

KADAR SENYAWA FLAVONOID TOTAL EKSTRAK TERPURIFIKASI KELOPAK ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa* L.) DAN AKTIVITAS ANTIHIPERGLIKEMI

Total Flavonoid Compound Level Calyx Purified Extract of Rosella (Hibiscus sabdariffa L.) and Antihyperglycemia Activity

FITA SARI^{1*}, DYAH ARYANTINI², LUKMAN², DINA WIAYU²

¹Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri, Fakultas Sains dan Teknologi Analisis, Kediri,
Indonesia

²Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri, Fakultas Farmasi, Kediri, Indonesia

*Corresponding authors: fita.sari@iik.ac.id

ABSTRACT

The condition where blood glucose levels increased and occur suddenly are Hyperglycemic. This situation could be caused by stress, infection, and consumption of certain drugs. Calyx extract of rosella has been widely studied to have antioxidant activities and antihyperglycemic. This is due to the notion that flavonoids are antihyperglycemic activity. The aim of this study was to determine the total flavonoid levels and antihyperglycemic activity calyx of rosella purified extract in Wistar rats by inducing sucrose. The purification method of extract uses liquid-liquid extraction by taking a chloroform layer. Phytochemical screening was carried out on samples and were analyzed for total flavonoid content using routine standard with TLC densitometer quantitatively and the mobile phase of ethyl acetate: formic acid: aquadest (85:10:15). Animal test for Wistar rats was induced by sucrose orally to increase blood sugar levels. Samples were given orally 3 dose are 100, 200 and 400 mg/kg BB. The negative control group was given CMC-Na 0.5% and glibenclamide as a positive control. The results of blood sugar levels were analyzed by oneway ANOVA and continued with LSD post hoc test. The results showed that calyx purified extract of rosella are contained Flavonoids, Alkaloids, Phenolics and Tannins with total flavonoid levels calculated as routine $9.62\% \pm 2.98$. Post hoc LSD test showed no significant difference between the positive control group and the dose variant group 100 mgs / KgsW, 200 mgs / KgsW and 400 mgs / KgsW. As conclusion that blood sugar levels can be lowered with the lowest dose of 100 mgs / KgsW from purified extracts contain of flavonoid compounds.

Keywords: Roselle, Rutine, Densitometry, Antihyperglycemia, Sucrose

PENDAHULUAN

Pengobatan secara kimia untuk penyakit hiperglikemi atau kenaikan kadar gula darah secara tiba – tiba memiliki banyak efek yang merugikan untuk kesehatan organ lain di tubuh manusia. Selama ini pengobatan tersebut memiliki efek samping seperti mual, pusing dan anoreksia serta kekurangannya adalah biaya yang mahal. Pengalihan pengobatan kimia menuju tradisional sangat diminati oleh lapisan masyarakat karena memiliki efek samping yang minimal serta biaya yang terjangkau (Prameswari, 2014).

Pemanfaatan tanaman tradisional seperti rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) sebagai terapi suatu penyakit sangat banyak diterapkan pada saat ini. Rosella memiliki kandungan banyak senyawa aktif seperti golongan fenol yaitu flavonoid, antosianin dan asam amino. Senyawa flavonoid tersebut memiliki peran sebagai antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas penyebab suatu penyakit (Nugroho, 2013).

Menurut penelitian Arjadi dan Susatyo (2010) tentang flavonoid golongan kuersetin memiliki efek hipoglikemi yaitu dapat menurunkan kadar gula darah dengan cara meningkatkan pengeluaran hormon insulin melalui metabolisme. Tanaman rosella yang memiliki banyak kandungan senyawa aktif seperti flavonoid, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk senyawa murninya agar berkhasiat lebih baik sebagai terapi suatu penyakit. Purifikasi ekstrak diperlukan untuk membuat ekstrak murni dengan mengambil senyawa aktif yang lebih spesifik agar tidak terganggu oleh senyawa pengotor lainnya.

Berdasarkan latar belakang di atas, menghitung kadar flavonoid total dari ekstrak terpurifikasi kelopak rosella sangat diperlukan untuk mengetahui berapa besar kadar senyawa flavonoid yang diperoleh dari ekstrak tersebut sehingga memberikan efek antihiperglikemi secara *in vivo*.

METODE PENELITIAN

Bahan

Kelopak rosella, glibenklamid, sukrosa, CMC-Na, etanol 50%, kloroform (sigma), peraksi Wagner, HCl 2 N, H₂SO₄ pekat, serbuk Mg, HCl pekat, asam asetat anhidrat, air, amil alkohol, FeCl₃ 1%, etanol 70% (teknis), reagen *glukosa DOF FS*, hewan uji tikus Wistar dengan berat rata – rata 200 gram dan usia sekitar 2 – 3 bulan sebanyak 30 ekor. Alat Fotometri BS 3000M.

Prosedur Kerja

Pembuatan Ekstrak Terpurifikasi Kelopak Rosella

Ekstrak terpurifikasi rosella dibuat dengan cara serbuk kelopak rosella yang sebelumnya dari tanaman telah dilakukan determinasi, diserbuk halus 1 kg kelopak rosella dilarutkan dengan etanol 50% sebanyak 5 L. Metode ekstraksi menggunakan maserasi, yang didiamkan dalam wadah kaca tertutup selama tiga hari dengan sekali pengadukan setiap hari. Kemudian disaring dengan flanel dan diperoleh maserat untuk dipekatkan di waterbath serta di rotary evaporator untuk menguapkan pelarut.

Setelah diperoleh ekstrak kental kelopak rosella, kemudian dilakukan purifikasi ekstrak dengan cara menimbang 20 g ekstrak etanol kelopak rosella. Ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambah 100 ml kloroform kemudian digojog hingga didapatkan dua lapisan. Hasil diperoleh lapisan tak larut kloroform dibilas dengan kloroform lagi sampai berwarna jernih dan lapisan tak larut kloroform diuapkan hingga kental (Azizah dan Salamah, 2013).

Skrining Fitokimia Flavonoid

Sampel ekstrak terpurifikasi kelopak rosella yang sudah dilarutkan dengan 10 ml aquadest diambil 5 ml kemudian ditambahkan serbuk Mg, kemudian ditambahkan 1 ml HCL pekat dan 2 ml amil alkohol dan dilakukan pengocokan. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Lestari, 2014).

Identifikasi Senyawa Flavonoid Menggunakan KLT Densitometer

Sampel ekstrak terpurifikasi kelopak rosella sebanyak 10 mg dilarutkan ke dalam 50 ml etanol, kemudian disaring dengan kertas saring. Hasil proses tersebut didapatkan filtrat rosella merah, yang kemudian membuat larutan standar rutin. Larutan standar rutin ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 50 ml etanol. Eluen yang digunakan dalam proses KLT

Densitometri ini adalah etil asetat: asam format:akuadest (85:10:15). Setelah semua proses dipersiapkan kemudian dimulai identifikasi menggunakan KLT Densitometri.

Uji Aktivitas Antihiperglikemi secara *In Vivo*

Pengujian untuk aktivitas antihiperglikemi dilakukan secara *in vivo*, yaitu menggunakan hewan uji tikus galur Wistar jantan. Hewan uji didapatkan dari peternakan hewan coba Wistar Farm kota Kediri. Penelitian ini juga mendapatkan persetujuan komite etik Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri 109/PP2M-KE/IV/2018. Perlakuan awal untuk hewan uji tikus telah dipuasakan selama 18 jam, kemudian ditimbang berat badan dan diukur kadar glukosa darah puasa awal. Setelah proses tersebut, hewan uji dikondisikan hiperglikemi terlebih dulu dengan cara menginduksikan sukrosa secara oral pada dosis 1,125 g / 200 g. Pengamatan kadar glukosa dilakukan setelah 15 menit dari penginduksian sukrosa, dilanjutkan hingga menit ke 30, 45 dan 60 dengan kadar glukosa darah di atas 50 – 135 mg/dL untuk hewan uji tikus (Putri *et al.*, 2017). Kelompok perlakuan dibagi menjadi lima yaitu, kelompok (I) kontrol negatif diberikan CMC-Na 0,5%, kelompok (II) kontrol positif diberikan glibenklamid 0,45 mg/kg BB, kelompok (III) diberikan ETKR dosis 100 mg/kg BB, kelompok (IV) diberikan ETKR dosis 200 mg/kg BB, kelompok (V) diberikan ETKR dosis 400 mg/kg BB secara oral. Kadar glukosa darah diukur pada menit ke 15, 30, 45, 60 menggunakan Fotometri BS 3000M.

Analisis Glukosa Darah menggunakan Fotometri BS 3000M.

Hewan coba dilakukan pengambilan darah untuk dianalisis glukosa darahnya menggunakan alat Fotometri BS 3000M. Sampel darah yang sudah diambil melalui vena orbitalis didapatkan kurang lebih 1 ml, kemudian disentrifus 4000 rpm selama 15 menit untuk pemisahan serum dan plasma. Hasil serum diambil sebanyak 10 µl dicampurkan dengan 1000 µl pereaksi glucose FOD FS. Proses tersebut dilanjutkan dengan memasukkan campuran serum dengan pereaksi ke dalam tabung reaksi kemudian divortek. Campuran tersebut diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 546 nm. Blangko menggunakan akuades, dan untuk standart menggunakan glukosa (Prameswari, 2014).

$$\text{Kadar Glukosa Darah(mg/dl)} = \frac{\text{Absoransi Sampel} \times 100}{\text{Absoransi Standart}}$$

Analisis Data

Data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk nilai rata – rata dan standart deviasi (Mean ± SD) untuk hasil penetapan kadar dan uji aktivitas antihiperglikemi. Hasil uji antihiperglikemi dilanjutkan pengolahan datanya menggunakan uji *Analysis of variance* (ANOVA) *one way* dengan program *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) untuk mengetahui perbedaan aktivitas penurunan kadar glukosa darah antar kelompok. Dilakukan Uji *LSD* untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan yang bermakna.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Ekstrak Terpurifikasi Kelopak Rosella

Tanaman rosella diperoleh dari kabupaten Kediri propinsi Jawa Timur yang sebelumnya telah dilakukan proses determinasi tanaman untuk mengidentifikasi kebenaran tanaman tersebut. Proses determinasi telah dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri. Proses purifikasi ekstrak dari kelopak rosella, menghasilkan

berat ekstrak kental 18,24 gram dengan rendemen sebesar 91,21%. Hasil rendemen suatu ekstrak menunjukkan tentang kualitas ekstrak yang diperoleh. Semakin besar rendemen yang dihasilkan maka akan berpengaruh terhadap kualitas ekstrak. Metode maserasi menggunakan maserasi karena memiliki banyak keuntungan yaitu proses yang mudah dan sederhana sehingga tidak memerlukan banyak waktu untuk mendapatkan ekstrak kental kelopak rosella (Mukhriani, 2014). Purifikasi ekstrak dilakukan setelah diperoleh ekstrak kental kelopak rosella yang kemudian dipartisi dengan pelarut sesuai sehingga menghasilkan ekstrak murni dengan pemberian dosis lebih kecil dibandingkan ekstrak kasar (Bambang *et al.*, 2012).

Tabel 1. Hasil Ekstrak Terpurifikasi Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Berat Ekstrak kental (g)	Pelarut	Berat Ekstrak Terpurifikasi (g)	Persentase Rendemen (% b/b)
20 gram	Kloroform 100 ml	18,24 gram	91,21%

Skrining Fitokimia Flavonoid

Skrining fitokimia merupakan proses awal untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dari suatu tanaman. Proses skrining fitokimia ini adalah mengidentifikasi senyawa flavonoid dalam ekstrak terpurifikasi kelopak rosella. Tujuan dilakukan skrining fitokimia adalah untuk mengetahui apakah dalam sampel tersebut mengandung senyawa yang diduga flavonoid secara kualitatif. Hasil proses skrining fitokimia menunjukkan bahwa dalam ekstrak terpurifikasi kelopak rosella diduga mengandung senyawa flavonoid karena terbentuk lapisan amil alkohol berwarna jingga dalam campuran sampel dengan reagen yang diidentifikasi secara kualitatif. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Lestari (2014) bahwa dalam skrining fitokimia flavonoid dengan mereaksikan filtrat hasil campuran sampel dengan akuades, kemudian ditambahkan serbuk Mg maka akan terjadi perubahan warna jingga pada lapisan amil alkohol.

Identifikasi Senyawa Flavonoid menggunakan KLT Densitometer

Senyawa flavonoid merupakan metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman rosella. Manfaat senyawa ini selain sebagai antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas, juga sebagai antihipertensi, antihiperlipidemi serta beberapa penyakit degeneratif lainnya. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Lukman (2018) pada uji KLT flavonoid dari ekstrak terpurifikasi kelopak rosella dengan pelarut etanol 96%, menghasilkan bercak berwarna biru menyala. Hal ini menunjukkan bahwa dalam ekstrak terpurifikasi kelopak rosella tersebut diduga positif mengandung senyawa golongan flavonoid yaitu kuersetin yang diamati pada UV 366. Penelitian lain yang dilakukan oleh Sari *et al.*, (2016) pada uji KLT secara kualitatif dari ekstrak etanol kelopak rosella dengan pelarut etanol 70%, menunjukkan hasil positif yang diduga terdapat senyawa golongan flavonoid yaitu kuersetin. Hasil positif tersebut ditunjukkan dengan harga R_f yang sejajar antara baku kuersetin dengan sampel serta fluoresensi warna kuning kehijauan pada UV 254. Terdapat perbedaan penelitian terdahulu dengan penelitian saat ini, yaitu sampel yang digunakan serta konsentrasi pelarut etanol, sehingga menghasilkan dugaan golongan senyawa flavonoid yang berbeda. Penelitian ini telah dilakukan identifikasi senyawa flavonoid menggunakan standar rutin sebagai baku pembanding untuk melihat adanya senyawa flavonoid pada Densitometri. Hasil menunjukkan positif bahwa dalam sampel mengandung senyawa yang diduga rutin, merupakan golongan senyawa flavonoid. Hasil positif

ini ditandai dengan harga R_f yang masih dalam kisaran rutin yaitu 0,14 – 0,28. Senyawa ini lebih bersifat polar, oleh karena itu digunakan eluen etil asetat:asam format:air (85:10:15), dengan perbandingan pelarut semi polar lebih besar agar bisa melarutkan senyawa semi polar hingga polar yang tidak dibutuhkan untuk uji aktivitas antihiperglikemi. Kadar rutin yang diduga dalam sampel ekstrak terpurifikasi kelopak rosella dapat dilihat dengan lebih jelas pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Kadar Rutin

Nama sampel	Kadar (%) Rata – rata $\pm$ SD	Dihitung Sebagai
Esktrak terpurifikasi kelopak rosella	9,62 $\pm$ 2,98	Rutin

Berdasarkan hasil kadar dari tabel di atas, ditemukan senyawa yang diduga rutin golongan flavonoid dalam ekstrak terpurifikasi kelopak rosella.

Uji Aktivitas Antihiperglikemi secara *In Vivo*

Ekstrak terpurifikasi kelopak rosella dilakukan uji aktivitas antihiperglikemi pada tikus Wistar dengan berbagai kelompok dosis, diantaranya kontrol negatif diberikan CMC-Na 0,5%, kontrol positif diberikan glibenklamid 0,45 mg/kg BB, kelompok perlakuan dosis ekstrak terpurifikasi 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 400 mg.kg BB. Proses identifikasi menggunakan Fotometer BS 3000 dengan panjang gelombang 546 nm. Identifikasi menunjukkan bahwa terdapat penurunan kadar glukosa darah pada semua kelompok. Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Rudi (2010) dari ekstrak kelopak bunga rosella dengan dosis 65, 130 dan 195 mg/kg BB terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan dalam menurunkan kadar glukosa darah. Hal tersebut menunjukkan bahwa rosella memiliki senyawa aktif yang berperan sebagai antihiperglikemi, tetapi efektifitasnya lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif glibenklamid. Penelitian saat ini, kelompok dosis 100 mg/kg BB terjadi penurunan kadar glukosa darah tertinggi 41,76 mg/dl, sedangkan dosis 200 mg/kg BB penurunan glukosa darah 35,18 mg/dl serta dosis 400 mg/kg BB terdapat penurunan kadar glukosa darah 33,94 mg/dl. Hasil penurunan kadar glukosa darah efektif terdapat pada kelompok dosis 100 mg/kg BB karena dapat menimbulkan efek antihiperglikemi pada hewan uji. Hal ini dikarenakan pada dosis tersebut sudah cukup banyak terdapat kadar senyawa aktif rosella yang diduga memiliki aktivitas sebagai antihiperglikemi. Berbeda dengan penelitian Rosemary *et al.*, (2014) terdahulu menyebutkan bahwa ekstrak kasar kelopak rosella memiliki aktivitas antihiperglikemi memerlukan perlakuan dosis hingga 600 mg/kg BB. Penelitian saat ini dari ekstrak terpurifikasi kelopak rosella dengan dosis 100, 200 dan 400 mg/kg memiliki perbedaan bermakna antara kelompok dosis serta kontrol positif, yang telah diuji secara statistik dan terdapat nilai signifikan $p < 0,05$. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak terpurifikasi kelopak rosella diduga mengandung senyawa flavonoid rutin yang memiliki aktivitas efektif dengan dosis kecil sebagai antihiperglikemi.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak terpurifikasi kelopak rosella diduga mengandung senyawa flavonid golongan rutin. Golongan senyawa tersebut diduga memiliki aktivitas yang efektif dengan dosis terkecil sebagai antihiperglikemi yang diujikan

pada tikus Wistar. Uji aktivitas menunjukkan bahwa dengan dosis terkecil 100 mg/kg BB dapat memberikan efek antihiperglikemi yang optimum.

DAFTAR PUSTAKA

- Arjadi, F., Susatyo, P. 2010. Regenerasi Sel Pulau Langerhans Pada tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Diabetes yang diberi Rebusan Daging mahkota (*Phaleria macrocarp* Lam). *Sains Medika* 2(2) : 117-126.
- Azizah, B., Salamah, N. 2013. Standarisasi Parameter Non Spesifik dan Perbandingan Kadar Kurkumin Ekstrak Etanol dan Ekstrak Terpurifikasi Rimpang Kunyit. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 3(1) : 21-30.
- Lestari, P. P., Kusriani, D., Anam, K. 2014. Anthocyanin Identification of Methanol-HCl Extract Active Fraction in Rosella (*Hibiscus sabdariffa*. L) and Its Potential as Xanthine Oxidase Inhibitor. *Jurnal Sains dan Matematika* 22(3) : 72-78.
- Lukman. 2018. *Aktivitas Antihiperglikemik Ekstrak Terpurifikasi Kelopak Rosella (Hibiscus sabdariffa L.) pada tikus Wistar dengan Induksi Sukrosa*. Skripsi. Kediri : Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata.
- Mukhrani, 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan* 7(2) : 361-367.
- Nugroho, C. A. 2013. Aktivitas Hipokolesterolimik Ekstrak Rosela (*Hibiscus Sabdariffa*) Pada Tikus Putih Diabetes. *Widya Warta* 1(1) : 1-14.
- Prameswari, O. M., & Widjanarko, S. B., 2014. Uji Efek Ekstrak Air Daun Pandan Wangi Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah dan Histopatologi Tikus Diabetes Mellitus. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 2(2) : 16-27.
- Putri, T. A., Ruyani, A., Nugraheni, E. 2017. Uji Efek Pemberian Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L) terhadap Kadar Glukosa dan Trigliserida Darah Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Sukrosa. *Jurnal Kedokteran Raflesia* 3(1) : 94-107.
- Rosemary, R., Rosidah, R., Haro, G. 2014. Antidiabetic Effect of Roselle Calyces Extract (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Streptozotocin Induced Mice. *International Journal of PharmTech Research* 6(5) : 1703-1711.
- Sari, F, Nurkhasanah, Bachri, M. S., 2016. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Kelopak Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Pada Tikus Sprague Dawley. *Traditional Medicine Journal* 21(1) : 12.
- Setiawan Rudi. 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap Penurunan Kadar Gula Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Aloksan. Tesis. Universitas Negeri Surakarta.
- Srijanto, B., Bunga, O., Khojayanti, L., Rismana, E. Sriningsih, 2012. Pemurnian Ekstrak Etanol Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Ness.) dengan Teknik Ekstraksi Cair-Cair. *Prosiding InSINas* : 26-29.