

ANALISIS AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN KANDUNGAN ANTOSIANIN TOTAL EKSTRAK DAN LIPOSOM KELOPAK BUNGA ROSELLA (*Hibiscus Sabdariffa* L.)

ANALYSIS ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL ANTHOCYANIN CONTENT IN EXTRACT AND LIPOSOME OF ROSELLE (*Hibiscus Sabdariffa* L.) CALYX

I Gede Agus Juniarka^{1*}, Endang Lukitaningsih², Sri Noegrohati²

¹Program Pasca Sarjana Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Skip Utara 55281, Yogyakarta

²Bagian Kimia Analisis Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Skip Utara 55281, Yogyakarta

ABSTRAK

*Formulasi bentuk liposom merupakan salah satu cara yang diaplikasikan untuk mengatasi keterbatasan stabilitas antosianin dalam ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang mudah rusak oleh faktor lingkungan. Pada penelitian ini dilakukan analisis perbandingan aktivitas antioksidan dan kandungan total antosianin ekstrak dan bentuk liposom kelopak bunga rosella. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan maserasi bertingkat dengan metanol:asam format (97:3) sebagai cairan penyari yang paling baik dari segi rendemen (26,40% b/b) dan aktivitas antioksidan (uji hambatan DPPH) yang dihasilkan (19,991% ± 0,001) bila dibandingkan terhadap hasil maserasi menggunakan kombinasi pelarut etanol, metanol, dan akuades. Liposom dibuat dari ekstrak metanol kelopak bunga rosella dengan metode fase terbalik. Hasil uji stabilitas dengan penyimpanan selama 30 hari pada suhu rendah (0-5°C) dalam wadah jenuh nitrogen menunjukkan penurunan 11,25% aktivitas antioksidan (uji DPPH) bentuk ekstrak, sedangkan bentuk liposom hanya mengalami penurunan sebesar 0,93%. Demikian pula pada stabilitas kandungan antosianin total, dimana ekstrak kelopak bunga rosella mengalami penurunan sebesar 39,12% sedangkan bentuk liposom hanya mengalami penurunan 0,72%. Lebih lanjut, hasil uji iritasi menunjukkan bentuk liposom memiliki iritasi yang lebih rendah dibandingkan bentuk ekstrak kelopak bunga rosella. Oleh karena itu, disimpulkan bahwa antosianin terenkapsulasi liposom lebih stabil, efektif, dan aman bila dibandingkan dengan bentuk ekstrak metanol kelopak bunga rosella.*

Kata kunci : rosella, liposom, stabilitas, antioksidan, antosianin.

ABSTRACT

*The form of liposome formulations is one of strategies to overcome the limitations of anthocyanin extract stability of roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.). In this study, antioxidant comparative analysis of antioxidant activity and total anthocyanin content from roselle extract and its liposomes form was conducted. Preparation of extract made by maceration using the best solvent consisted of methanol : formic acid (97:3) (v/v). From this procedure, the obtained extract was about 26.40% and antioxidant activity was 19.99%. Liposome formulations of methanol extract from roselle calyx were prepared by reverse phase method using roselle extract as aqueous phase and egg lecithin as the lipid phase. The stability of extract and liposome form of roselle calyx was compared. The stability study showed that there was a reduction of antioxidant activity (DPPH test) 11.25 % for the roselle extract, while the liposome form was 0.93% after 30 days storage in low temperature (0-5°C) and saturated nitrogen. In addition, total anthocyanin content (pH differential method test) decreased approximately 39.12 % for the roselle extract and 0.72% for the liposome form. More over, the liposome had lower level of irritation than the form of extract. Therefore, it can be concluded that anthocyanin encapsulated by liposome was more stable, safe, and effective than the anthocyanin of the roselle calyx extract.*

Key words : rosella, liposome, stability, antioxidant anthocyanin.

PENDAHULUAN

Belakangan ini berbagai penelitian mengenai senyawa aktif nabati dan hewani yang memiliki aktivitas antioksidan mulai banyak dikembangkan, salah satu diantaranya yaitu pemanfaatan bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang dipercaya memiliki aktivitas antioksidan terkait dengan kandungan fenolik di dalamnya (Cerezo dkk., 2010). Namun, antosianin yang umumnya menjadi fokus pada penelitian aktivitas antioksidan pada kelopak bunga rosella bersifat kurang stabil dalam larutan netral atau basa, dan bahkan dalam larutan asam warnanya dapat memudar perlahan-lahan akibat terpapar cahaya (Harborne, 1973). Hal inilah yang menjadi salah satu permasalahan pengembangan berbagai bentuk formulasi sediaan antioksidan yang berasal dari kelopak bunga rosella. Salah satu solusi yang digunakan untuk menanggulangi keterbatasan stabilitas antosianin tersebut adalah melalui formulasi ekstrak antosianin dalam bentuk vesikel lipid bilayer yang dikenal dengan liposom. Adanya lapisan lipid bilayer pada liposom tersebut diharapkan mampu meningkatkan stabilitas antosianin sehingga secara tidak langsung dapat mempertahankan aktivitas antioksidannya.

Aplikasi vesikel liposom dengan kandungan senyawa aktif yang berasal dari alam ini perlu mendapat perhatian terkait dengan sifat fisika-kimia senyawa yang terkapsulasi di dalamnya maupun vesikel liposom itu sendiri. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan analisis perbandingan antara bentuk ekstrak dan liposom dengan kandungan antosianin yang berefek sebagai antioksidan yang berasal dari kelopak bunga rosella. Studi yang dilakukan meliputi optimasi ekstraksi bahan, uji aktivitas antioksidan, kandungan antosianin, pembuatan liposom, serta studi perbandingan aktivitas, stabilitas, dan keamanan antara bentuk ekstrak dengan bentuk liposom kelopak bunga rosella.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Korespondensi : I Gede Agus Juniarka
Program Pasca Sarjana, Fakultas Farmasi UGM
Email : motfarmasi@yahoo.co.id

kering (digunakan saat optimasi ekstraksi) dan segar (digunakan dalam pembuatan liposom), Butil Hidroksi Toluena (BHT), 1,1- Difenil-2- Pikrilhidrazil (DPPH), asam format teknis, methanol teknis, etanol teknis, etanol pro analisis

(Merck, Jerman), buffer potassium klorida (KCl) 0,24 N pH 1,0 , buffer sodium asetat (Na asetat) 0,025 N pH 4,5, asam klorida (HCl) 37% (Merck, Jerman), asam asetat glasial (Merck, Jerman), buffer posfat (terdiri dari NaCl, KCl, Na₂HPO₄, dan KH₂HPO₄) (Merck, Jerman), *egg lecithin* dan kolesterol (Sigma Aldrich, Jerman), akuades dan akuabides. Jika tidak disebutkan lain, bahan-bahan yang digunakan berderajat pro analisis. Bunga rosella segar yang digunakan adalah bagian kelopak bunga (*calyx*). Untuk uji iritabilitas digunakan hewan percobaan kelinci jantan jenis New Zealand white berusia 4 bulan.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca elektrik (SHIMADZU, type LS-6DT, Jepang), rotary evaporator (Heidolph, WB 2000), sonikator Branson 350, oven Memmert 100-800 Spektrofotometri UV-Vis (Spectronic® 20 Genesys TM), sentrifugator, aluminium foil, mikropipet, oven, waterbath, mikroskop Olympus CH 30 RF 200 dan perangkat computer PC Acer Pentium 4, cawan porselen, lemari es dan peralatan gelas. Penelitian ini akan dilakukan di laboratorium analisis farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Determinasi tanaman dilakukan di bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.

Jalannya Penelitian

Ekstraksi kandungan senyawa flavonoid dari kelopak bunga rosella

Kelopak bunga rosella diekstraksi secara maserasi bertingkat selama 24 jam. Hasil optimasi pelarut yang diperoleh untuk mengekstraksi kandungan senyawa flavonoid yang berefek antioksidan pada kelopak bunga rosella dilakukan dengan enam larutan pengekstrak, yaitu : etanol (100%) (v/v); metanol (100%) (v/v) ; metanol (50%):etanol (50%) (v/v); metanol (75%): etanol (25%) (v/v); metanol (25%):etanol (75%) (v/v); akuades. Pembuatan ekstrak kental rosella dilakukan dengan metode maserasi bertingkat dengan penambahan asam format 3%. Sebanyak lebih kurang 25 gram kelopak bunga rosella yang sudah dikeringkan dipersiapkan, emudian dimaserasi dengan 250,0 mL enyari dalam Erlenmeyer yang tertutup aluminium foil seluruhnya minimal selama 24 jam, disimpan dalam lemari pendingin.

Filtrat yang didapatkan kemudian dikumpulkan dan diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 40^o. Dilakukan uji aktivitas antioksidan metode DPPH dan kandungan total antosianin masing-masing ekstrak.

Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak rosella

Aktivitas antioksidan ditentukan dengan metode DPPH yang dilaporkan menurut Zakaria, dkk (2008), menggunakan 1,0 mL DPPH 0,4 mM. Absorbansi larutan dibaca pada λ_{maks} hasil *scanning* panjang gelombang.

BHT digunakan sebagai pembanding. Persentase penangkapan radikal bebas dinyatakan sebagai persen inhibisi dan dihitung dengan rumus:

$$\% \text{inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi (kontrol)} - \text{Absorbansi (sampel)}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Besarnya aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai IC₅₀ yang dihitung dari kurva baku regresi linier antara konsentrasi larutan dan % inhibisi.

Analisis kandungan antosianin total

Analisis kandungan antosianin dilakukan dengan metode *pH Differential Method* (Giusti *et al.*, 2001). Sejumlah volume tertentu dari ekstrak rosella dilarutkan dalam dua larutan buffer yang berbeda. Larutan pertama dilarutkan dengan 0,025 M buffer KCl pH 1,0 dan larutan lainnya dilarutkan dalam 0,4 M buffer natrium asetat pH 4,5. Jumlah sampel yang digunakan diatur sehingga menghasilkan absorbansi pada $\lambda_{vis-maks}$ memberikan nilai absorbansi yang berada pada rentang linier dari spektrofotometer. Dilakukan pula *scanning* panjang gelombang pada rentang 200nm – 750 nm untuk larutan sampel pada kedua buffer (KCl dan Natrium Asetat) untuk determinasi kandungan antosianin dan penentuan $\lambda_{vis-maks}$ pengukuran sampel. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi masing-masing larutan dan hasilnya dikalkulasikan berdasarkan persamaan berikut.

$$A = (A_{\lambda_{vis-maks}} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{\lambda_{vis-maks}} - A_{700nm})_{pH4,5}$$

Total monomerik antosianin dari ekstrak kering rosella dihitung sebagai cyaniding-3-glucoside berdasarkan persamaan berikut.

$$MAP(\text{mg/L}) = \left[\frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon} \right] \times 1$$

keterangan:

A : Absorbansi larutan

MW : *Molecular weight* (berat molekul)

DF : *Dilution factor* (factor pengenceran)

ϵ : Absorptivitas molar cyaniding-3-glucoside

b : tebal kuvet = 1

MAP : *Monomeric Anthocyanin Pigment*

Catatan : MW dan ϵ yang digunakan terkait dengan antosianin dominan yang terdapat dalam sampel. Digunakan ϵ pigmen antosianin dalam larutan asam yang terdapat pada literatur. Jika nilai ϵ dari mayor pigmen tidak tersedia, atau jika komposisi sampel tidak diketahui, maka pigmen dikalkulasi sebagai cyaniding-3-glucoside, dengan MW = 449,2 dan ϵ = 26.900) (Giusti dkk., 2001).

Selanjutnya dilakukan pembuatan kurva baku antara konsentrasi (dari volume ekstrak yang diuji) terhadap jumlah total monomerik.

Penentuan rendemen

Sampel dikeringkan dalam oven dengan suhu 105^o C sampai diperoleh bobot konstan. Persentase rendemen dihitung terhadap bobot bahan yang diekstraksi, yaitu 25 gram.

Formulasi liposom

Formulasi liposom dilakukan dengan metode fase terbalik (*reverse phase*) (Szoka, dkk., 1978). Pelarut organik pada fase lipid (*egg lecithin* dan kolesterol) diuapkan menggunakan rotary evaporator. Kemudian ditambahkan fase air (dapat posfat dan ekstrak metanol kelopak bunga rosella). Dilakukan sonikasi terhadap suspensi liposom hingga menghasilkan satu fase. Selanjutnya dilakukan analisis stabilitas produk liposom yang dihasilkan dengan membandingkan aktivitas antioksidan dan *entrapment efficiency* liposom yang dihasilkan dengan nilai aktivitas antioksidan dan *entrapment efficiency* liposom setelah penyimpanan selama 1 bulan (30 hari). Penyimpanan dilakukan pada dua kondisi penyimpanan yang berbeda, yaitu pada suhu rendah dalam wadah jenuh nitrogen dan pada suhu kamar tanpa penjujukan dengan nitrogen. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui kondisi penyimpanan yang efektif terhadap liposom yang dihasilkan.

Determinasi efisiensi enkapsulasi liposom

Efisiensi enkapsulasi diukur setelah dilakukan pemisahan terhadap ekstrak rosella yang tidak terjerap dalam liposom dengan cara sentrifugasi. Sebanyak 1 mL suspensi liposom disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit dengan kecepatan rpm, pada suhu rendah (0-4^o C). Kemudian diambil bagian bening (supernatant) dari hasil sentrifugasi kemudian dianalisis kandungan antosianinnya. Kandungan total antosianin dalam 1 mL sediaan yang diuji diukur dengan memecah vesikel lapisan lipid ganda menggunakan Triton X-100 (10%, 1:1). Kemudian, efisiensi enkapsulasi diukur dengan membandingkan kandungan total antosianin bebas (supernatant hasil sentrifugasi) dengan kandungan total antosianin suspensi liposom, menggunakan persamaan berikut :

Entrapment efficiency = $[1 - (RE_F/RE_T)] \times 100\%$
 keterangan :

RE_F : kandungan antosianin pada filtrat (antosianin bebas).

RE_T : kandungan antosianin total dari suspensi liposom. (Pinsuwan dkk., 2010).

Selain itu, dilakukan pula perbandingan aktivitas antioksidan filtrat (supernatan hasil sentrifugasi) terhadap aktivitas antioksidan dari suspensi liposom total (tanpa sentrifugasi).

$$\% EE = \left[1 - \frac{\text{Antioksidan supernatant}}{\text{Antioksidan total}} \right] \times 100\%$$

keterangan: *Entrapment Efficiency*

Determinasi ukuran vesikel

Pengukuran ukuran partikel vesikel dari suspensi liposom yang dihasilkan dilakukan dengan menggunakan mikroskop setelah sebelumnya suspensi liposom disaring dengan saringan membran berukuran 0,2 mm untuk mengurangi gangguan partikulat yang berukuran besar.

Studi stabilitas liposom

Dilakukan evaluasi terhadap sediaan liposom yang dihasilkan terhadap stabilitas fisika berupa warna dan tampilan fisik liposom setelah penyimpanan selama 1 bulan pada suhu 4°C jenuh nitrogen dan penyimpanan pada suhu ruangan. Hasil yang diperoleh dibandingkan terhadap bentuk ekstrak metanol.

Uji iritasi eksfolian ekstrak rosella

Uji iritasi dilakukan pada ekstrak kental dan suspensi liposom yang dihasilkan. Pengujian dilakukan dengan hewan percobaan kelinci putih jenis New Zealand white sesuai dengan *Guideline (TG) for testing chemical No. 404* dari OECD (Anonim, 2001). Rambut kelinci bagian epidermal pada punggung kelinci dicukur dengan ukuran 2,5 x 2,5 cm² untuk diujikan 0,5 mL sediaan, baik suspensi liposom maupun ekstrak rosella dituangkan pada 2,5 x 2,5 cm² patch. Patch kemudian diaplikasikan selama 4 jam pada bagian punggung kelinci yang telah dicukur bulunya. Digunakan aquabidest sebagai kontrol dan HCl pH 2,0 sebagai kontrol positif. Dilakukan pengamatan *erythema* maupun *udem* yang terjadi pada jam ke-1, 24, 48, dan 72. Untuk kontrol positif digunakan Asam Klorida pH 2,0.

Analisis data

Data yang dihasilkan dalam penelitian ini dianalisis secara statistik, berupa nilai rata-rata

dan SD dengan minimal 3 kali replikasi. Dilakukan perhitungan IC₅₀, yaitu konsentrasi ekstrak yang menghasilkan hambatan 50% terhadap DPPH berdasarkan kurva baku antara konsentrasi ekstrak rosella dan % hambatan DPPH. Perbandingan dengan uji regresi antara slope kurva baku % hambatan DPPH dan slope kurva baku kandungan antosianin total dilakukan untuk mengetahui kaitan antara konsentrasi antosianin terhadap daya antioksidan rosella. Analisis perbedaan antar 2 kelompok data dilakukan dengan *t-test*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

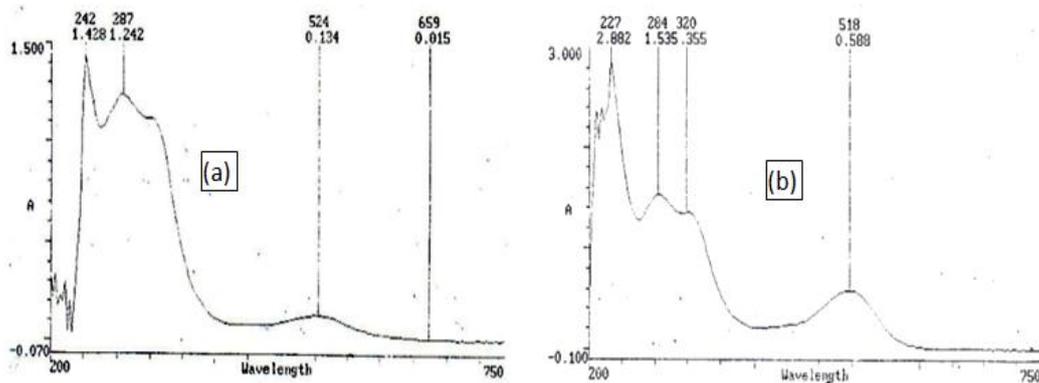
Optimasi Ekstraksi

Dari serangkaian kombinasi pelarut yang digunakan pada proses maserasi ini diperoleh hasil bahwa pelarut yang paling optimal untuk ekstraksi senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan pada kelopak bunga rosella adalah metanol 96% (Tabel I). Hal ini ditunjukkan oleh kemampuan aktivitas antioksidan ekstrak metanol kelopak bunga rosella paling tinggi diantara pelarut lainnya setelah dilakukan pengujian dengan metode DPPH untuk 20 mikroliter ekstrak, yaitu menghasilkan hambatan DPPH sebesar 19,99% ($\pm 0,0005$) dan menghasilkan rendemen yang paling besar yaitu 26,40% b/b terhadap berat kering kelopak bunga rosella.

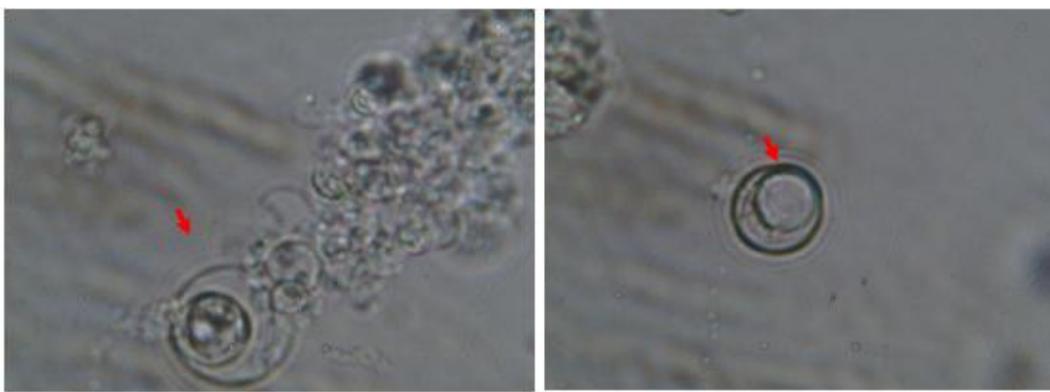
Analisis Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Total Antosianin Ekstrak Metanolik Kelopak Bunga Rosella

Diperoleh hasil bahwa konsentrasi ekstrak metanolik kelopak bunga rosella yang dibutuhkan untuk terjadinya 50% penghambatan radikal DPPH (IC₅₀) sebesar 16,59 ($\pm 0,0060$) mg/mL dan nilai IC₅₀ untuk BHT sebesar 10,42 ($\pm 0,1077$) mg/mL. Dari nilai tersebut tampak bahwa ekstrak metanolik kelopak bunga rosella yang digunakan memiliki aktivitas antioksidan yang cukup poten walau tidak lebih poten dari BHT.

Kandungan penting yang terdapat pada kelopak bunga rosella adalah pigmen antosianin yang berperan sebagai antioksidan.



Gambar 1. Hasil scanning sampel dalam larutan buffer KCl pH 1,0 (a) dan NaAsetat pH 4,5 (b) pada λ 200-750 nm



Gambar 2. Pengamatan mikroskopik liposom dengan perbesaran 1000x

Tabel I. Perhitungan Uji Hambatan DPPH masing- masing pelarut

NO.	Cairan pengestrak	% hambatan DPPH	SEM	% rendemen
I	Etanol 100%	14,81	0,0005	19,82
II	Metanol 100%	19,99	0,0005	26,40
III	Etanol : Metanol (50:50)	15,86	0,0002	15,07
IV	Etanol : Metanol (25:75)	3,81	0,0005	22,19
V	Etanol : Metanol (75:25)	5,64	0,0006	21,08
VI	akuadest	7,15	0,0003	19,02

Flavonoid rosela terdiri flavanols dan pigmen antosianin (Hirunpanich dkk, 2005). Untuk itu, pada penelitian ini dilakukan determinasi dan pengukuran kandungan antosianin dalam ekstrak kelopak bunga rosela. Determinasi keberadaan antosianin secara kualitatif dilakukan dengan melakukan *scanning* pada panjang gelombang 200-750 nm terhadap sampel yang dilarutkan berada dalam kedua kondisi pH buffer yang berbeda tersebut. Pada suasana asam pH 1,0, antosianin akan menghasilkan puncak khas hanya pada daerah

visible antara 500-550 nm (Harbone, 1957). Sedangkan pada kondisi pH 4,5, kandungan antosianin akan menunjukkan puncak-puncak pada daerah spectra UV antara 250-350 nm, sebagaimana tampak pada Gambar 1.

Dari uji regresi yang dilakukan antara variabel bebas (kandungan antosianin total) dengan variabel tergantung (aktivitas antioksidan) yang dilakukan diperoleh nilai linieritas (R^2) sebesar 0,9253 ($\pm 0,0016$).

Tabel II . Uji stabilitas ekstrak metanolik kelopak bunga rosella (setelah penyimpanan selama 30 hari pada suhu rendah)

Perbandingan	Kondisi	Nilai	Keterangan
aktivitas antioksidan (uji DPPH)	Awal	38,22 %	Terjadi penurunan 11,25 %; Hasil uji t : berbeda signifikan (t hitung = 4,21)
	Akhir (penyimpanan dingin)	33,93 %	
kandungan total monomerik antosianin	Awal	3,56 mg/L	Terjadi penurunan 39,12 %; Hasil uji t : berbeda signifikan (t hitung = 6,77)
	Akhir (penyimpanan dingin)	2,17 mg/L	

Tabel III. Hasil uji stabilitas liposom kelopak bunga rosella setelah penyimpanan selama 30 hari (Hasil Uji Stabilitas Berdasarkan Aktivitas Antioksidan Sampel)

Perbandingan	Kondisi	Nilai	Keterangan
Antioxidant activity (DPPH test)	Awal	30,11	Terjadi penurunan 0,93 % ; Hasil uji t : tidak berbeda signifikan (t hitung = 0,15)
	Akhir (penyimpanan dingin)	29,83	
	Awal	30,11	Terjadi penurunan 24,96 %; Hasil uji t : berbeda signifikan (t hitung = 24,06)
	Akhir (penyimpanan suhu kamar)	22,59	
<i>Entrapment efficiency</i>	Awal	72,06	Terjadi penurunan 3,54 %; Hasil uji t : tidak berbeda signifikan (t hitung = 1,40)
	Akhir (penyimpanan dingin)	69,51	
	Awal	72,06	Terjadi penurunan 11,77 %; Hasil uji t berbeda signifikan : (t hitung = 5,40)
	Akhir (penyimpanan suhu kamar)	63,58	

Nilai positif menunjukkan bahwa kandungan antosianin total memiliki pengaruh yang positif terhadap aktivitas antioksidan sampel. Regresi menghasilkan nilai sebesar 0,9253 yang berarti kandungan antosianin total memiliki pengaruh yang sangat kuat terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Hasil perhitungan uji-t menghasilkan nilai t hitung sebesar 13,34, dimana nilai t-tabel untuk n = 4 dengan taraf kepercayaan 95% adalah 3,182 (Mursyidi, 1984). Nilai tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan diantara kedua nilai, yaitu slope kurva baku aktivitas antioksidan (penghambatan DPPH) dengan slope kurva baku kandungan antosianin total. Dengan demikian, kandungan antosianin total bukan merupakan

faktor utama dan bukan satu- satunya yang berpengaruh pada aktivitas antioksidan kelopak bunga rosella, sehingga terdapat faktor lain yang mempengaruhi aktivitas antioksidannya.

Stabilitas Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Antosianin Total dalam Ekstrak dan Liposom Kelopak Bunga Rosella

Penilaian stabilitas dilakukan dengan membandingkan aktivitas antioksidan (uji DPPH) dan kandungan monomerik antosianin total ekstrak metanol sesaat setelah dibuat dan setelah 30 hari penyimpanan pada suhu rendah (0°C- 5°C) dalam wadah jenuh nitrogen.

Tabel IV. Hasil uji stabilitas liposom kelopak bunga rosella setelah penyimpanan selama 30 hari (Hasil Uji Stabilitas Berdasarkan kandungan total monomerik antosianin)

Perbandingan	Kondisi	Nilai	Keterangan
kandungan total antosianin 1mL liposom (% hambatan DPPH)	Awal	7,92	Terjadi penurunan 0,72 % ; Hasil uji t : tidak berbeda signifikan (t hitung = 0,88)
	Akhir (penyimpanan dingin)	7,86	
	Awal	7,92	Terjadi penurunan 3,42 %; Hasil uji t : berbeda signifikan (t hitung = 6,23)
	Akhir (penyimpanan suhu kamar)	7,64	
Entrapment efficiency	Awal	66,96	Terjadi penurunan 4,76 %; Hasil uji t : berbeda signifikan (t hitung = 3,26)
	Akhir (penyimpanan dingin)	63,78	
	Awal	66,96	Terjadi penurunan 9,71 %; Hasil uji t : berbeda signifikan (t hitung = 12,87)
	Akhir (penyimpanan suhu kamar)	60,46	

Tabel V. Hasil pengamatan (*scoring*) uji iritasi kelinci saat diaplikasikan liposom kelopak bunga rosella.

Kelinci NO.	Waktu pengamatan (jam ke-)							
	1		24		48		72	
	erhytoma	udema	erhytoma	udema	erhytoma	udema	erhytoma	udema
I	1	0	1	0	0	0	0	0
II	1	0	1	0	0	0	0	0
III	1	0	0	0	0	0	0	0

Tabel VI. Hasil pengamatan (*scoring*) uji iritasi kelinci saat diaplikasikan ekstrak metanolik kelopak bunga rosella.

Kelinci NO.	Waktu pengamatan (jam ke-)							
	1		24		48		72	
	erhytoma	Udema	erhytoma	udema	erhytoma	udema	erhytoma	udema
I	1	0	1	0	1	0	0	0
II	1	0	1	0	0	0	0	0
III	1	0	1	0	1	0	0	0

Dari hasil yang diperoleh (tabel II) diketahui bahwa terjadi penurunan aktivitas antioksidan dan kandungan antosianin total yang cukup berarti terhadap ekstrak metanol kelopak bunga rosella setelah 30 hari penyimpanan pada suhu rendah (0° C- 5° C)

dalam wadah jenuh nitrogen. Hasil uji-t menunjukkan bahwa terdapat perbedaan

yang signifikan antara nilai awal dan nilai setelah 30 hari penyimpanan akibat penurunan yang terjadi.

Dilakukan pengamatan mikroskopik terhadap liposom kelopak bunga rosella menggunakan mikroskop Olympus CH 30 NDA yang dilengkapi dengan camera dan terintegrasi dengan suatu sistem computer (Acer, Pentium 4).

Tabel VI. Hasil pengamatan (*scoring*) uji iritasi kelinci saat diaplikasikan ekstrak metanolik kelopak bunga rosella.

Kelinci NO.	Waktu pengamatan (jam ke-)							
	1		24		48		72	
	erhytoma	Udema	erhytoma	udema	erhytoma	udema	erhytoma	udema
I	1	0	1	0	1	0	0	0
II	1	0	1	0	0	0	0	0
III	1	0	1	0	1	0	0	0

Dari hasil pengamatan mikroskopik dengan perbesaran 1000x (Gambar 2) diperoleh hasil partikel liposom yang berbentuk bulat dengan ukuran yang relatif seragam dan seragam (> 100 nm). Partikel liposom terbesar yang teramati memiliki diameter 195 nm dan partikel terkecil yang teramati memiliki diameter 97,4 nm dengan rata-rata diameter vesikel 135,46 nm (n=12, SD= 31,23).

Uji iritasi menunjukkan bahwa bahwa sediaan liposom yang dihasilkan pada penelitian ini bersifat aman, tidak menimbulkan *erhytoma* maupun *udema* bila diaplikasikan pada kulit.

Dari hasil analisis yang telah dilakukan menunjukkan bahwa proses formulasi liposom metode fase terbalik pada penelitian ini menghasilkan efisiensi yang cukup tinggi. Hal ini ditunjukkan oleh nilai *entrapment efficiency* total saat awal produk liposom yang dihasilkan, dimana *entrapment efficiency* metode ditinjau dari aktivitas antioksidan (uji hambatan DPPH) memberikan nilai sebesar 72,06% ($\pm 2,75$) dan memberikan nilai efisiensi sebesar 66,96% ($\pm 0,82$) jika ditinjau berdasarkan kandungan total monomerik antosianin.

Produk liposom yang dihasilkan pada penelitian ini diuji stabilitasnya. Penilaian stabilitas liposom dilakukan dengan menyimpan produk liposom yang dihasilkan pada dua macam kondisi penyimpanan yang berbeda, yaitu pada suhu rendah (0°C -5° C) jenuh nitrogen dan pada suhu kamar (23°C -29°C) selama 30 hari. Wadah yang digunakan terlindung dari cahaya (dilapisi oleh kertas aluminium foil). Setelah itu dilakukan pengamatan dan analisis stabilitas liposom yang diuji. Pengamatan yang dilakukan meliputi penampilan fisik, warna, bau, dan pengamatan secara mikroskopik. Selain itu dilakukan pula analisis terhadap kandungan total antosianin dan aktivitas antioksidan yang dihasilkan setelah 30 hari penyimpanan. Dari hasil pengamatan setelah 30 penyimpanan, menunjukkan suspensi liposom yang dihasilkan stabil, dimana suspensi liposom tetap berwarna merah muda (cerah) dan masih

terdapat partikel-partikel kecil yang melayang pada bagian tengah suspensi. Selain itu suspensi juga tidak menimbulkan bau tengik, sama seperti awal liposom dibuat yaitu tidak berbau. Penilaian stabilitas produk liposom yang dihasilkan juga ditinjau dari adanya perubahan aktivitas antioksidan total dan *entrapment efficiency* produk setelah 30 hari penyimpanan. Dari analisis stabilitas yang dilakukan diatas, diketahui bahwa penyimpanan produk liposom kelopak bunga rosella ini akan menghasilkan stabilitas yang lebih baik bila penyimpanan dilakukan pada suhu rendah dan kondisi wadah yang dijenuhi nitrogen.

Dari uji stabilitas yang dilakukan setelah penyimpanan pada suhu rendah selama 30 hari juga menunjukkan bahwa formulasi liposom ekstrak metanol rosella dapat meningkatkan stabilitas ekstrak metanol rosella dalam hal aktivitas antioksidan dan kandungan total monomerik antosianin. Penyimpanan bentuk ekstrak selama 30 hari mengakibatkan penurunan aktivitas antioksidan (uji DPPH) sebesar 11,25% sedangkan bentuk liposome hanya mengalami penurunan yang rendah yaitu sebesar 0,93%. Demikian pula hasil analisis stabilitas berdasarkan kandungan total monomerik antosianin, diperoleh hasil bahwa terjadi penurunan sebesar 39,12% terhadap kandungan total monomerik antosianin ekstrak metanol rosella, sedangkan bentuk liposom hanya mengalami penurunan sebesar 0,72%.

KESIMPULAN

Keseluruhan analisis yang dilakukan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kelopak bunga rosella memiliki potensi yang baik untuk dikembangkan sebagai suatu sediaan antioksidan alami. Salah satu bentuk pengembangan ekstrak kelopak bunga rosella ini adalah formulasi bentuk liposom ekstrak kelopak bunga rosella yang dapat dimanfaatkan sebagai suatu eksfolian anti penuaan dini. Enkapsulasi kandungan antosianin yang berefek antioksidan dari ekstrak kelopak bunga rosella ini dalam bentuk liposom dapat mempertahankan stabilitas dan efektivitas ekstrak

kelopak bunga rosella sebagai suatu sediaan yang memiliki aktivitas antioksidan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada Yayasan Dian Desa atas pendanaan dan fasilitas yang diberikan, Kepala Laboratorium Analisis Farmasi Fakultas Farmasi UGM atas izin penggunaan fasilitas laboratorium, serta kepada Prof. Dr. Sri Noegrohati, Dr. Endang L, MSi., Apt., Sanjayadi, MSc., Apt., yang telah memberikan bimbingan dan membantu dalam teknis pengerjaan penelitian aktivitas antioksidan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2001, *Guidelines for testing of chemicals*, No. 404: Skin allergy and irritation test guideline, OECD, Paris.
- Cerezo, Ana B., Elyana Cuevas, P. Winterhalter, M.C. Garcia-Parrilla, A.M. Troncoso, 2010, Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry, *Food & Chemistry* 123, 574–582.
- Giusti, M.Monica and Ronald E. Wrolstad, 2001, Characteristic and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., F1.2.1-F1.2.13.
- Harbone, J.B., 1957, Spectral Method of Characterization Anthocyanins, *Spectra of Anthocyanins*, Vol. 70, 22 – 28.
- Hirunpanich, V., Utaipat A, Noppawan, P. M., Nuntavan, B., Hitoshi, S., Angkana, H., Chuthamane, S. 2005. Antioxidant effect of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa linn* (roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). *Bio. Pharm. Bull.*, 28(3): 481- 484
- Mursyidi, Achmad, 1984, *Statistika Farmasi dan Biologi*, Ghalia Indonesia, Jakarta, 61-63, 155.
- Pinsuwan, Sirirat, Thanaporn Amnuait, Suwipa Ungphaiboon, Arunporn Itharat, 2010, Liposome-Containing *Hibiscus sabdariffa* Calyx Extract Formulations with Increased Antioxidant Activity, Improved Dermal Penetration and Reduced Dermal Toxicity, *J Med Assoc Thai 2010; 93 (Suppl. 7), S216-S226*.
- Szoka, Francis Jr., And Demetrios Papahadjopoulos, Procedure For Preparation Of Liposomes With Large Internal Aqueous Space And High Capture By Reverse-Phase Evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 75, No. 9, 4194-4198.
- Zakaria, Z., Aziz, R., Lachimanan, Y. L., Sreenivasan, S., and Rathinam, X., 2008, Antioxidant activity of *Coleus blumei*, *Orthosiphon stamnieus*, *Ocimum basilicum* and *Mentha arvensis* from *Lamiaceae* family, *J.Nat. Eng. Sci.*, 2, 93-95.