

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

Oktarina Heni Puspitowati¹⁾, Maria Ulfah¹⁾, Ediati Sasmito²⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

²⁾ Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

INTISARI

Kelopak bunga rosella telah banyak digunakan sebagai obat tradisional secara turun temurun. Kandungan fenol dan flavonoid di dalam kelopak bunga rosella diduga mempunyai efek imunostimulator. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunostimulator secara *in vitro* dan mengidentifikasi adanya senyawa fenol dan flavonoid yang terkandung dalam fraksi air dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.).

Serbuk kelopak bunga rosella dimaserasi dengan pelarut etanol 96%, kemudian ekstrak kental difraksinasi secara bertingkat menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air. Uji aktivitas imunostimulator menggunakan metode MTT Assay dengan seri konsentrasi fraksi uji 10, 20, 50, 100, 200, 400 µg/mL dan kontrol positif PHA 10 µg/mL terhadap kultur sel limfosit. Data berupa *Optical Density* (OD) dianalisis secara statistik dengan *Oneway ANOVA* dilanjutkan uji *Tukey* ($p < 0,05$). Identifikasi senyawa fenol dan flavonoid di dalam kelopak bunga rosella dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa fraksi uji mempunyai aktivitas imunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit pada konsentrasi 400 µg/mL yang berbeda bermakna dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol sel ($p < 0,05$). Hasil uji KLT menunjukkan bahwa fraksi uji mengandung fenol dan flavonoid.

Kata kunci : kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), MTT Assay, imunostimulator, fenol dan flavonoid

ABSTRACT

Roselle calyx has been used as traditional medicine for generations. The content of phenols and flavonoids in the roselle calyx thought to have immunostimulatory effects. This study aims to determine the immunostimulatory activity *in vitro* and to identified phenolic and flavonoids compounds in the water fraction of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyx ethanol extract.

Powder of roselle calyx macerated with 96% ethanol. The extract were obtained partitioned gradually with n-hexana, ethyl acetate, and water. Immunostimulatory activity test was done according to MTT Assay with series of water fraction at concentration 10, 20, 50, 100, 200, 400 µg/mL and positive control PHA 10 µg/ml against to lymphocyte cell culture. Optical Density (OD) data was statistically analyzed by *Oneway ANOVA* followed *Tukey* test ($p < 0.05$). Identification of phenolic and flavonoids compounds in roselle calyx done by Thin Layer Chromatography (TLC).

The results of statistical analysis showed that water fraction have immunostimulatory activity against lymphocyte proliferation at a concentration of 400 µg/mL were significantly different compared to the positive control and the cells control ($p < 0.05$). TLC test results showed that the fraction contained phenols and flavonoids.

Key words : roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyx, MTT Assay, immunostimulatory, phenolic and flavonoid.

PENDAHULUAN

Sistem imun adalah sistem yang melindungi tubuh dari serangan berbagai zat asing seperti bakteri, virus, parasit dan jamur. Mikroba yang masuk ke dalam tubuh akan merusak jaringan tubuh dengan menghasilkan toksin dan juga dapat mempengaruhi fungsi sistem imun dengan menghambat fungsi fagositik sehingga mengakibatkan terjadinya penurunan fungsi sistem imun (Wahab dan Julia, 2002). Untuk meningkatkan respon imun tubuh yang disebabkan oleh infeksi mikroba dapat menggunakan imunostimulator (Baratawidjaja, 2002). Pemanfaatan obat-obat herbal sebagai imunostimulator semakin banyak dikembangkan. Senyawa-senyawa kimia yang dapat meningkatkan aktivitas sistem imun seperti senyawa fenolik, alkaloid, dan terpen sangat membantu untuk mengatasi penurunan sistem imun dan senyawa-senyawa kimia tersebut dapat diperoleh dari tumbuhan (Kumar *et al.*, 2011).

Tumbuhan rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) merupakan salah satu tumbuhan yang telah dimanfaatkan dalam mengatasi berbagai penyakit dan masalah kesehatan di berbagai negara (Mardiah *et al.*, 2009). Kelopak bunga rosella telah digunakan sebagai pengobatan tradisional dalam mengatasi mual, memperlancar buang air besar, mengurangi nafsu makan, gangguan pernafasan yang disebabkan oleh flu, dan rasa tidak enak di perut (Suganda *et al.*, 2010).

Skrining fitokimia yang dilakukan oleh Pratiwi *et al.* (2011) menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% kelopak bunga rosella mengandung senyawa golongan flavonoid, saponin dan alkaloid. Kandungan fenol dan flavonoid di dalam kelopak bunga rosella diduga memiliki efek imunostimulator, hal ini diperkuat dengan penelitian yang dilakukan oleh Chiang *et al.* (2003) bahwa senyawa flavonoid dan senyawa fenolik dari tumbuhan *Plantago major* memiliki efek imunomodulator. Penelitian yang dilakukan oleh Maghraby *et al.* (2010) menyebutkan bahwa senyawa flavonoid pada *Pulicaria crispa* mempunyai efek imunostimulator. Glikosida fenol dan glikosida flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar yang dapat tersari oleh pelarut polar seperti air (Markham, 1988; Marston and Hostettmann, 2006), sehingga diharapkan fenol dan flavonoid dapat tersari dalam fraksi air.

Penelitian tentang aktivitas imunostimulator kelopak bunga rosella pernah dilakukan oleh Fakeye *et al.* (2008) menggunakan metode *Haemagglutination test* untuk melihat efek sistem imun yang dinilai dari peningkatan IL-10 sebagai antiinflamasi. Hasil menunjukkan bahwa kelopak bunga rosella mempunyai efek pada sistem imun yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif yaitu Levamisol.

Uji aktivitas imunostimulator fraksi air dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella pada penelitian ini, menggunakan metode *MTT Assay* untuk melihat efek pada sistem imun berupa peningkatan proliferasi sel limfosit yaitu proses perbanyakan sel limfosit melalui pembelahan sel sebagai penanda adanya fase aktivasi dari respon imun tubuh. Penelitian tentang uji aktivitas imunostimulator fraksi air dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella terhadap proliferasi sel limfosit mencit jantan galur Swiss secara *in vitro* beserta identifikasi kandungan kimianya perlu dilakukan dengan harapan dapat menambah informasi dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fakeye *et al.* (2008) berkaitan dengan mekanisme aktivitas imunostimulator yang berbeda.

METODOLOGI PENELITIAN

A. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu simplisia kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), etanol 96% (Brataco), air, n-heksan, dan etil asetat berderajat teknis (Brataco), organ limpa dari mencit jantan galur Swiss berumur 2 bulan (LPPT UGM), etanol 70% (Merck), Medium *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco), media komplit berisi RPMI 1640, FBS (*Fetal Bovine Serum*) 10% (v/v) (Caisson), PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (Gibco), vaksin hepatitis B (Engerix®), PHA (*phytohemagglutinin*) (Gibco), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma), stopper 10% SDS (*sodium dodecyl sulphate*) (Merck), HCl (Merck) 0.01 N, penicillin-streptomycin (Gibco), dan fungizon/amphoteterisin B (Gibco), Tween 80 0,5% (Merck), silika gel 60 GF₂₅₄ (Merck), metanol:asam formiat 10% (94:6), FeCl₃ (Merck), asam galat (Merck), butanol:asam asetat:aquabidestilata (3:1:6), uap ammonia (Merck), dan kuercetin (Sigma).

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah seperangkat alat maserasi (Pyrex), blender (Maspion), timbangan elektrik (Ohaus), *Moisture Balance* 23 (Ohaus), *vacuum rotary evaporator* (Heidolph® WE 2000), alat-alat gelas (Pyrex), bejana KLT, kertas penjenuh, alat penampak bercak, lampu UV 254 nm dan lampu UV 366 nm, timbangan elektrik (Mettler Toledo) dengan kepekaan 0,001 g, alat-alat bedah steril (Smicss), tabung mikropipet (Gibco), *eppendorf 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), *haemocytometer* (Neubauer) *inverted microscope* (Olympus), inkubator CO₂ 5%

(Heraeus®), mikrolate 96 (Costar), ELISA reader (Bio-Rad), mikropipet (Gibson) *ependorf tube* (Extragen), *vortex* (Brandstead), *yellow tip* (Brand), *blue tip* (Brand).

B. Jalannya Penelitian

Jalannya penelitian meliputi :

1. Identifikasi Tumbuhan
Identifikasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Kecamatan Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.
2. Persiapan Pembuatan Serbuk Simplisia Kelopak Bunga Rosella
Kelopak bunga rosella segar dicuci dan dibilas dengan air bersih mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel dan semut yang berada di dalamnya, kemudian ditiriskan dan diangin-anginkan. Pengeringan dilakukan dengan pemanasan dalam oven suhu tidak lebih dari 50°C. Setelah kering, disortasi kering dan diserbukkan sampai halus dengan blender atau alat penyerbuk.
3. Pembuatan Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella
Pembuatan ekstrak pada penelitian ini dilakukan dengan menyari simplisia kelopak bunga rosella menggunakan metode maserasi. Larutan hasil maserasi dipekatkan dengan *rotary evaporator* menggunakan suhu tidak lebih dari 50°C. Proses penguapan dilakukan hingga diperoleh ekstrak kental kemudian dihitung rendemennya.
4. Pembuatan Fraksi Air Dari Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella
Sebanyak 40,13 gram ekstrak kental dilarutkan ke dalam air-etanol (9:1). Selanjutnya dipartisi secara bertingkat dengan corong pisah menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air. Jumlah pelarut yang digunakan untuk fraksinasi sebanding dengan jumlah air yang ditambahkan ke dalam ekstrak etanol (perbandingan 1:1). Fraksi air dipisahkan dari fraksi etil asetat, kemudian ditampung dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator*.
5. Uji Aktivitas Immunostimulator
 - a. Pembuatan Larutan Uji
Larutan uji dibuat dari fraksi air ekstrak etanol kelopak bunga rosella dengan membuat terlebih dahulu larutan stok konsentrasi 5 mg/ml menggunakan pelarut 0,5% tween 80. Setelah itu dibuat

pengenceran dengan enam seri konsentrasi yaitu 10, 20, 50, 100, 200, dan 400 µg/ml.

b. Isolasi Sel Limfosit

Jaringan limpa diisolasi secara aseptis dari mencit jantan galur Swiss dan diletakkan dalam petri dish berdiameter 50 mm yang berisi 10 mL medium RPMI. Media RPMI dipompakan ke dalam limpa sehingga sel 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 melisiskan eritrosit. Sel dicampur hingga homogen dan didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit atau sampai warnanya berubah menjadi agak kekuningan, kemudian ditambahkan 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 *haemocytometer*, selanjutnya sel limfosit siap untuk dikultur dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C dan diuji aktivitasnya (Hay and Westwood, 2002).

c. Uji proliferasi limfosit dengan metode MTT Assay

Sel limfosit ($1,5 \times 10^6$ /mL) sebanyak 100 µL didistribusikan ke dalam sumuran mikrolat 96 wells. Untuk sel tanpa perlakuan hanya berisi sel limfosit saja, untuk sumuran yang lain ditambahkan vaksin hepatitis B sebanyak 10µL/sumuran. Sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37°C, setelah inkubasi 24 jam ditambahkan 100 µL larutan uji dengan konsentrasi 10, 20, 50, 100, 200, 400 µg/mL dan 100 µL PHA konsentrasi 10 µg/mL sebagai kontrol positif. Setelah proses 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 biru. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambah reagen stopper yaitu larutan SDS 10% dalam asam klorida 0,01N sebanyak 100 µL pada tiap sumuran dan didiamkan sampai 24 jam. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan ELISA reader

pada panjang gelombang 550 nm (Mosmann, 1983).

6. Identifikasi Kandungan Kimia Dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi kandungan kimia menggunakan KLT dilakukan dengan cara bejana kromatografi dijenuhi terlebih dahulu dengan fase gerak. Fraksi air dan baku pembanding ditotolkan pada lempeng KLT dengan jarak 1 cm dari dasar lempeng, kemudian dielusi dengan fase gerak sampai batas atas pengembangan. Lempeng diambil, dikeringkan, diamati secara visibel, pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya dideteksi dengan penampak bercak dan dihitung masing-masing harga Rf-nya.

C. Analisis Hasil

Analisis hasil meliputi :

1. Uji Proliferasi Sel Limfosit

Data yang didapat dari hasil pembacaan ELISA reader berupa absorbansi atau *Optical Density* (OD). Nilai OD yang terbaca bersifat proposional terhadap jumlah sel yang hidup (Mosmann, 1983). Data OD larutan uji dianalisis menggunakan analisis parametrik dengan metode *One Way ANOVA*.

2. Analisis Kandungan Kimia

Analisis hasil identifikasi golongan senyawa aktif dari fraksi air ekstrak etanol kelopak bunga rosella dilakukan dengan membandingkan warna bercak yang ditimbulkan pada KLT setelah elusi dengan yang terdapat pada literatur dan dibandingkan bercak senyawa uji dengan bercak senyawa standar. Pengamatan lempeng KLT dilakukan secara visibel, di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, dan dideteksi dengan penampak bercak.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Tumbuhan

Identifikasi tumbuhan dilakukan dengan tujuan untuk memastikan kebenaran tumbuhan yang digunakan sebagai bahan penelitian sehingga tidak terjadi kesalahan dalam penggunaan bahan. Identifikasi ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Kecamatan Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Hasil identifikasi tumbuhan membuktikan bahwa tumbuhan yang akan digunakan telah sesuai yaitu kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.).

Persiapan Pembuatan Serbuk Simplisia Kelopak Bunga Rosella

Hasil penetapan kadar air kelopak bunga rosella kering yang digunakan yaitu 4,08%. Kelopak bunga rosella kering kemudian dihaluskan menjadi serbuk dengan tujuan untuk memperbesar luas permukaan, sehingga memperbesar kontak cairan penyari dengan simplisia yang akan memudahkan dan memaksimalkan penyarian (Depkes RI, 1986). Sebanyak 1 kg kelopak bunga rosella kering yang dihaluskan menghasilkan 750,23 gram serbuk kelopak bunga rosella.

Pembuatan Ekstrak Kelopak Bunga Rosella

Ekstraksi serbuk kelopak bunga rosella sebanyak 502,01 gram menghasilkan filtrat sebanyak 3795 ml. Filtrat tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* didapatkan ekstrak kental sebanyak 68,21 gram, sehingga didapatkan rendemen sebanyak 13,59%. Pemekatan ini bertujuan untuk menguapkan cairan penyari sehingga didapatkan ekstrak kental yang hanya mengandung zat aktif yang berasal dari kelopak bunga rosella. Ekstrak kental yang didapat disimpan di dalam wadah yang terlindung cahaya. Hal ini bertujuan untuk mencegah reaksi yang dikatalisis oleh cahaya matahari yang dapat merusak senyawa aktifnya.

Pembuatan Fraksi Air Dari Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella

Ekstrak etanol kental sebanyak 40,13 gram kemudian difraksinasi secara partisi cair-cair. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air, dengan tujuan untuk memisahkan komponen-komponen ke dalam pelarut dengan kepolaran yang berbeda. Fraksi n-heksan akan memisahkan zat aktif yang larut dalam pelarut non polar dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat akan memisahkan zat aktif yang larut dalam pelarut semi polar, sedangkan fraksi air akan memisahkan zat aktif yang larut dalam pelarut polar. Glikosida fenol dan glikosida flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar (Markham, 1988; Marston and Hostettmann, 2006) diharapkan dapat tersari oleh pelarut polar seperti air.

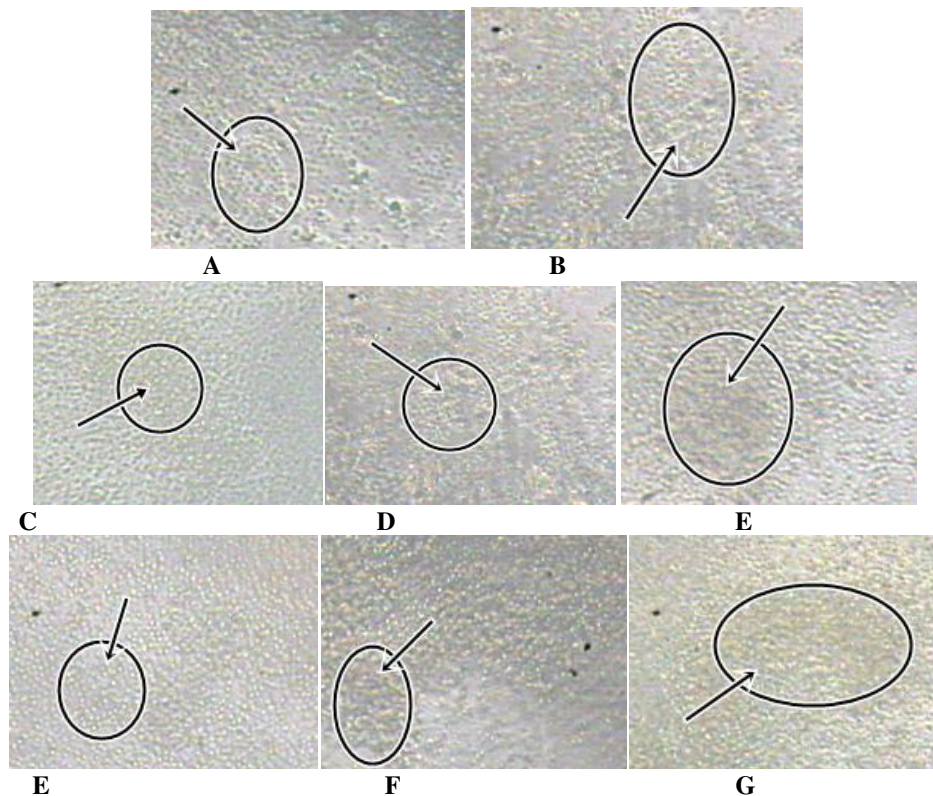
Uji Aktivitas Imunostimulator

Sel limfosit diisolasi dari jaringan limpa mencit jantan galur Swiss. Limpa merupakan salah satu jaringan limfatik, selain itu jaringan limpa dipilih karena mudah diambil sehingga mudah untuk mengisolasi sel limfositnya. Sel limfosit yang sudah diisolasi kemudian dihitung dengan *haemocytometer* dan siap untuk dikultur dan diuji aktivitas imunostimulatornya.

Penelitian ini menggunakan PHA sebagai kontrol positif karena merupakan mitogen yang poten pada konsentrasi 10 µg/mL (Schroecksnadel *et al.*, 2011) untuk menstimulasi proliferasi sel limfosit (Sharon and Lis, 2004). Vaksin hepatitis B ditambahkan ke dalam kultur sel limfosit untuk menginduksi proliferasi sel limfosit karena untuk penelitian tentang imunostimulator sel limfosit yang akan diuji harus memiliki respon imun terlebih dahulu.

Pada saat proses inkubasi, untuk menjaga sel hasil kultur waktu inkubasi

ditentukan selama 48 jam dengan tujuan untuk mencegah berkurangnya ketersediaan zat gizi yang dikonsumsi oleh sel limfosit akibat waktu inkubasi yang lama. Pada kultur sel limfosit ditambahkan penisilin-streptomisin untuk mencegah terjadinya kontaminasi bakteri dan fungizon untuk mencegah kontaminasi fungi sehingga tidak mengacaukan hasil absorbansi. Gambar kultur sel limfosit setelah inkubasi 48 jam dengan berbagai perlakuan yang menunjukkan sel yang hidup terdapat pada Gambar 1 sebagai berikut :

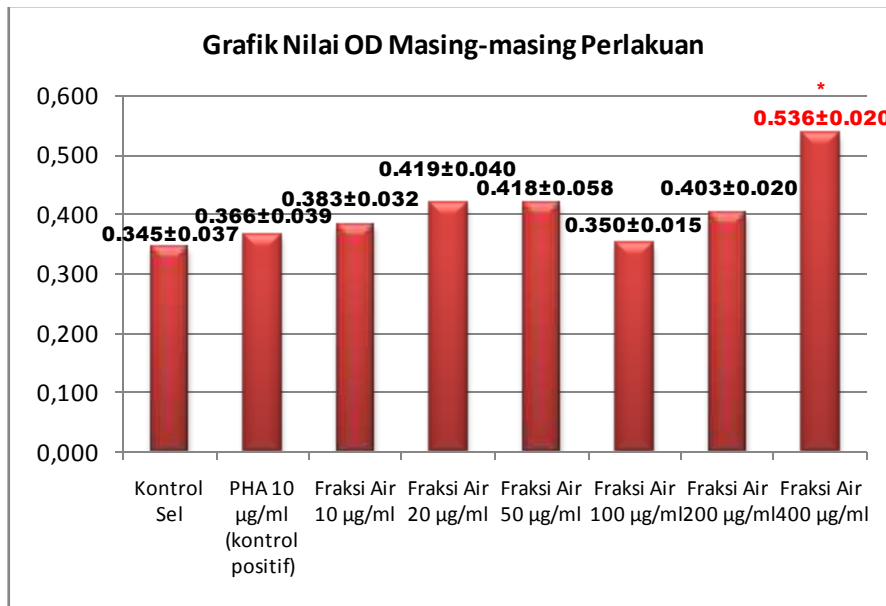


Gambar 1. Kultur sel limfosit setelah inkubasi 48 jam dengan berbagai perlakuan
Keterangan :

- (A) Kontrol sel (sel+vaksin)
 - (B) Kontrol positif phytohemaglutinin (PHA) konsentrasi 10 µg/mL
 - (C) Perlakuan fraksi air dengan konsentrasi 10 µg/mL
 - (D) Perlakuan fraksi air dengan konsentrasi 20 µg/mL
 - (E) Perlakuan fraksi air dengan konsentrasi 50 µg/mL
 - (F) Perlakuan fraksi air dengan konsentrasi 100 µg/mL
 - (G) Perlakuan fraksi air dengan konsentrasi 200 µg/mL
 - (H) Perlakuan fraksi air dengan konsentrasi 400 µg/mL
- sel yang hidup

Uji aktivitas imunostimulator dianalisis dengan membandingkan *Optical Density* (OD) dari masing-masing perlakuan. Kultur sel yang hanya ditambahkan vaksin hepatitis B digunakan sebagai kontrol sel. Fraksi air dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella ditambahkan pada kultur sel limfosit dengan konsentrasi 10, 20, 50, 100, 200 dan 400 µg/ml

yang sebelumnya telah ditambahkan vaksin hepatitis B untuk membuat sel limfosit memiliki respon imun terlebih dahulu. PHA dengan konsentrasi 10 µg/ml ditambahkan pada kultur sel sebagai kontrol positif. Data OD dari masing-masing perlakuan disajikan pada Gambar 2 berikut :



Gambar 2. Grafik Nilai OD Dari Masing-masing Perlakuan

Keterangan :

* = Nilai OD berbeda bermakna terhadap kontrol sel dan kontrol positif

Fraksi air dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella dikatakan memiliki aktivitas imunostimulator jika dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit setelah pemberian vaksin hepatitis B yang dilihat dari peningkatan nilai OD yang bermakna bila dibandingkan dengan kontrol sel. Data *Optical Density* (OD) dari masing-masing perlakuan dibandingkan dan dianalisis menggunakan statistik parametrik dengan metode *One Way ANOVA*. Data menunjukkan bahwa nilai OD kelompok fraksi air konsentrasi 400 µg/ml mempunyai perbedaan yang bermakna terhadap kontrol sel. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi air dari kelopak bunga rosella mempunyai aktivitas imunostimulator pada konsentrasi 400 µg/ml. PHA merupakan mitogen yang poten yang seharusnya mempunyai aktivitas imunostimulator yang ditandai dengan perbedaan nilai OD dari kontrol sel, akan tetapi nilai OD dari kontrol positif secara statistik tidak berbeda bermakna dengan kontrol sel. Hal ini mungkin disebabkan karena PHA yang digunakan pada penelitian ini yaitu PHA-P dimana di dalamnya terdapat PHA-L dan PHA-E, sedangkan PHA yang poten digunakan sebagai mitogen pada proliferasi sel limfosit adalah PHA-L.

Aktivitas imunostimulator yang ditimbulkan oleh larutan uji kemungkinan disebabkan oleh kandungan senyawa fenol dan flavonoid yang berperan sebagai antigen dan mampu dikenal oleh reseptor sel B maupun sel T. Kandungan senyawa tersebut dapat terikat dengan reseptor permukaan sel T (*T cell*

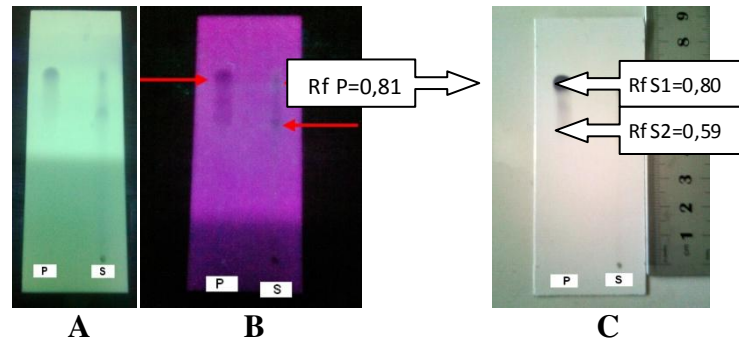
receptor-TCR) melalui ikatan hidrogen, sedangkan pada sel B dapat terikat pada reseptor permukaannya (Imunoglobulin M). Pengikatan antigen pada reseptor permukaan sel T bersama interleukin 1 (IL-1) dari APC (*antigen presenting cell*) dapat mengaktivasi G-protein yang kemudian memproduksi fosfolipase C. Enzim ini menghidrolisis fosfatidil inositol bifosfat (PIP₂) menjadi produk reaktif diasilgliserol (DAG) dan inositol trifosfat (IP₃). Reaksi tersebut berlangsung dalam membrane plasma. IP₃ kemudian menstimulasi pelepasan Ca²⁺ ke dalam sitoplasma sehingga konsentrasi Ca²⁺ meningkat. Peningkatan Ca²⁺ ini berperan penting dalam menstimulasi kerja enzim protein kinase C dan *5-lipoxygenase*. Protein kinase C menstimulasi produksi interleukin-2 (IL-2) yang kemudian mengaktivasi sel B maupun sel T untuk berproliferasi (Roitt, 1997).

A. Identifikasi Kandungan Kimia

Hasil uji KLT senyawa fenol setelah dideteksi dengan penampak bercak FeCl₃ dan dilihat pada lampu UV 254 nm menghasilkan lempeng KLT berwarna hijau sedangkan bercak berwarna gelap, pada lampu UV 366 nm lempeng KLT berwarna ungu muda dan bercak berwarna ungu tua, sedangkan bila dilihat pada visibel lempeng KLT berwarna putih sedangkan bercak berwarna kehitaman dengan nilai Rf pembanding 0,81; Rf sampel 1 (S1) adalah 0,80; dan Rf sampel 2 (S2) adalah 0,59.

Hasil uji KLT senyawa fenol fraksi air dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella dapat

dilihat pada Gambar 3 berikut :



Gambar 3. Hasil uji KLT senyawa fenol fraksi air dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella.

Keterangan :

A. Pengamatan pada sinar UV 254 nm

B. Pengamatan pada sinar UV 366 nm

C. Pengamatan secara visibel

Fase Diam : Silika gel 60 F₂₅₄

Fase Gerak : Metanol:asam formiat (96:4)

Penampak Bercak : FeCl₃

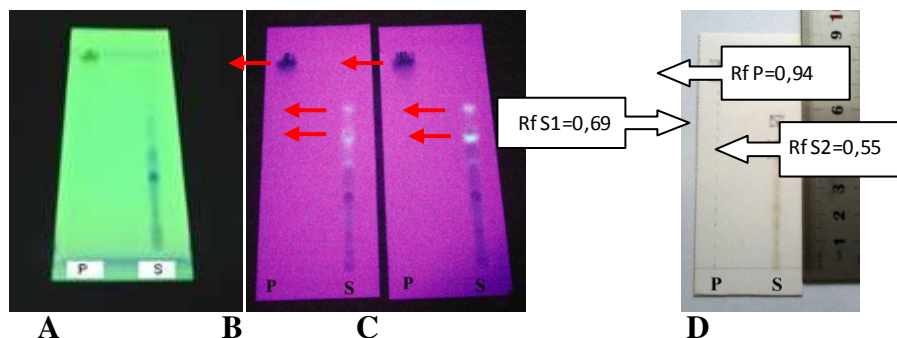
Pembanding (P) : Asam galat

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

Dilihat dari warna bercak pada S1 dan S2 pada gambar 3C yang sama dengan baku pembanding setelah penambahan FeCl₃ yaitu berwarna kehitaman maka di dalam fraksi uji mengandung senyawa fenol. Warna yang terjadi karena adanya ikatan antara gugus hidroksil pada fenol dengan Fe. Senyawa fenolik menyerap sinar di daerah UV pendek dan dapat dideteksi pada lempeng silika gel yang mengandung indikator fluoresensi pada 254 nm, terlihat sebagai bercak gelap dengan latar belakang berfluoresensi (Harborne, 1987). Dilihat dari nilai Rf bercak sampel maka bercak pada S1 memiliki kepolaran yang sama dengan asam galat karena nilai Rf S1 hampir sama dengan nilai Rf pembanding, sedangkan bercak pada S2 memiliki kepolaran yang lebih tinggi dibandingkan bercak pada S1 sehingga nilai Rf S2 lebih kecil dari nilai Rf S1.

Hasil uji KLT senyawa flavonoid terlihat beberapa bercak berwarna gelap pada

sinar UV 254 nm sedangkan lempeng KLT berwarna hijau. Pada sinar UV 366 nm dapat dilihat dua bercak sampel berwarna biru muda sebelum diuapi dengan ammonia dan berubah menjadi hijau biru pada salah satu bercak dan hijau-biru murup pada bercak yang lain, sedangkan pada pengamatan secara visibel terlihat beberapa bercak berwarna kuning kecoklatan dan lempeng KLT berwarna putih. Perubahan warna ini karena adanya interaksi antara uap ammonia dengan gugus hidroksil pada flavonoid (Markham, 1988). Dari perubahan warna bercak sampel sebelum dan sesudah diuapi dengan ammonia yang dilihat pada sinar UV 366 nm, diduga kandungan flavonoid yang terdapat pada fraksi uji adalah senyawa flavonoid golongan flavanol (Markham, 1988). Hasil uji KLT senyawa flavonoid fraksi air dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella dapat dilihat pada Gambar 4 berikut :



Gambar 4. Hasil uji KLT senyawa flavonoid fraksi air dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella.

Keterangan :

- A. Pengamatan pada sinar UV 254 nm
- B. Pengamatan pada sinar UV 366 nm sebelum diuapi ammonia
- C. Pengamatan pada sinar UV 366 nm setelah diuapi ammonia
- D. Pengamatan secara visibel
- Fase Diam : Silika gel 60 F₂₅₄
- Fase Gerak : butanol:asam asetat:aquabidestilata (3:1:6 v/v)
- Penampak Bercak : Uap ammonia
- Pembanding (P) : Kuercetin
- Sampel uji (S) : Fraksi Air Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella

Nilai Rf dari pembanding yaitu 0,94 sedangkan nilai Rf sampel 1 (S1) adalah 0,69 dan nilai Rf sampel 2 (S2) adalah 0,55. Dilihat dari nilai Rf bercak sampel maka bercak pada S1 dan S2 memiliki kepolaran yang lebih tinggi dibandingkan dengan asam galat karena nilai Rf S1 dan S2 lebih kecil dari nilai Rf pembanding, sedangkan bercak pada S2 memiliki kepolaran yang lebih tinggi dibandingkan bercak pada S1 sehingga nilai Rf S2 lebih kecil dari nilai Rf S1.

KESIMPULAN

1. Fraksi air dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) mempunyai aktivitas imunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit mencit jantan galur Swiss secara *in vitro* pada konsentrasi 400 µg/ml ($p < 0,05$).
2. Fraksi air dari ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) mengandung senyawa fenol dan flavonoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Baratawidjaja, K.G., 2002, *Imunologi Dasar*, Edisi 5, 374, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- 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 Med*, **69**, 600-604.
- Depkes RI, 1985, *Cara Pembuatan Simplisia*, 10, Departemen kesehatan RI, Jakarta.
- Depkes RI, 1986, *Sediaan Galenik*, 1-10, Departemen kesehatan RI, Jakarta.
- Falsey, 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, *Phytotherapy Research*. **22**, 664-668.
- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia (Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan)*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Cetakan ke-2, 8, 49-50, ITB, Bandung.
- Hay, F. C., and Westwood, O. M. R., 2002, *Practical Immunology*, Fourth Edition, 185, Blackwell Publishing Company, UK.
- Kumar, S., Gupta, P., Sharma, S., and Kumar, D., 2011, A Review on Immunostimulatory Plants, Review, *Journal of Chinese Integrative Medicine*, **9(2)**, 117-128
- Maghraby, A. S., Shalaby, N., Abd-alla, H. I., Ahmed, S. A., Khaled, H. M., and Bahgat, M. M., 2010, Immunostimulatory Effects of Extract of *Pulicaria crispera* Before and After *Schistosoma mansoni* Infection, *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, **67**, 1, 75-79.
- Mardiah, Hasibuan, S., Rahayu, A., dan Ashadi, R.W., 2009, *Budi Daya dan pengolahan Rosela Si Merah Segudang Manfaat*, 13, Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Markham, K. R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, 3, Penerbit ITB, Bandung.
- Marston, A., and Hostettmann, K., 2006, Separation and Quantification of Flavonoids, in Anderson, Ø. M. and Markham, K. R. (Ed.), *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*, 2, CRC Press, New York.
- Mosmann, T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55-63.
- Pratiwi, D., Yuliani, R., dan Munawaroh, M., 2011, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kelopak Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* Multiresisten Dan *Shigella dysenteriae*, *Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Peneliti Bahan Obat Alami dan Kongres Nasional IV Obat Tradisional Indonesia*, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.

- Roitt, I. M., 1997, *Roitt's Essential Immunology*, Ninth Edition, 168-178, Blackwell Scientific Publications, London.
- Schroecksnadel, S., Sucher, R., Kurz K., Fuchs, D., and Brandacher, G., 2011, Influence of Immunosuppressive Agents on Tryptophan Degradation and Neopterin Production in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Journal of Transplant Immunology*, **25**, 119-123.
- Sharon, N., and Lis, H., 2004, History Of Lectins : From Hemagglutinins To Biological Recognition Molecules, Review, *Glycobiology*, **14(11)**, 53R-62R.
- Suganda, A.G., Hakim, L., Sidik, Santosa, D., Elya, B., dan Elfahmi, 2010, *Serial Data Terkini Tumbuhan Obat Hibiscus sabdariffa .L.*, **2-11**, Direktorat Obat Asli Indonesia, Balai Pengawas Obat Dan Makanan RI.
- Wahab, A.S., dan Julia, M., 2002, *Sistem Imun, Imunisasi, dan Penyakit Imun*, 1-2, Widya Medika, Jakarta.