

Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas dari Infus Kelopak Bunga Rosella yang Difermentasi dengan *Lactobacillus*

Sartini, Christiana Lethe, dan Frengky

ABSTRACT: The research aimed to investigate the free radical scavenging activity of ethyl acetate fraction of roselle calyces infusion fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota against free radical agent, DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl). In sequence, the roselle calyces were extracted by infusion method with concentration at 5% w/v. The infusion was fermented using *Lactobacillus casei* strain Shirota during 3 x 24 hours at 37°C. As regard the fermentation process, the result of that was extracted using ethyl acetate. Free radical scavenging activity was measured using DPPH method with unfermented-ethyl acetate fraction as control negative. As the result, both fermented and unfermented-ethyl acetate fraction exhibited free radical scavenging activity at 370.68 ppm and 685.49 ppm, respectively. These results suggest that antioxidant activity of fermented-ethyl acetate fraction could be 1.85 greater than unfermented-ethyl acetate fraction of roselle calyces infusion.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L., *Lactobacillus casei* Shirota strain, free radical scavenging, DPPH

ABSTRAK: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas penangkapan radikal bebas dari fraksi etil asetat infus kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang difermentasi dengan *Lactobacillus casei* strain Shirota terhadap radikal bebas DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Kelopak bunga rosella diekstraksi dengan cara infudasi dengan konsentrasi 5 % b/v. Infus yang diperoleh difermentasi menggunakan kultur *Lactobacillus casei* strain Shirota dengan lama inkubasi 3 x 24 jam suhu 37°C. Hasil fermentasi diekstraksi dengan etil asetat. Pengujian aktivitas anti radikal bebas dilakukan dengan metode DPPH dan sebagai pembanding digunakan fraksi etil asetat infus rosella tanpa fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat tanpa fermentasi dan hasil fermentasi memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas dengan nilai konsentrasi penghambatan 50% (IC₅₀) berturut-turut, yaitu 685,49 bpj dan 370,68 bpj. Ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat dari hasil fermentasi kelopak bunga rosella 1,87 kali lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat dari infus bunga rosella tanpa fermentasi.

Kata kunci : *Hibiscus sabdariffa* L., *Lactobacillus casei* strain Shirota, antiradikal bebas, DPPH

Fakultas Farmasi, Universitas
Hasanuddin, Jl. Perintis Kemerdekaan
Km 10 Makassar

Korespondensi:

Sartini

Email : sardj@yahoo.com

PENDAHULUAN

Negara Indonesia berada di daerah tropis yang memiliki keanekaragaman tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan aktif obat dan atau kosmetika, salah satunya yaitu tanaman rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), familia *Malvaceae*. Kelopak bunga rosella mengandung komponen polifenol, antara lain: flavonoid gossipetin dan antosianin (sianidin-diglukosida dan sianidin-glukosil-rutinosida) yang merupakan pemberi pigmen pada kelopak bunga (1,2).

Komponen polifenol tanaman rosella diper-timbangkan memiliki aktivitas antioksidan, anti-bakteri, hipokolesterolemik, dan antihipertensi (3,4). Ekstrak etanol kelopak bunga rosella memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas terhadap DPPH (5).

Antosianin dalam kelopak bunga rosella merupakan flavonoid bentuk glukosida yang mudah larut dalam air panas. Glukosida memiliki kemampuan absorpsi yang lebih rendah, sementara bentuk aglikon (antosianidin atau sianidin) lebih cepat diabsorpsi karena memiliki sifat hidrofobik yang lebih besar dan bobot molekul yang lebih kecil (6,7), sebagai contoh aglikon dari isoflavon merupakan bahan yang digunakan pada obat-obatan dan sediaan kulit karena memberikan aktivitas biologis yang baik dibandingkan bentuk glukosidanya (7). Untuk memisahkan senyawa gula pada antosianin dengan aglikonnya, maka dapat dilakukan secara enzimatik dengan penam-bahan enzim β -glukosidase.

β -glukosidase merupakan enzim yang diproduksi oleh mikroorganisme selama proses fermentasi dan berperan penting dalam biokonversi glukosida menjadi bentuk aglikonnya (8). Telah dilakukan penelitian tentang aktivitas enzim β -glukosidase dari beberapa bakteri probiotik dan diperoleh hasil bahwa *Lactobacillus casei* menunjukkan aktivitas enzim β -glukosidase tertinggi jika dibandingkan bakteri lainnya (9). Penelitian sebelumnya juga memperoleh bahwa aktivitas antioksidan dari kacang kedelai yang difermentasi meningkat selama proses fermentasi

dan terdapat hubungan antara peningkatan kandungan bentuk aglikon isoflavonnya terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan (10,11).

Permasalahan yang timbul apakah fraksi etilasetat dari infus kelopak bunga rosella yang difermentasi dengan *Lactobacillus casei* memiliki kemampuan penangkapan radikal bebas DPPH lebih besar dibanding yang tidak difermentasi.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh fermentasi terhadap aktivitas penangkapan DPPH dari kelopak bunga rosella. Untuk itu telah dilakukan uji penangkapan radikal bebas DPPH dari fraksi etilasetat dari infus kelopak bunga rosella yang difermentasi dengan *L.casei* strain Shirota dan tanpa fermentasi secara in vitro.

METODE PENELITIAN

Bahan

Kelopak bunga rosella dipetik dari salah satu lokasi di Makassar, DPPH (Sigma), Media Mann Rogosa Agar (MRS agar), metanol dan etilasetat (Merck), aquadest.

Alat

Panci infus, fruit dehydrator, inkubator, oven (Memmert), Spektrofotometer UV-Vis (Agilent 8453), alat-alat gelas, dll.

Metode

Penyiapan Infus Rosella 5 % b/v.

Kelopak bunga rosella dikeringkan dalam *fruit dehydrator* selama 4 jam. Sampel kering 5 g dibasahi dengan air suling 20 ml, kemudian dimasukkan ke dalam panci infus, ditambahkan air suling 100 ml. Campuran tersebut kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90°C sambil sesekali diaduk. Infus diserkai selagi panas melalui kain flanel, dan ditambahkan air suling secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume infus 100 ml. Diukur nilai pHnya menggunakan kertas pH universal.

Fermentasi infus kelopak bunga rosella

1. Peremajaan *L.casei* strain Shirota
Medium MRS Agar sebanyak 5 ml dituangkan ke dalam tabung reaksi yang telah disterilkan terlebih dahulu, dimiringkan dan dibiarkan hingga memadat. Bakteri *Lactobacillus casei* digoreskan pada medium dan diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37°C.
2. Pembuatan Starter
Medium MRS Broth sebanyak 5 ml dituangkan ke dalam tabung reaksi yang telah disterilkan terlebih dahulu, ditambahkan inokulum *Lactobacillus casei* dari medium MRS Agar, kemudian ditambahkan infus Rosella 1% v/v, diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C.
3. Proses Fermentasi Larutan Infus
Larutan infus rosella sebanyak 50 ml dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer, dipanaskan suhu 90°C selama 15 menit untuk mematikan mikroba kontaminan, kemudian ditambahkan kultur *L. casei* sebanyak 10% v/v, dan diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37°C yang merupakan suhu optimum untuk *L. casei* strain Shirota (12).

Penyiapan Fraksi etil asetat

Hasil fermentasi sebanyak 50 ml dipindahkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan 50 ml etil asetat kemudian dikocok selama 15 menit. Diambil lapisan atas (etil asetat) dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental dari hasil fermentasi. Sebagai pembanding, Infus kelopak bunga rosella tanpa fermentasi diekstraksi dengan cara yang sama. Selanjutnya ekstrak fraksi etil asetat ditimbang dan dihitung % rendemennya.

Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Masing-masing ekstrak dilarutkan dengan metanol absolut, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT GF₂₅₄. Dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan terlebih dahulu dengan eluen kloroform:heksan (4:1), dan dibiarkan terelusi hingga batas atas lempeng, dikeringkan dan diamati penampakan nodanya pada lampu UV 366 nm.

Pengujian aktivitas penangkapan radikal bebas

Masing-masing fraksi etil asetat dilarutkan dalam metanol konsentrasi 1000 bpj sebagai larutan stok. Ekstrak etil asetat sebelum fermentasi dibuat seri konsentrasi 100 bpj hingga 400 bpj. Masing-masing larutan uji 100 µl ditambahkan larutan DPPH sebanyak 900 µl dan dicukupkan volumenya hingga 5000 µl dengan metanol. Campuran tersebut dikocok dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar dan pada ruangan yang terlindung dari cahaya (13). Absorbansinya diukur pada panjang gelombang 517nm. Selanjutnya dihitung persentase penangkapan radikal bebas menggunakan persamaan :

$$\% \text{ pengikatan radikal bebas} = \frac{\text{Absorban DPPH} - \text{Absorban Sampel}}{\text{Absorban DPPH}} \times 100\%$$

dan nilai IC₅₀ (50% Inhibitory Concentration) ditentukan dengan analisis probit. Makin kecil nilai IC₅₀ makin tinggi aktivitas penangkapan radikal bebasnya. Sebagai pembanding digunakan vitamin C dengan seri konsentrasi 20, 30, 40 dan 50 bpj.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi diperoleh rendemen dari fraksi etil asetat dari infus kelopak bunga rosella tanpa fermentasi (26,32 %) dan fermentasi (21,12 %) dapat dilihat pada tabel 1. Cukup tingginya rendemen yang dihasilkan karena fraksi etil asetat yang diperoleh ternyata masih mengandung komponen asam organik, hal ini dibuktikan dengan diperolehnya pH larutan dari fraksi etil asetat antara 4 -5.

Dari tabel 1 terlihat rendemen fraksi etil asetat tanpa fermentasi lebih besar dibandingkan dengan hasil fermentasi, hal ini diduga bahwa antosianin yang terdapat dalam fraksi etil asetat telah mengalami hidrolisis secara enzimatik membentuk aglikonnya yang bobot molekulnya lebih kecil

karena melepaskan gulanya oleh adanya enzim β -glukosidase yang dihasilkan oleh *L. casei* selama fermentasi sedangkan fraksi yang tanpa fermentasi masih dalam bentuk glikosida (6,7). Hal ini ditunjang oleh adanya perbedaan jarak dan jum-

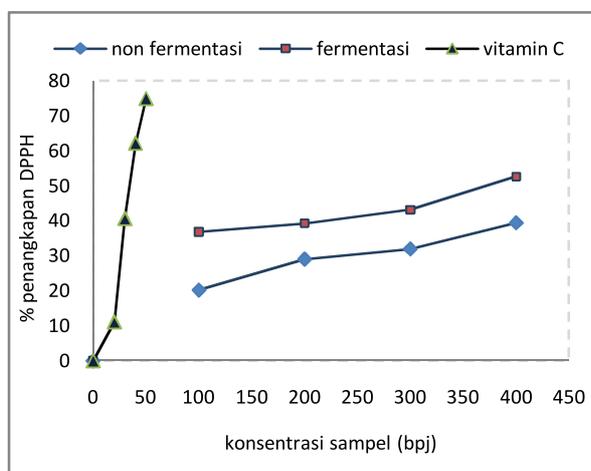
lah noda pada kromatogram hasil kromatografi lapis tipis (KLT), dimana pada totalan pertama (tanpa fermentasi) terdapat satu noda sementara pada totalan kedua (dengan fermentasi) terdapat dua noda, Hasil KLT dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 1. Persentase Rendemen Dari Fraksi Etil Asetat Infus Kelopak Bunga Rosella

Sampel	Bobot simplisia (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
Tanpa fermentasi	2,5	0,658	26,32
Fermentasi	2,5	0,528	21,12



Gambar 1. Kromatogram Hasil KLT Ekstrak Etil Asetat Kelopak Bunga Rosella Menggunakan Lempeng KLT GF254 Eluen Kloroform : Heksan (4 : 1) Dibawah Sinar UV 366, a. sebelum fermentasi b. fermentasi



Gambar 2. Prosentase Penangkapan Radikal Bebas DPPH Dari Vitamin C, Fraksi Etil Asetat Kelopak Bunga Rosella Fermentasi Dan Non Fermentasi.

Hasil uji aktivitas penangkapan radikal bebas terhadap DPPH menunjukkan kemampuan dari kedua fraksi etil asetat menangkap radikal bebas DPPH, Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2. Fraksi etil asetat dari infus rosella yang difermentasi memperlihatkan persentase penangkapan radikal bebas lebih besar dibanding tanpa fermentasi. Hasil perhitungan IC_{50} diperoleh fraksi etil asetat dari infus rosella yang difermentasi memperlihatkan nilai IC_{50} penangkapan radikal bebas lebih kecil dibanding tanpa fermentasi, yaitu masing-masing sebesar 370,68 bpj dan 685,49 bpj. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat setelah fermentasi menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan sebesar 1,87 kali dibandingkan fraksi etil asetat sebelum fermentasi, Vitamin C yang digunakan sebagai kontrol positif menunjukkan aktivitas antiradikal bebas yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak etil asetat setelah fermentasi, yaitu IC_{50} vitamin C 35,40 bpj, hal ini dapat disebabkan karena ekstrak yang digunakan belum senyawa murni, sedangkan vitamin C merupakan senyawa murni.

Hasil penelitian sebelumnya oleh Yang *et al* diperoleh IC_{50} ekstrak air kelopak bunga rosella $486,52 \pm 10,56$ dan IC_{50} ekstrak etanol 30% $289,01 \pm 16,68$ (13).

DAFTAR PUSTAKA

1. Mahadevan N, Shivali, and Kamboj P. *Hibiscus sabdariffa Linn, An Overview*. Natural Product Radiance;2009. 8 (1):77-83.
2. Carvajal-Zarrabal O, Maria D, Barradas-Dermitz, Orta-Flores, Z. Margaret P, Hayward-Jones *et al*. *Hibiscus sabdariffa L., Roselle Calyx, from Ethnobotany to Pharmacology*. Journal of Experimental Pharmacology.2012.4:25-39.
3. Olaleye and Tolulope M. *Cytotoxicity and antibacterial activity of Methanolic extract of Hibiscus sabdariffa*. Journal of Medicinal Plants Research.2007. 1(1): 009-013.
4. Tsai P, McIntosh J, Pearce P, Camden B, Jordan BR. *Anthocyanin and Antioxidant Capacity in Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) extract*. Food Research International. 2002. 35(4): 4351-356.
5. Yang L, Ying G, Ting Z, Jiangli Z, Fang L, Bingtao Z and Xiangyang W. *Antioxidant Capacity of Extracts from Calyx Fruits of roselle (Hibiscus sabdariffa L.)*. African Journal of Biotechnology. 2012. 11 (17): 4063-4068.
6. Kano M, Takayanagi T, Harada K, Sawada S, & Ishikawa F. *Bioavailability of Isoflavones after Ingestion of Soy Beverages in Healthy Adults*. 2011.186-8650. The Journal of Nutrition. 2006. 136(9):2291-2296.
7. Kren V, and Martínková L. *Glycosides in Medicine: The Role of Glycosidic Residue in Biological Activity*. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic. Czech Republic.

- 2001.8(11):1303-28.
8. Sumarna. *Hydrolysis of bioactive isoflavone in soymilk fermented with β -glucosidase producing lactic acid bacteria from local fermented foods of Indonesian*. Department of Food and Biotechnology. Indonesian Institute of Sciences, Yogyakarta. 2009.6(1): 30-40.
 9. Otieno DO. *Stability of Bioactive Isoflavones and Glycolytic Enzyme Produced by Probiotic Bacteria in Soy Based Food During Processing and Storage*. Thesis. Faculty of Science, Engineering and Technology Victoria University School of Molecular Sciences. Australia. 2007.3-5
 10. Chaiyavat C, Thapana K, Pramote T, & Wandee R,. *Isoflavone Content and Antioxidant Activity of Thai Fermented Soybean and Its Capsule Formulation*. *African Journal of Biotechnology*. 2010.28; 9(26) : 4120-4126
 11. Rahman L, Djide MN, Husnul. *Pengaruh Fermentasi Sari kedelai dengan *Lactobacillus sp* terhadap Kadar dan Profil KLT Genestein serta Formulasinya dalam Granul Efeverfesen*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian*. 2012. 10(2): 126-131.
 12. Heimbach J. *Generally Recognized as Safe (GRAS) Determination for the Use of *Lactobacillus casei* Strain Shirota As a Food Ingredient*. LLC Port Royal Virginia, USA : 2012.
 13. Yang L, Gou Y, Zhao T, Zhao J, Li F, Zhang B, and Wu X. *Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)* *African Journal of Biotechnology*. 2012. 11(17): 4063-4068.