

EVALUASI TOKSISITAS, AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIOKSIDAN KOMPONEN BIOAKTIF ROSELA DENGAN VARIASI JENIS PELARUT

EVALUATION ON TOXICITY, ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF ROSELLE BIOACTIVE COMPOUNDS WITH VARYING SOLVENTS

Ike Sitoresmi M Purbowati^{1)*}, Khaswar Syamsu²⁾, Endang Warsiki²⁾, Herastuti Sri Rukmini¹⁾

¹⁾Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Soedirman,
Jalan Dr. Suparno, Karangwangkal, Purwokerto 53123, Indonesia*
Email: Ikesitoresmi@yahoo.co.id

²⁾Departemen Teknologi Industri Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Makalah: Diterima 17 April 2014; Diperbaiki 3 September 2014; Disetujui 10 September 2014

ABSTRACT

The toxicity, antibacterial and antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* extract was investigated in this study. Extraction was carried out using 70% ethanol, ethyl acetate, and hexane. Qualitative method was used to determine the phytochemical calyx content, Brine Shrimp Lethality for toxicity test, antibacterial test was done against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were using disc diffusion method. Total antioxidant activity determination by the ferric thiocyanate method. The results showed that bioactive compounds in roselle calyx were flavonoid, phenolic, tannin, alkaloid, and steroid. Seventy percent ethanol could extract higher phenolic (19.45 ± 0.32 mg/g) compared to ethyl acetate and hexane, which were only extract 7.51 ± 0.49 mg/g and 2.73 ± 0.31 mg/g respectively, therefore 70% ethanol more effective compared to the other solvent. The 70% ethanol extract showed the highest activity ($510.613 \mu\text{g/mL}$) compare to ethyl acetate ($1241.983 \mu\text{g/mL}$) and hexane ($1718.446 \mu\text{g/mL}$) respectively. Seventy percent ethanol and ethyl acetate extract also had antibacterial activity. Inhibition zone against *Staphylococcus aureus* 7.7 ± 2.01 mm and 7.53 ± 2.19 mm and against *Escherichia coli* 13.28 ± 3.30 mm, 12.35 ± 3.13 mm respectively. There was no inhibitory zone for crude hexane extract. The antioxidant activity of 70% ethanol ($439.3270 \mu\text{L/mL}$) higher than hexane ($587.916 \mu\text{L/mL}$) and ethyl acetate ($481.392 \mu\text{L/mL}$).

Keywords: antioxidant activity, antibacterial activity, *Hibiscus sabdariffa*, toxicity,

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh jenis pelarut terhadap karakteristik toksisitas, aktivitas antibakteri dan antioksidan ekstrak bunga rosela menggunakan pelarut etanol 70%, etil asetat dan heksan. Metode kualitatif digunakan untuk penentu kandungan fitokimia dalam ekstrak, *Brine Shrimp Lethality* untuk uji toksisitas, dan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan metode difusi cakram, dan aktivitas antioksidan dengan metode Ferric-Thiocyanate. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang terekstrak dari kelopak bunga rosela adalah flavonoid, fenols, tanin, alkaloid, dan steroid. Pelarut etanol 70% lebih efektif mengekstrak fenols ($19,45 \pm 0,32$ mg/g) dibandingkan etil asetat ($7,51 \pm 0,49$ mg/g) dan heksan ($2,73 \pm 0,31$ mg/g). Ekstrak etanol bersifat toksik, ditunjukkan dengan nilai LC_{50} dibawah $1000 \mu\text{g/L}$, yaitu $510,613 \mu\text{g/L}$, dibandingkan etil asetat ($1241,983 \mu\text{g/L}$) dan heksan ($1718,446 \mu\text{g/L}$). Ekstrak etanol 70% dan etil asetat memiliki aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan zona penghambatan dengan nilai sebesar $7,7 \pm 2,01$ mm dan $7,53 \pm 2,19$ mm untuk aktivitas terhadap terhadap *S aureus*. Zona bening yang terbentuk melawan pertumbuhan *E coli* adalah $13,28 \pm 3,30$ mm, $12,35 \pm 3,13$ mm. Nilai IC_{50} ekstrak etanol 70%, etil asetat dan heksan berturut turut adalah $439,32 \mu\text{L/mL}$; $587,916 \mu\text{L/mL}$; $481,392 \mu\text{L/mL}$.

Kata kunci: aktivitas antibakteri, antioksidan, bunga rosela, toksisitas

PENDAHULUAN

Penyakit yang disebabkan infeksi mikroorganisme biasanya ditanggulangi dengan pemberian antibiotik. Sayangnya, hal ini akan menimbulkan semakin meningkatnya dosis obat yang diperlukan dan efek samping yang tidak diinginkan, seperti hipersensitivitas, reaksi alergi dan peningkatan imun mikroorganisme. Situasi ini mendorong pemikiran alternatif obat antimikroba

lain yang dirasakan lebih aman.

Rosela selama ini dikenal sebagai tanaman penghasil serat. Namun seiring dengan makin maraknya slogan *back to nature* dikalangan masyarakat, pamor rosela pun ikut terangkat. Tanaman ini digunakan dalam pengobatan tradisional untuk mengatasi tekanan darah tinggi, penyakit lever dan demam (Mazza dan Miniati, 1993; Wang *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2002). Hal ini disebabkan rosela memiliki kandungan senyawa

bioaktif. Azza *et al.* (2007) menyatakan bahwa kandungan fisikokimia kelopak bunga rosela, yaitu kadar air 12,81%, protein 7,51%, lemak 0,46%, serat 11,17% dan abu 11,24%. Rosela juga mengandung mineral K, P, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu dan Mn. Asam askorbat (140,13 mg/100g), total antosianin (622,91mg/100g) and total fenolik (37,42 mg/g bk). Mourtzinis *et al.* (2008) menyatakan bahwa rosela banyak mengandung senyawa fenolik dan antosianin.

Pemakaian bahan alam sebagai obat tradisional di masyarakat dijamin keamanannya oleh pemerintah dengan mengimplementasikannya dalam Permenkes No.760/Menkes/Per/IX/1992 tentang obat tradisional dan fitofarmaka. Tahapan-tahapan yang harus dilewati oleh setiap bahan alam sebelum menjadi sediaan fitofarmaka adalah uji farmakologi eksperimental, uji toksisitas, uji klinis, uji kualitas dan pengujian lain sesuai persyaratan yang berlaku demi menjamin keamanan masyarakat dalam mengkonsumsinya.

Penelitian farmakologi telah dilakukan oleh Wibowo *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa konsentrasi 25% v/v infusum bunga rosela mempunyai aktivitas antimikroba yang setara dengan konsentrasi baku tetrasiklin HCl 18,62 µg/mL. Al Hashimi (2012) aktivitas antibakteri rosela terhadap *E coli*, *S aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* memperlihatkan derajat hambatan yang berbeda. Aktivitas antioksidan pada konsentrasi 5 mg/ml adalah setara dengan BHT dengan nilai 75,67%. Berdasarkan hal tersebut diatas, menunjukkan bahwa secara farmakologi eksperimental rosela terbukti memiliki aktivitas biologi. Langkah penting berikutnya yang harus dilakukan adalah menentukan toksisitas, aktivitas antioksidan, dan antibakteri ekstrak kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) sebagai uji penapisan awal aktivitas senyawa kimia dalam bunga rosela.

Fleksibilitas pemanfaatan rosela saat ini masih terbatas mengingat kandungan senyawa bioaktif pada tanaman biasanya sangat kecil. Untuk itu perlu dilakukannya ekstraksi kelopak bunga rosela agar mempermudah pemanfaatannya. Proses pemisahan komponen bioaktif dari rosela haruslah memperhatikan dua hal yang penting, yaitu karakteristik komponen bioaktif rosela dan metode ekstraksi yang dilakukan.

Tsai *et al.* (2002) menyatakan bahwa kandungan pigmen flavonoid yaitu adalah pewarna alami, tidak toksik dan memiliki kemampuan menyembuhkan, mudah sekali bereaksi yang mengakibatkan *dekolorisasi* warnanya. Laju kerusakan antosianin tergantung pada beberapa faktor seperti pH, suhu, intermolekular kopigmen, asam askorbat, dan oksigen. Untuk itu faktor-faktor yang terkait dengan upaya isolasi kandungan bioaktif dari bunga rosela pun memainkan peranan yang penting agar efisien dengan tetap mempertahankan aktivitasnya.

Proses pemisahan senyawa fenolik dari kelopak bunga rosela dapat dilakukan melalui ekstraksi padat-cair. Pemilihan pelarut, sangat penting dalam menentukan keberhasilan ekstraksi. Mengikuti hukum kelarutan *like dissolves like*, polaritas pelarut harus mendekati polaritas zat yang diekstrak (Tsai *et al.*, 2002).

Beragamnya polaritas senyawa bioaktif tanaman dan pelarut yang digunakan memungkinkan terjadinya perbedaan jumlah dan jenis serta aktivitas senyawa bioaktif yang terkandung didalamnya. Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan toksisitas aktivitas antioksidan, dan antibakteri ekstrak kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dalam pelarut yang berbeda sebagai uji penapisan awal aktivitas senyawa kimia dalam bunga rosela.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai Desember 2013, di Laboratorium Teknologi Pangan, FAPERTA UNSOED, Laboratorium Terpadu UNSOED, Purwokerto, dan laboratorium kimia organik UGM, Yogyakarta.

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelopak bunga rosela, pelarut etanol 70%, etil asetat, heksan dan bahan kimia lain untuk analisa. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah larva udang (*Artemia salina* Leach), air laut untuk uji toksisitas, media padat *Nutrient Agar* (NA), media cair *Nutrient Broth* (NB) untuk perbanyakan dan pemeliharaan kultur bakteri, kloramfenikol sebagai kontrol positif uji aktivitas antibakteri.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *shaker*, vakum evaporator, autoklaf, inkubator, pipet mikro, *multiwell plates*, spektrofotometer, dan peralatan gelas untuk analisis kimia.

Ekstraksi Kelopak Bunga Rosela

Serbuk kelopak bunga rosela kering dengan ukuran 60 mesh sebanyak 10 g masing masing direndam dalam pelarut etanol 70%, etil asetat, dan heksan, dengan perbandingan 1:10 (b/v). Proses maserasi dilakukan selama 24 jam pada suhu kamar sambil diaduk. Campuran tersebut kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *vacuum evaporator*. Ekstrak yang diperoleh digunakan sebagai sampel untuk analisis fitokimia dan pengujian aktivitas lainnya. Penentuan Vitamin C (AOAC, 2000), total kandungan antosianin (Fuleki dan Francis, 1968). Rendemen ekstraksi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kering sampel}}{\text{total berat sampel}}$$

Penentuan Kandungan Fitokimia Ekstrak (Harborne, 1996)

Penentuan kandungan fitokimia secara kualitatif dilakukan untuk mengetahui komposisi senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak kelopak bunga rosela, meliputi fenol, alkaloid, flavonoid, steroid, dan tanin.

Total Fenol

Total fenols ditentukan menggunakan metode Folin-Ciocalteu Chew *et al.* (2009). Sebanyak 0,4 mL larutan sampel ditambahkan 1,5 mL Folin-Ciocalteu reagent (10%,v/v). Setelah diinkubasi 5 menit dicampur dengan 1,5 mL 7,5% (w/v) larutan Na₂CO₃. Setelah 90 menit inkubasi pada ruang gelap dengan suhu kamar, diukur absorbansi pada panjang gelombang 765 nm. Asam galat digunakan sebagai standar. Hasil yang didapat direpresentasikan sebagai mg ekuivalen asam galat (GAE)/g bahan.

Uji Toksisitas Metode *Bhrine Shrimp Lethality Test* (BSLT)(Juniarti *et al.*, 2009)

Disiapkan bejana untuk penetasan telur udang. Di satu ruang dalam bejana tersebut diletakkan lampu untuk menghangatkan suhu selama penetasan. Ke dalam bejana dimasukan air laut dimasukan \pm 50-100 mg telur udang untuk ditetaskan. Bejana untuk menetasakan telur udang ditutup menggunakan aluminium foil dan dipanaskan dengan lampu selama penetasan.

Sebanyak 10 ekor larva *Artemia salina* Leach yang sehat dan berumur 48 jam dimasukan ke dalam vial uji yang berisi air laut. Masing-masing vial uji ditambahkan ekstrak sehingga akan didapat larutan dengan konsentrasi 10, 100, 500, dan 1000 $\mu\text{g/mL}$. Untuk setiap konsentrasi dilakukan 6 replikasi. Bila sampel tidak larut ditambahkan 2 tetes DMSO

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah larva yang mati dari total larva yang dimasukan dalam vial uji. Perhitungan akumulasi mati untuk konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ = angka mati pada konsentrasi tersebut, akumulasi mati untuk konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ = angka mati pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ + angka mati pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$. Akumulasi mati untuk konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ = angka mati pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ + angka mati pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ + angka mati pada konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$. Akumulasi mati dihitung hingga konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Angka akumulasi hidup tiap konsentrasi dihitung sebagai berikut: akumulasi hidup untuk konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ = angka hidup pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$, akumulasi hidup pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ = angka hidup pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ + angka hidup pada

konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$. Akumulasi hidup pada konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ = angka hidup pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ + angka hidup pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ + angka hidup pada konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$. Akumulasi angka hidup dihitung hingga konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya dihitung mortalitas dengan cara akumulasi mati dibagi jumlah akumulasi hidup dan mati/total dikali 100%. Penghitungan LC₅₀ dengan menggunakan analisis probit dari data persen mortalitas larva udang. Nilai LC₅₀ merupakan konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50% yang diperoleh dengan persamaan linier regresi $y = a + bx$. Grafik dibuat dengan log konsentrasi sebagai sumbu x terhadap mortalitas sebagai sumbu y.

Uji Aktivitas Antibakteri

Penentuan Nilai KHM dan KBM (Sharma *et al.*, 2011; Doughari, 2006)

Penentuan nilai KHM (konsentrasi hambat minimum) dan KBM (konsentrasi bunuh minimum) dilakukan dengan metode dilusi. Ekstrak etanol sebanyak 1 mL dengan berbagai konsentrasi (1000 $\mu\text{g/mL}$ sampai 15.000 $\mu\text{g/mL}$) dikontakkan dalam 1 mL media NB yang telah mengandung bakteri uji. Masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Konsentrasi ekstrak yang tidak terdapat pertumbuhan bakteri (bening) secara visual dideskripsikan sebagai nilai KHM.

Konsentrasi ekstrak yang bening dicampur dengan media NA pada cawan petri, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Nilai KBM ditentukan pada konsentrasi ekstrak terkecil pada media yang tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri.

Pengukuran Zona Hambat

Media NA steril sebanyak 20 mL diinokulasikan dengan 20 μL kultur segar berumur 24 jam dalam media NB, dikocok merata, kemudian dituang ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan membeku. Sebanyak 10 μL ekstrak kelopak bunga rosela ditetaskan dalam kertas cakram berukuran 6 mm, kemudian kertas cakram diletakkan pada cawan petri yang berisi media agar padat. Selanjutnya cawan-cawan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan mengukur zona bening di sekitar kertas cakram dengan alat kaliper yang menyatakan besarnya aktivitas antibakteri.

Uji Aktivitas Antioksidan (Al-Hashimi, 2012)

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode Ferric Thiocyanate. Sebanyak 0,6 mL ekstrak dilarutkan dalam 0,12 mL etanol 98% dan 2,88 mL larutan 2,51% asam linoleat dalam etanol. Ditambahkan 9 mL buffer phosphate 40 mM dengan pH 7. Campuran diinkubasi dalam ruang gelap pada suhu 40°C selama 3 hari. Setelah inkubasi 0,1 mL larutan diambil dan ditambahkan

9,7 mL etanol 75%; 0,1 mL amonium thiosianat 30% dan 0,1 mL 20 mM *Ferrous chloride* dalam 3,5 HCl. Setelah inkubasi selama 3 menit, diukur absorbansi pada 500 nm. Tingkat oksidasi diukur dengan dengan menghitung rasio absorbansi terhadap blanko (tidak dengan sampel ekstrak).

Analisis Statistik

Desain yang digunakan adalah non faktorial dengan enam replikasi, ANOVA tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dilanjutkan dengan DMRT (Duncan's Multiple Range Test). Persamaan rancangan percobaan :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Dimana:

- Y_{ij} = nilai respon karena perlakuan I pada blok
- μ = efek rata-rata umum
- τ_i = efek perlakuan i
- β_j = efek blok j
- ϵ_{ij} = efek kekeliruan acak

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fitokimia Ekstrak Kelopak Bunga Rosela

Dalam penelitian ini digunakan 3 jenis pelarut untuk ekstraksi, yaitu etanol 70%, etil asetat, dan heksan. Perbedaan polaritas pelarut dimaksudkan untuk dapat mengekstrak semua jenis senyawa metabolit sekunder yang ada dalam sampel.

Hasil ekstraksi ini memberikan jumlah dan jenis senyawa dalam ekstrak kasar yang berbeda beda. Menilik hasil rendemen yang diperoleh, seperti terlihat pada Tabel 1, pelarut heksan memiliki kemampuan ekstraktif yang paling rendah, yaitu $3,42 \pm 0,02$ mg/g, pelarut etil asetat menghasilkan rendemen sebesar $9,04 \pm 0,02$ mg/g sedangkan pelarut etanol 70% memiliki kemampuan ekstraktif yang paling tinggi, yaitu $27,2 \pm 0,08$ mg/g. Hasil tersebut menunjukkan bahwa dalam kelopak rosela senyawa metabolit sekunder dari golongan

polar lebih banyak dibandingkan dari golongan semi polar dan non polar.

Tabel 1 juga menunjukkan bahwa kelopak bunga rosela mengandung fenol, tannin, flavonoid, steroid, dan alkaloid. Etanol 70% mampu mengekstrak senyawa fenol, tannin, flavonoid dan alkaloid. Etil asetat dapat mengekstrak fenol, flavonoid dan alkaloid. Sedangkan ekstrak heksan hanya mengandung fenol, dan steroid. Penelitian sebelumnya (Olaleye, 2007) menunjukan kandungan alkaloid, saponin, flavonoid dan steroid adalah senyawa bioaktif utama yang terdapat dalam kelopak bunga rosela.

Etanol 70% dapat mengekstrak phenol sebanyak 19,45 mg/g. Jika dibandingkan dengan etil asetat dan heksan yang mampu mengekstrak sebanyak 7,51 mg/g dan 2,73 mg/g berarti polaritas etanol 70% lebih sesuai dengan senyawa phenolik hasil metabolisme sekunder kelopak bunga rosela, sehingga etanol 70% lebih efisien dan berbeda nyata dalam mengekstrak senyawa phenolik dibanding pelarut lain, yaitu etil asetat dan heksan. Etanol, banyak disarankan sebagai pelarut pada ekstraksi poliphenol yang aman bagi manusia (Al Hashimi, 2012; Shil *et al.*, 2005). Yang *et al.* (2012) menyatakan bahwa etanol 60% mampu mengekstrak total phenol sebanyak $18,33 \pm 0,44$ mg/g. Penelitian yang dilakukan Christian dan Jackson (2009), Anokwuru *et al.* (2011) memberikan hasil ekstrak total phenol sebanyak 5,25 dan 27,6 mg/g.

Toksisitas

Hasil BSLT ekstrak kasar etanol 70%, etil asetat dan heksan, dari kelopak bunga rosela secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 2. Nilai LC₅₀ ekstrak kasar etanol 70% kurang dari 1000 µg/mL, yaitu sebesar 510,613 µg/mL, sedangkan ekstrak kasar heksan dan etil asetat lebih tinggi dari 1000 µg/L, yaitu 1718,446 dan 1241,983 µg/L. Hal ini berarti bahwa ekstrak etanol 70%, lebih toksik dibandingkan ekstrak heksan dan etil asetat.

Tabel 1. Hasil analisa fitokimia ekstrak

Senyawa	Etanol 70%	Etil Asetat	Heksan
Fenol	+	+	+
Tannin	+	-	-
Flavonoid	+	+	-
Steroid	-	-	+
Alkaloid	+	+	-
Total Fenol (mg/g)	$19,45 \pm 0,32^a$	$7,51 \pm 0,49^b$	$2,73 \pm 0,31^c$
Anthosianin (mg/g)	$13,51 \pm 0,03^a$	$6,50 \pm 0,05^b$	0 ^c
Vitamin C (mg/g)	$20,47 \pm 0,34^a$	$4,86 \pm 0,47^b$	$3,06 \pm 0,01^c$
Rendemen (mg/g)	$27,2 \pm 0,08^a$	$9,04 \pm 0,02^b$	$3,42 \pm 0,02^c$

Keterangan: rata-rata+standar deviasi pada tiap baris dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata (p>0,05)

Tabel 2. Hasil analisa toksisitas ekstrak

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Hidup	Mati	AH	AM	AM/T	Mortalitas	LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Etanol 70%	10	48	12	147	12	12/159	7,55%	510,613
	100	46	14	99	26	26/125	20,80%	
	500	30	30	53	56	56/109	51,38%	
	1000	23	37	23	93	93/116	80,17%	
Heksan	10	54	6	176	6	6/182	3,30%	1.718,446
	100	51	9	122	15	15/137	10,95%	
	500	43	17	71	32	32/103	31,07%	
	1000	28	32	28	64	64/92	69,57%	
Etil Asetat	10	54	6	169	6	6/175	3,43%	1.241,983
	100	49	11	115	17	17/132	12,88%	
	500	38	22	66	39	39/105	37,14%	
	1000	28	32	28	71	71/99	71,72%	

Keterangan: AH= akumulasi hidup, AM=akumulasi mati, T= total

Juniarti *et al.* (2009) menyatakan bahwa suatu senyawa memiliki aktivitas jika nilai LC₅₀ dibawah 1000 $\mu\text{g/mL}$. Dengan demikian ekstrak etanol 70% membutuhkan dosis lebih kecil untuk dapat menimbulkan toksisitas dibandingkan ekstrak lain. Al Mamun *et al.* (2011) menyatakan bahwa adanya saponin dan alkaloid merupakan penyebab kematian pada larva udang. Ekstrak ethanol 70% mengandung alkaloid dengan jumlah yang lebih banyak dibandingkan etil asetat, sehingga lebih toksik dibanding ekstrak kasar etil asetat. Ekstrak dengan pelarut heksan diketahui tidak mengandung senyawa alkaloid.

Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri dinyatakan dengan panjang diameter zona bening yang ditimbulkan di sekitar cakram. Diameter lebih kecil dari 6 mm menunjukkan ekstrak tidak aktif, sedangkan diameter lebih besar dari 6 mm ekstrak diklasifikasikan memiliki aktivitas antibakteri (Mudi dan Ibrahim, 2008).

Tabel 3 menyajikan hasil aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 70%, etil asetat dan heksan terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% dan etil asetat memiliki aktivitas antibakteri, dengan perbedaan yang tidak signifikan di antara kedua pelarut tersebut. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening pada masing-masing pelarut sebesar $7,7 \pm 2,01$ mm dan $7,53 \pm 2,9$ mm untuk aktivitas terhadap terhadap *S. aureus*. Zona bening yang terbentuk melawan pertumbuhan *E coli* adalah $13,28 \pm 3,30$ mm, $12,35 \pm 3,13$ mm, sedangkan ekstrak heksan tidak memiliki aktivitas antibakteri.

Aktivitas antibakteri ekstrak kasar kelopak bunga rosela lebih kecil jika dibandingkan dengan kontrol yang berupa bahan sintesis kloramfenikol (1000 $\mu\text{g/mL}$) aktivitas dari bahan sintesis kimia 1/10-1/11 kali jauh lebih besar dibandingkan nilai

KHM dan KBM etanol 70% dan etil asetat, yaitu 10.000 dan 11.000 $\mu\text{g/L}$.

Aktivitas antibakteri dari ekstrak tanaman disebabkan oleh kandungan senyawa bioaktif di dalamnya (Al Mamun *et al.*, 2011; Bukar *et al.*, 2010). Senyawa phenol disintesis tanaman sebagai respon infeksi oleh mikroorganisme. Aktivitas antibakteri ini dimungkinkan oleh kemampuan fenol membentuk kompleks dengan dinding sel bakteri. Hal ini sesuai dengan pernyataan Al-Hashimi (2012) dan Garcia Alonso *et al.* (2006) bahwa poliphenol dari tanaman mampu berfungsi sebagai zat antibakteri.

Perbedaan aktivitas terhadap pertumbuhan bakteri yang uji kemungkinan disebabkan oleh perbedaan kandungan fitokimia dalam ekstrak. Ekstrak heksan tidak memiliki aktivitas antibakteri, karena meski mengandung phenol, ekstrak diduga mengandung juga senyawa inaktif lain. Ebi dan Ofoefule (1997) menyatakan bahwa ekstrak kasar mungkin mengandung senyawa inaktif lain yang bersifat antagonis satu sama lain, seperti klorofil, lemak dan lilin. Hal ini juga sesuai dengan yang dinyatakan Lisdawati *et al.* (2006). Golongan senyawa metabolit sekunder yang larut dalam pelarut polar adalah golongan minyak atsiri, asam lemak tinggi, steroid-triterpenoid dan karotenoid. Oleh sebab itu, aktivitas antibakteri ekstrak yang digunakan dalam *in vitro* tes ini dapat lebih tinggi jika senyawa aktif dari ekstrak dapat dimurnikan.

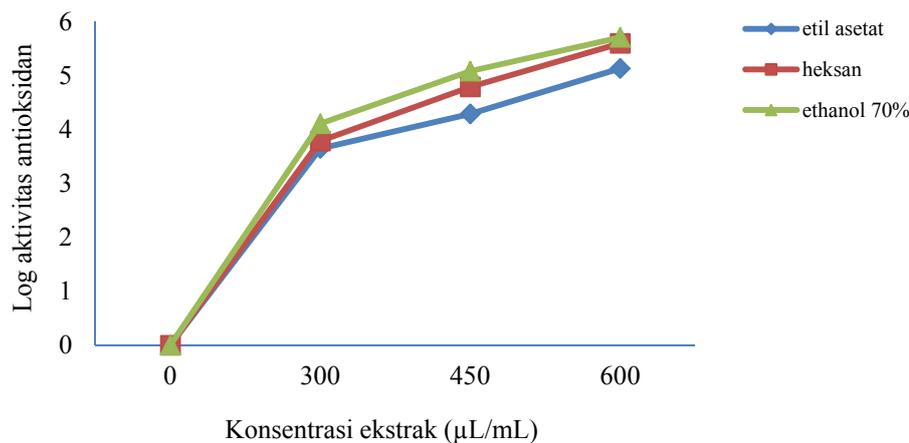
Aktivitas Antioksidan

Gambar 1 menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan ekstrak etil asetat dan heksan. Hal ini ditunjukkan dengan nilai EC₅₀ ekstrak etanol 70% sebesar 439,32 $\mu\text{L/mL}$, ekstrak etil asetat 587,92 $\mu\text{L/mL}$, ekstrak heksan 481,39 $\mu\text{L/mL}$ dengan jumlah vitamin C pada EC₅₀ berturut turut 44,75; 34,45; 38,69 $\mu\text{L/mL}$. Semakin kecil nilai EC₅₀, semakin tinggi kemampuan mencegah radikal bebas.

Tabel 3. Aktivitas antibakteri

Sampel	Zona Bening (mm)		KHM (µg/mL)		KBM (µg/mL)	
	<i>S aureus</i>	<i>E coli</i>	<i>S aureus</i>	<i>E coli</i>	<i>S aureus</i>	<i>E coli</i>
etil asetat	7,53 ± 2,19 ^b	12,35 ± 3,13 ^b	11000	11000	11000	11000
etanol 70%	7,70 ± 2,01 ^b	13,28 ± 3,30 ^b	10000	10000	10000	10000
heksana	0 ^c	0 ^c	-	-	-	-
kontrol	15,4 ± 2,28 ^a	18,78 ± 3,00 ^a	1000	1000	1000	1000
blanko	0,05 ± 0,05 ^c	0,02 ± 0,04 ^c	-	-	-	-

keterangan : rata-rata+standar deviasi pada kolom yang sama dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata (p<0,05)



Gambar 1. Hubungan antara dosis ekstrak dengan log aktivitas antioksidan dengan variasi jenis pelarut

Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa aktivitas antioksidan memiliki korelasi dengan total phenol, vitamin C dan antosianin (Yang *et al.*, 2012, Al-Hashimi, 2012). Hasil ini dimungkinkan karena aktivitas antioksidan tidak hanya disebabkan adanya kandungan fenol, namun dapat disebabkan karena adanya beberapa fitotokimia lain seperti asam askorbat, tokoferol dan pigmen dengan mekanisme sinergis diantaranya turut menentukan aktivitas antioksidan. Konsep umum yang selama ini diketahui, semakin banyak senyawa phenol dalam sampel, semakin tinggi aktivitas antioksidan ekstrak uji. Menurut Tsai *et al.* (2002) aktivitas antioksidan ekstrak rosela memiliki korelasi yang kuat dengan kandungan antosianin. Falade *et al.* (2005) menyatakan bahwa ekstrak rosela memiliki kandungan vitamin C yang tinggi dan vitamin C dikenal sebagai senyawa antioksidan

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Senyawa bioaktif yang ada dalam kelopak bunga rosela adalah golongan fenol, tanin, flavonoid, alkaloid, dan steroid. Ekstrak kasar etanol 70% memiliki sifat toksik terhadap *Artemina salina*, aktivitas antibakteri dan aktivitas antioksidan. Ekstrak kasar etil asetat memiliki aktivitas

antibakteri dan antioksidan, sedangkan ekstrak heksan hanya memiliki sifat antioksidan.

Saran

Perlu adanya evaluasi lebih lanjut mengenai kemungkinan hubungan sinergis antar komponen bioaktif terhadap aktivitas antioksidan dan antibakteri ekstrak.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Hashimi AG. 2012. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L extract. *Afri J Food Sci.* 6(21):506-511.
- Al-Mamun, Khatun H, Nesa L, Islam R, Munira S. 2011. In vitro evaluation of the antibacterial, cytotoxic and insecticidal activities of *Hibiscus sabdariffa* fruits. *Libyan Agric Res Center J Int.* 2 (3): 144-149.
- Anokwuru P, Esiaba, Ajibaye O, Adesuyi O. 2011. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* calyx. *Res J Med Plan.* (5):557-566.
- AOAC [Association of Official Analytical Chemists]. 2000. Official methods of analysis of the association of official

- chemists international, 17thed. The Association of Official Chemists International, Gaithersburg, USA.
- Azza A, Arab A, Ferial M, Salem A, Esmat A. 2011. Physico chemical properties of natural pigment (anthocyanin) extracted from roselle calyces. *J Am Sci*. 7(7): 445-456.
- Bukar A, Uba A, dan Oyeyi TI. 2010. Phitochemical analysis and antimicrobial activity of *Parkia biglobosa* (Jacq) Benth. extracts against some food-borne microorganisms. *Adv In Env Biol*. 4(1):74-79.
- Chew YL, Goh JK, dan Lim YY. 2009. Assessment of *in vitro* antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chem*. 116: 13-18.
- Christian R dan Jackson C. 2009. Change in total phenolic and monomeric anthocyanin composition and antioxidant activity of three variety of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity. *J Food Compo Anal*. 22:883-667.
- Doughari JH. 2006. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. *Tropical J Pharmaceutical Res*. 5:597-603.
- Ebi GC dan Ofoefule SI. 1997. Investigation into the folkloric antimicrobial activities of *landolphia owerrience*. *Phytother Res*. 11:149-151.
- Falade OS, Otemuyiwa IO, Oladipo A, Oyedapo OO, Akinpelu BA, Adewusi SRA. 2005. The chemical composition and membrane stability activity of some herbs used in local therapy for anemia. *J Ethnopharmacol*. 102:15-22.
- Fuleki T dan Francis FJ. 1968. Quantitative methods for anthocyanins, 1. Extraction and determination of total anthocyanin in Cranberries. *J Food Sci*. 33(1): 72-77.
- Garcia-Alonso J, Ros G, Vidal-Guevara L, Perigo. 2006. Acute intake of phenolic rich juice improves antioxidant status in healthy subject. *J Nutr Res*. 2006:26:330-339.
- Harborne JB. 1996. *Metode Fitokimia*. Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. Terjemahan Padmawinata K dan Soediro L. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Juniarti, Osmeli D, dan Yuhernita. 2009. Kandungan senyawa kimia, uji toksisitas dan antioksidan dari ekstrak daun saga. *Makara Sains*. (13):50-54.
- Lisdawati V, Wiryowidagdo S, dan Kardono BS. 2006. Brine shrimp lethality test dari berbagai fraksi ekstrak daging buah dan kulit biji mahkota dewa. *Bul Penel Kesehatan*. 34(3):111-118.
- Mourtzinis I, Makris DP, Yannakopoulou K, Kalogeropoulos N, Michali I, Karathsnos VT. 2008. Thermal stability of anthocyanin extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the presence of β -Cyclodextrin. *J Agric Food Chem*. 56: 10303-10310.
- Mudi SY dan Ibrahim H. 2008. Activity of *Bryophillum pinnatum* S. kurz extracts on respiratory tract pathogenic bacteria. *Bayero J Pure App Sci*. 1(1):43-48
- Mazza G dan Miniati E. 1993. *Anthocyanin In Fruits, Vegetables and Grains*. United State of America: CRC Press Inc.
- Olaleye T. 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *J Med Plants Res*. 1(1): 009-013.
- Sharma M, Vimal M, Maneesha A, Joshy PJ, Drishya KR. 2011. Antimicrobial screening of different extracts of South Indian medicinal plants of meliaceae. *J Medicinal Plants Res*. 5:688-695.
- Shil J, Nawaz H, Pohorly J, Mital G, Kakuda Y, Jiang Y. 2005. Extraction of polyphenolic from plant material for functional foods engineering and technology. *Food Rev Int*. 21:139-166.
- Tsai PJ, Mcintosh J, Pearse P, Camden B, Jordan TB. 2002. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle *Hibiscus sabdariffa* L extract. *Food Res Int*. 35:351-356.
- Wang CJ, Wang JM, Lin WL, Chu CY, Chou FP, Tseng TH. 2000. Protective effect of hibiscus anthocyanin against tert - butyl hydroperoxide induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 38: 411-416.
- Wibowo MS, Yuliana A, dan Rimayanti I. 2009. Uji aktivitas antimikroba infusum bunga rosela. *J Kes BTH*. 1(1):1-10.
- Yang L, Gou Y, Zhao T, Zhao J, Li F, Zhang B., Wu X. 2012. Antioxidant capacity of extract from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Afric J Biotechnol*. 11(17): 4063-4068.