

Efek Immunostimulan Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella

Dita Wulandari, Putri Ratna Puri, Ratna Kurnia W,
dan Nurkhasanah

ABSTRACT: The aims of this study was to determine the immunostimulant potential ethanolic extract of roselle calyx through the proliferation of lymphocytes and phagocytosis ability of macrophages Balb/c mice in vitro. Dried calyx of roselle were extracted using 96% ethanol by maceration method is further polyphenols assay are qualitatively and quantitatively. Vitro test using with immunostimulants are seeing an increase in lymphocyte proliferation using the MTT method and phagocytosis activity macrophages with latex beads. Lymphocyte proliferation is expressed by the difference in absorbance values between treatment and control groups, where as the ability of phagocytosis is expressed as an index of phagocytosis and the SFA. Concentration of extract used was 10-1000 $\mu\text{g/mL}$. Ethanolic extract of roselle calyx containing polyphenols with total polyphenol content (TPC) of 2.757 %. Ethanol extract of roselle calyx enhanced immune response at low concentrations. Concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ is the optimal concentration that increased proliferaion of lymphocyttest. The highest index of phagocytosis and SFA are at concentrations of 150 $\mu\text{g/mL}$ and 250 $\mu\text{g/mL}$. It can be concluded that ethanolic extract of roselle calyx has potential as immunostimulants.

Keywords: roselle, immune response, macrophage phagocytosis, lymphocyte proliferation, immunostimulant

ABSTRAK: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi imunostimulan ekstrak etanol kelopak bunga rosella melalui proliferasi limfosit dan kemampuan fagositosis makrofag mencit Balb/c secara in vitro. Kelopak bunga rosella kering diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan metode maserasi yang selanjutnya dilakukan uji polifenol secara kualitatif dan kuantitatif. Uji imunostimulan secara in vitro dilakukan dengan melihat peningkatan proliferasi limfosit menggunakan metode MTT dan aktivitas fagositosis makrofag menggunakan latex beads. Proliferasi limfosit dinyatakan dengan perbedaan nilai absorbansi antara kelompok perlakuan dan kontrol, sedangkan kemampuan fagositosis dinyatakan sebagai indeks fagositosis dan SFA. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 10-1000 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak etanol kelopak bunga rosella positif mengandung polifenol dengan kadar polifenol total (TPC) sebesar 2,757 %. Ekstrak etanol kelopak bunga rosella mampu meningkatkan respon imun pada konsentrasi rendah. Konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ merupakan konsentrasi optimal yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit. Indeks fagositosis dan SFA tertinggi terdapat pada konsentrasi 150 $\mu\text{g/mL}$ dan 250 $\mu\text{g/mL}$. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga rosella berpotensi sebagai imunostimulan.

Kata kunci : rosella, respon imun, fagositosis makrofag, proliferasi limfosit, kanker

Fakultas Farmasi, Universitas
Ahmad Dahlan, Yogyakarta

Korespondensi:

Nurkhasanah

Email : nukhas@gmail.com

PENDAHULUAN

Respon imun adalah semua mekanisme yang digunakan badan untuk melindungi dan mempertahankan keutuhan tubuh dari bahaya yang menyerang tubuh. Immunostimulan dibutuhkan jika kondisi status sistem imun akan mempengaruhi kondisi pasien dan penyebaran penyakit, seperti pada kasus terapi penunjang yang melibatkannya infeksi bakteri, fungi, atau virus (1).

Salah satu cara meningkatkan kekebalan tubuh adalah dengan merangsang sistem imun baik berupa respon imun spesifik maupun respon imun nonspesifik untuk kemudian menghasilkan sel fagositosis (2). Peningkatan respon imun dapat dilihat melalui peningkatan proliferasi limfosit dan aktivitas fagositosis makrofag.

Respon imun spesifik yang dihasilkan akan menyebabkan diproduksinya limfosit dalam jumlah besar. Sel limfosit T dapat diaktifkan setelah menerima sinyal yaitu berupa kompleks antigen dan interleukin-1 (IL-1). Sel limfosit yang teraktivasi kemudian mengalami perubahan berturut-turut mulai dari transformasi blast, proliferasi, diferensiasi baik menjadi sel efektor maupun sel memori, hingga apoptosis (3). Limfosit T berperan penting dalam imunitas seluler dengan cara merespon benda asing melalui reseptor permukaan secara langsung (4). Limfosit T (sel T) juga berperan pada aktivasi dan proliferasi sel B dalam memproduksi antibodi serta aktivasi makrofag dalam fagositosis (5). Limfosit B akan menghasilkan antibodi yang merupakan plasma glikoprotein yang akan mengikat antigen dan merangsang proses fagositosis (3).

Makrofag berperan dalam respon imun nonspesifik dan merupakan sel mononuklear fagosit yang mempunyai kemampuan berdiferensiasi cukup tinggi. Didalam tubuh makrofag, antigen yang ditangkap akan diproses kemudian dipresentasikan ke permukaan sel yang dikenal sebagai APC (*Antigen Presenting Cell*) (2).

Usaha pencarian tanaman yang berkhasiat meningkatkan sistem imun dapat diawali dari penggunaan tanaman tersebut secara empiris.

Senyawa-senyawa yang terbukti mempunyai prospek cukup baik dalam meningkatkan aktivitas sistem imun adalah golongan senyawa polisakarida, terpenoid, alkaloid, dan polifenol (1).

Salah satu bahan alam yang memiliki potensi untuk diteliti adalah kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) yang banyak mengandung flavonoid antosianin yang merupakan senyawa polifenol. Penelitian yang dilakukan Fakeye (6), diketahui bahwa fraksi larut etil asetat dan fraksi larut air kelopak bunga rosella kering secara signifikan mempunyai aktifitas immunostimulan dengan cara mereduksi produksi tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) dan meningkatkan interleukin-10 (IL-10). Oleh karena itu perlu penelitian yang lebih mendalam tentang khasiat kelopak bunga rosella sebagai immunostimulan melalui peningkatan proliferasi limfosit dan aktivitas fagositosis makrofag.

METODE PENELITIAN

ALAT

Mikroskop cahaya, *object glass*, spuit injeksi, mikropipet, alat-alat gelas, petri dish, *24-well plate*, *cover slips*, alat sentrifugasi, *hemocytometer* (Neubauer), *96-wells micro plate* (Nunc), inkubator CO₂ (Heraeus®, Germany), *microplate reader* (Bio-Rad Benchmark, Japan), *vacum rotary evaporator*, *waterbath*, spektrofotometer visibel.

BAHAN

Kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) yang diperoleh dari Kediri, Jawa Timur, etanol 96%, mencit Balb/c, PHA, FBS 10% (v/v), HCl 0.01 N, *latex beads*, PBS, metanol, giemsa (v/v), LPS (*Lipopolysakarida*), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Germany), *buffer tris ammonium chloride*, *complete medium*, MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazoliumbromida] Merck, Germany), *reagent stopper* (10% SDS) dalam 50 μ L HCl 0,01 N, asam galat, reagen Folin-Ciocalteu, natrium karbonat (7,5 % b/v).

PROSEDUR KERJA

Pembuatan ekstrak etanol 96% kelopak bunga rosella

Kelopak bunga rosella kering diekstraksi dengan pelarut etanol 96% (1:7) menggunakan metode maserasi dilakukan pengadukan selama 3 jam, kemudian didiamkan sampai 24 jam. Maserat dipisahkan dan dilakukan remaserasi dengan pelarut yang sama (1:3). Semua maserat dikumpulkan dan diuapkan dengan *vacum rotary evaporator* dan dipekatkan dengan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak sampel ditimbang dan dihitung rendemen. Kemudian lakukan analisis fitokimia melalui uji kualitatif dan kuantitatif (7).

Pengujian Polifenol dalam ekstrak etanol kelopak bunga rosella

Kualitatif: sampel $\pm$ 200 mg ditambah FeCl_3 sebanyak 3 tetes. Jika timbul warna biru menunjukkan adanya polifenol.

Kuantitatif: satu mL sampel ekstrak ditambah 5,0 mL reagen Folin Ciocalteu yang diencerkan 1/10 dalam air dan 4,0 mL natrium karbonat (7,5% b/v). Didiamkan pada suhu ruangan selama 60 menit dan dibaca absorbansi pada $\lambda=765$ nm. Kurva standar dari asam gallat (10-50 $\mu\text{g/mL}$) ($r^2 = 0,9996$) (8).

Isolasi Limfosit dan Pengujian Proliferasi

Jaringan limpa diisolasi secara aseptik dari mencit Balb/c dan pindahkan ke 50 mm petri dish yang berisi 10 mL RPMI-1640 untuk menghasilkan suspensi limfosit. Pelet disuspensi dengan 5 mL *buffer tris ammonium chloride* dan diamkan pada suhu kamar selama 15 menit. RPMI-1640 ditambahkan pada 10 ml suspensi dan sentrifugasi pada 3,200 rpm 4°C selama 4 menit. Pelet dipisahkan dari supernatan, cuci 2 kali dengan RPMI-1640, kemudian ditambah dengan *complete medium*. Sel limfosit dihitung dengan *hemocytometer*.

Suspensi sel limfosit dalam 100 μL medium ($1,5 \times 10^6$ sel/mL) yang di distribusikan ke dalam

96-wells *micro plate*. Ke dalam masing-masing sumuran, tambahkan 100 μL suspensi sampel dan 10 μL PHA 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, kemudian kembali diinkubasi selama 72 jam. Ke dalam masing-masing sumuran ditambahkan 10 μL MTT 5 mg/mL, diikuti dengan inkubasi selama 4 jam pada 37°C. Sel yang hidup akan memberi reaksi dengan MTT menghasilkan warna ungu. *Reagent stopper* (10% SDS) dalam HCl 0.01 N sebanyak 50 μL ditambahkan pada masing-masing sumuran. Absorbansi ditentukan menggunakan *microplate reader* pada 550 nm (9).

Isolasi Makrofag dan Aktivitas Fagosit dengan Latex Beads

Makrofag diisolasi dari cairan peritoneal mencit dengan $\pm$ 10 mL RPMI dingin. Kira-kira 3 mL RPMI-1640 *complete medium* ditambahkan pada sedimen pelet. Sel dihitung dengan *hemocytometer* dan kemudian resuspensi dalam *complete medium* untuk menghasilkan suspensi sel dengan kepadatan $1,38 \times 10^6$ sel/mL. Suspensi sel kemudian diinokulasi pada 24-well *plate* yang dilengkapi dengan cover slips. Masing-masing sumuran berisi 200 μL suspensi ($2,8 \times 10^5$ sel). Sel diinkubasi dalam inkubator pada 37°C selama 30 menit. Kemudian masing-masing sumuran dicuci dengan 250 μL *complete medium* 3 kali, diikuti dengan inkubasi selama 2 jam. Sel kemudian dicuci dengan RPMI-1640 2 kali dan ditambahkan 1 ml *complete medium*, diikuti dengan inkubasi selama 24 jam.

Sel dicuci 2 kali dengan RPMI-1640 kemudian suspensi *latex* (200 μL /wells) dan sampel (200 μL /wells) ditambahkan kedalam masing-masing well, inkubasi pada 37°C selama 60 menit. Sel kemudian dicuci dengan PBS 3 kali untuk menghilangkan kelebihan *latex beads*. Kemudian keringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol selama 30 detik. Kemudian diwarnai dengan giemsa selama 20 menit. Setelah itu dicuci dengan air destilasi. Jumlah makrofag yang mengfagosit *latex beads* dan *latex beads* yang dimakan oleh makrofag dihitung dibawah mikroskop untuk menghitung indeks fagositosis makrofag (9).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kelopak bunga rosella diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96 % dengan metode maserasi. Metode ini dipilih untuk menghindari kerusakan zat aktif karena panas. Hasil maserasi 100 gram kelopak bunga rosella kering dalam 1L pelarut etanol 96 % diperoleh ekstrak kental sebanyak 25,7804 gram dengan rendemen sebesar 25,8 %. Hasil uji fitokimia secara kualitatif ekstrak etanol kelopak bunga rosella positif mengandung polifenol, sedang secara kuantitatif kadar polifenol total (TPC) yang diperoleh sebesar 2,757 %.

Proliferasi Limfosit

Tujuan uji proliferasi limfosit adalah untuk mengetahui efek penambahan ekstrak etanol kelopak bunga rosella dalam meningkatkan proliferasi limfosit. Sel limfosit diisolasi dari organ limpa mencit secara aseptis. Pengujian ekstrak etanol kelopak bunga rosella terhadap proliferasi sel limfosit secara *in vitro* menggunakan dua variasi konsentrasi yaitu konsentrasi rendah dan konsentrasi tinggi. Hal ini dimaksudkan untuk mengetahui signifikansi antara efek peningkatan konsentrasi dengan respon proliferasi limfosit yang dihasilkan.

Proliferasi adalah proses perbanyakan sel melalui pembelahan sel sebagai respon terhadap antigen ataupun mitogen. Mitogen yang digunakan pada penelitian ini adalah PHA yang menjadikan sel menjadi aktif dan memicu proliferasi. Jumlah sel hidup pada kultur dihitung menggunakan metode MTT. Prinsip metode ini didasarkan pada penyerapan warna biru dari kristal formazan yang dihasilkan dari reaksi antara enzim *suksinat dehidrogenase* yang dihasilkan oleh mitokondria sel hidup dengan garam tetrazolium (MTT). Banyaknya kristal formazan yang terbentuk berbanding linear dengan banyaknya sel yang hidup dan nilai absorbansi yang dihasilkan (10).

Menurut hasil absorbansi pada Gambar 1, secara umum ekstrak konsentrasi rendah ber-

pengaruh positif, yaitu dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit. Sedangkan pada ekstrak konsentrasi tinggi berpengaruh negatif yang berarti bersifat toksik bagi sel limfosit. Konsentrasi optimum ekstrak yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit berada pada konsentrasi 100 µg/mL dengan nilai absorbansi rata-rata $0,061 \pm 0,019$.

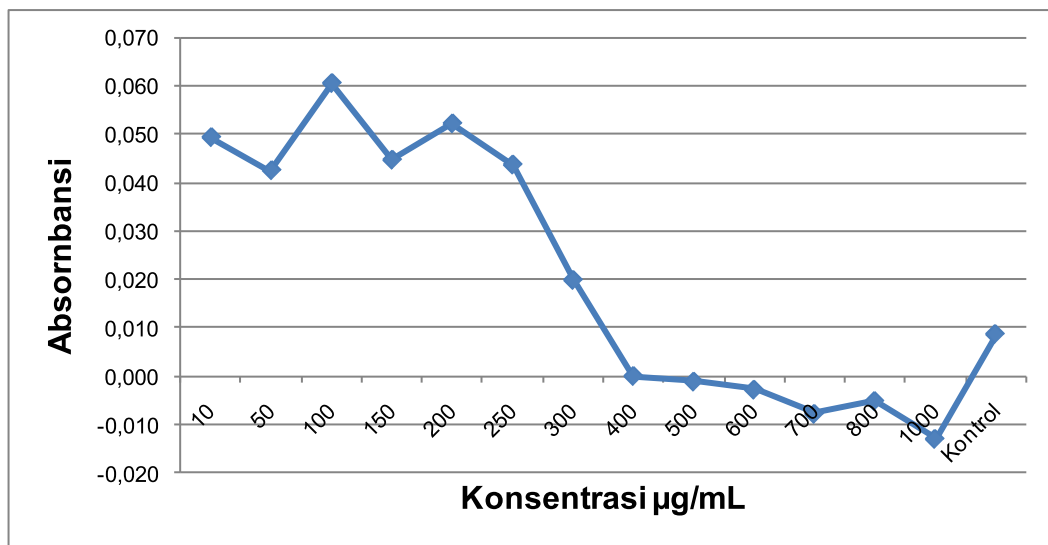
Aktivitas Fagositosis Makrofag

Tujuan uji aktivitas fagositosis makrofag adalah untuk mengetahui efek penambahan ekstrak etanol kelopak bunga rosella dalam meningkatkan aktivitas makrofag dalam memakan *latex beads*. Makrofag diisolasi dari cairan peritonium, kemudian diuji dengan pewarnaan giemsa. Dihitung nilai SFA yaitu jumlah sel makrofag yang memfagosit *latex beads* dalam 100 sel yang dinyatakan dalam presentase dan indeks fagositosis (IF) yang menunjukkan jumlah *latex beads* yang difagositosis oleh makrofag. Nilai SFA yang dihasilkan ditunjukkan pada Gambar 2 dan nilai IF ditunjukkan pada Gambar 3.

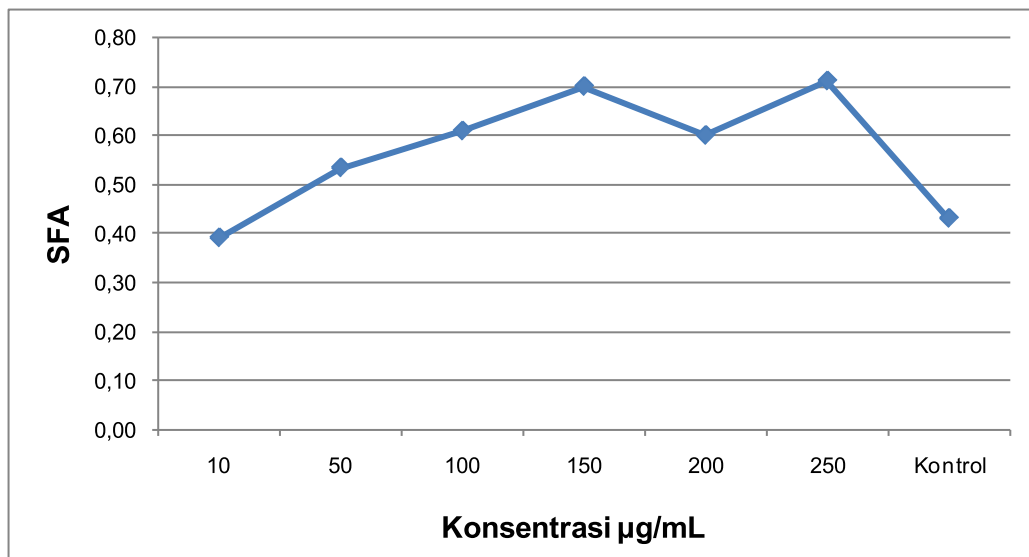
Berdasarkan kurva diatas, nilai SFA dan IF tertinggi terdapat pada penambahan ekstrak konsentrasi 150 µg/mL dan 250 µg/mL dibandingkan dengan kontrol negatif. secara umum, ekstrak etanol kelopak bunga rosella dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag.

Mekanisme Polifenol dalam Proliferasi Limfosit dan Aktivasi Makrofag

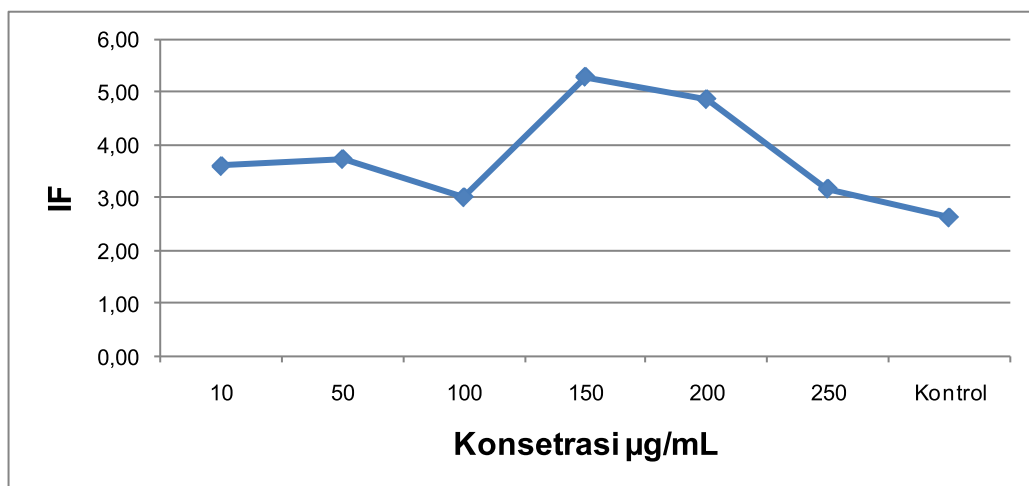
Dari hasil uji proliferasi limfosit dan fagositosis makrofag menunjukkan bahwa ekstrak rosella dapat meningkatkan respon imun. Respon antigen spesifik yang dihasilkan akan menyebabkan diproduksinya limfosit dalam jumlah besar terutama limfosit B. Limfosit B akan menghasilkan antibodi yang merupakan plasma glikoprotein yang akan mengikat antigen dan merangsang proses fagositosis. Kemungkinan di antara senyawa-senyawa imunostimulator seperti golongan senyawa polisakarida, terpenoids, alkaloid dan polifenol dapat mening-



Gambar 1. Kurva Proliferasi Limfosit



Gambar 2. Kurva SFA makrofag



Gambar 3. Kurva IF makrofag

katkan sistem imun (11). Ekstrak air kelopak bunga rosella mengandung suatu senyawa antosianin yang termasuk dalam senyawa polifenol yang berkhasiat sebagai antioksidan dan diduga berperan sebagai imunostimulator melalui peningkatan proliferasi limfosit dan aktivitas fagositosis makrofag mencit galur Balb/c. Aktivitas antioksidan memiliki keterkaitan dengan sistem imun. Antioksidan mempertahankan fungsi yang cukup dari sel imun untuk menghadapi perubahan homeostatik yang disebabkan stress oksidatif (12). Diduga senyawa-senyawa polifenol berperan dalam peningkatan immunitas dengan peningkatan sensitifitas redoks pada sistem signaling yang melibatkan ekspresi gen-gen tertentu. Perubahan ini lebih jauh akan mengubah fungsi beberapa sel termasuk fungsi imunostimulan (9).

DAFTAR PUSTAKA

1. Suhirman, S. dan Christina W. Prospek dan fungsi tanaman obat sebagai imunomodulator. Artikel, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. 2006, 121-133.
2. Sudiana, I Ketut. Patobiologi Molekuler Kanker. 2008. Salemba Medika. Jakarta. 2008.
3. Akrom dan Sitti N.D. Jumlah dan aktivitas proliferasi limfosit lien mencit Swiss jantan yang diinfeksi *Plasmodium berghei* akibat pemberian 5 dan 100 mg/kgbb/hari ekstrak etanol *Phyllanthus niruri*. Kes Mas. 2007, 1(1): 1-50.
4. Zairisman, S.Z. Potensi imunomodulator bubuk kakao bebas lemak sebagai produk substandar secara in vitro pada sel limfosit manusia. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. 2006.
5. Baratawidjaja, K.G. Immunologi Dasar, Edisi VII. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2006.
6. Fakeye, T. Toxicity and immunomodulatory activity of fractions of *Hibiscus sabdariffa* Linn (family malvaceae) in animal models. Fakeye Afr. J. Trad. CAM. 2008, 5(4): 394-398.
7. Anonim. Ekstrak Tumbuhan Indonesia, Volume 2.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol kelopak bunga rosella dapat meningkatkan respon imun yaitu melalui peningkatan proliferasi limfosit dan aktivitas fagositosis makrofag.
2. Peningkatan proliferasi limfosit optimum pada konsentrasi ekstrak rendah, 100 µg/mL.
3. Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag optimum terdapat pada konsentrasi ekstrak 150 µg/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada: Direktorat Jendral DIKTI yang telah memberikan dana penelitian melalui program PKM-P.

Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2004.

8. Anesini, C., Graciela E.F, dan Rosana F. Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 2008, 56: 9225-9229.
9. Hertiani, T., Ediati S., Sumardi, dan Maria U. Preliminary study on immunomodulatory effect of sarang semut tubers *Myrmecodia tuberosa* and *Myrmecodia pendens*. OnLine Journal of Biological Sciences. 2010, 10 (3): 136-141.
10. Krismawati, A. Pengaruh ekstrak tanaman ceremai, delima putih, jati belanda, kecombrang, dan kemuning secara *in vitro* terhadap proliferasi sel limfosit manusia. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. 2007.
11. Suhirman, S. dan Christina W. Prospek dan fungsi tanaman obat sebagai imunomodulator, Artikel, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. 2006, 121-133.
12. Da la Fuente, M. Effect of antioxidants on immune system ageing. European journal of clinical nutrition, fitoterapia. 2002, 27-31