bercak berwarna hitam dengan lempeng *silica gel* yang berfluoresensi.

Hasil pengamatan terhadap kromatogram (Gambar 2.B), sampel uji memiliki  $R_f$  sebesar 0,75 dan 0,91. Hal ini menunjukkan bahwa sampel uji mengandung senyawa fenolik dengan kepolaran yang berbeda. Bercak sampel uji (sebelah kanan

Gambar 2.B) teratas memiliki kesejajaran dengan bercak pembanding (sebelah kiri Gambar 2.B) yang memiliki harga  $R_f$  sebesar 0,91. Hal ini terjadi kemungkinan dari senyawa yang terkandung dalam sampel uji memiliki kepolaran yang sama dengan asam galat.

Identifikasi KLT pada senyawa flavonoid menggunakan pembanding kuersetin dengan tujuan untuk menegaskan adanya senyawa flavonoid dalam sampel uji, serta dapat membandingkan perbedaan golongan flavonoid antara pembanding dan sampel uji. Penampak bercak yang digunakan adalah uap amoniak. Kromatogram identifikasi senyawa flavonoid sampel uji dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Kromatogram identifikasi senyawa flavonoid

Keterangan :

A. Pengamatan visibel sebelum diuapi amoniak

- B. Pengamatan secara visibel setelah diuapi amoniak  
 C. Pengamatan pada sinar UV 366 nm sebelum diuapi amoniak  
 D. Pengamatan pada sinar UV 366 nm setelah diuapi amoniak  
 Fase Diam : *Silica gel 60 F<sub>254</sub>* p.a  
 Fase Gerak : Butanol:Asam Asetat:Air (7:1:2)  
 Penampak Bercak: Uap Amoniak  
 Pembanding (P) : Kuersetin  
 Sampel uji (S) : Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella

Pengamatan kromatogram dilakukan di bawah sinar UV 366 nm sebelum dan sesudah diuapi amoniak dan secara visibel. Bercak kuersetin dan sampel uji terlihat berwarna coklat kekuningan (Gambar 3.A), kemudian berubah menjadi lebih coklat setelah diuapi amoniak (Gambar 3.B). Hal ini menunjukkan bahwa sampel uji positif mengandung senyawa flavonoid. Kuersetin termasuk dalam flavonoid golongan flavonol. Sebelum diuapi amoniak bercak terlihat berfluoresensi hijau-kekuningan di bawah sinar UV 366 nm, namun terjadi perubahan fluoresensi warna sedikit (Gambar 3.C) atau tanpa perubahan (Markham, 1988). Bercak kuersetin tidak terlalu terlihat jelas sebelum diuapi amoniak karena kemungkinan bercak yang terbentuk terlalu tebal. Bercak sampel terlihat berfluoresensi biru muda di bawah sinar UV 366 nm sebelum diuapi amoniak, kemudian terjadi perubahan fluoresensi menjadi warna kuning-kehijauan setelah diuapi amoniak (Gambar 3.D).

Sampel uji mengandung flavonoid golongan flavon (Markham, 1988). Fraksi etil asetat kelopak bunga rosella mengandung glikosida flavonoid golongan flavon yang diduga memiliki gugus hidroksi pada posisi 5, 7 dan 4' telah dinyatakan oleh Mlati *et al.*, (2007). Kromatogram sampel uji menunjukkan *R<sub>f</sub>* sebesar 0,52 dan 0,84. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat kelopak bunga rosella mengandung flavonoid dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Kuersetin sebagai pembanding memiliki *R<sub>f</sub>* sebesar 0,96. Sampel uji mengandung senyawa flavonoid dan diperkirakan bukanlah kuersetin. Hasil KLT membuktikan bahwa sampel uji mengandung senyawa fenolik dan flavonoid yang diduga memiliki efek imunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit.

## KESIMPULAN

1. Fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella memiliki aktivitas terhadap proliferasi sel limfosit mencit galur swiss secara *in vitro* terlihat pada konsentrasi 50, 100, 200 dan 400 µg/mL
2. Fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella mengandung senyawa fenolik dan flavonoid.

## DAFTAR PUSTAKA

- Chiang, L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., and Lin, C.C, 2003, Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *plantago species*, *Planta Medica*, **69**, 600-604.
- Fakeye, T.O., Pal, A., Bawankule, D.U., and Khanuja, S.P.S, 2008, Immunomodulatory Effect of Extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (Family Malvaceae) in a Mouse Model, *Phytother. Res.* **22**, 664-668.
- Gunawan, D., dan Mulyani, S., 2004, *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)*, Jilid I, Cetakan I, Penebar Swadaya, 12-13, Jakarta.
- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia (Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan)*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Cetakan ke-2, 8, 49-50-51, 92, ITB, Bandung.
- Hay, F.C, and Westwood, O.M.R., 2002, *Practical Immunology*, Fourth Edition, 185, 309, Blackwell Publishing Company, United Kingdom.
- Ismail, A., Ikram, E.H.K., and Nazri, H.S.M., 2008, Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Seeds- Nutritional Composition, Protein Quality and Health Benefit, *Invited Review Food*, **2(1)**,1-16.
- Maclver, N.J., Jacobs, S.R., Wieman, H.L., Wofford, J.A., Coloff, J.L., and Rathmell, J.C., 2008, Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival, *Journal of Leukocyte Biology*, **84**, 949-957.
- Mahadevan, N., Shivali, and Kamboj, P., 2009, *Hibiscus sabdariffa* Linn.- An Overview, *Review Paper Natural Product Radiance*, **8(1)**, 77-78.
- Markham, K. R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh Kosasih

- Padmawinata dan Iwang Soediro, 3, 20, 47, ITB, Bandung.
- Mlati, I., Kusmardiyani, S., dan Nawawi, A., 2007, *Isolasi Flavonoid dari Fraksi Etil Asetat Kaliks Rosell (Hibiscus sabdariffa L.)*, Sekolah Farmasi ITB, Bandung, diakses pada <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id> tanggal 28 September 2011.
- Roitt, I.M., 1997, *Roitt's Essential Immunology*, Ninth Edition, 169, University Collage London Medical School, London.
- Yang, Z., and Xiong, H.R., 2012, Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells, in Nelli, L.C., and Matteoli, (Eds.) , *Biomedical Tissue Culture*, 11, Intech Publisher, Open Access Company.