

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1. Hasil Penelitian

Berikut merupakan tabulasi data mengenai jenis senyawa aktif pada rimpang temulawak dan bunga rosella yang memiliki aktivitas imunostimulator yang terdapat pada tabel 6., terdapat 18 jurnal penelitian mengenai identifikasi senyawa aktif pada temulawak dan rosella yang memiliki aktivitas imunostimulator. Penelitian dilakukan secara *in vivo* maupun *in vitro*, namun lebih banyak penelitian yang dilakukan secara *in vitro* yaitu menggunakan sel atau jaringan pada hewan maupun manusia. Bentuk sampel yang digunakan bermacam-macam, ada yang menggunakan rimpang atau bunga segar maupun sudah dikeringkan.

Pada tabel 6., terdapat 5 senyawa aktif pada temulawak yang memiliki aktivitas imunostimulator, yaitu *xanthorrhizol*, *germacrone* beserta turunannya (*13-Hydroxygermacrone*), kurkuminoid beserta turunannya (*bidesmethoxycurcumin* dan *demethoxycurcumin*), dan polisakarida beserta turunannya (*arabinose*, *galactose*, *glucose*, *mannose*, *rhamnose*, dan *xylose*). Sedangkan pada rosella ditemukan 4 senyawa aktif yang memiliki aktivitas imunostimulator, yaitu fenol, polifenol, flavonoid (antosianin), dan terpenoid. Selain itu, pada tabel 6., terdapat 6 data yang tidak dilakukan identifikasi senyawa aktif serta 10 data yang tidak dilakukan uji fitokimia. Data yang tidak dilakukan identifikasi senyawa aktif dan tidak dilakukan uji fitokimia ditandai dengan blok tabel warna hitam.


Tabel 6. Identifikasi Senyawa Aktif Imunostimulan Pada Temulawak dan Rosella

Spesies	Bentuk sampel	Senyawa Aktif	Uji Fitokimia	Aktivitas imunostimulator	Referensi
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb	Rimpang kering	Zedoaraldeyde, germacrone, dan 13-Hydroxygermacrone		Meningkatkan SIRT 1 (Protein Sirtuin)	Zhang <i>et al</i> (2015)
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb	Rebusan rimpang			Meningkatkan jumlah sel CD4+ pada penderita HIV	Astana <i>et al</i> (2018)
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb	Larutan rimpang			Meningkatkan jumlah leukosit	Falahuddin <i>et al</i> (2016)
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb	Rimpang kering	<i>Xanthorrhizol</i>	Nuclear Magnetic Resonance (H-NMR & C-NMR)	Menghambat aktivasi NF-kB	Chung <i>et al</i> (2007)
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb	Rimpang kering	Polisakarida ( <i>arabinose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, xylose</i> )	HPAEC-PAD	Meningkatkan aktivitas fagositosis pada makrofag	Kim <i>et al</i> (2007)
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb	Simplisia bubuk	Kurkuminoid	HPLC	Menghambat enzim $\alpha$ - glukosidase	Nurcholis <i>et al</i> (2015)
<i>Curcuma xanthorrhiza</i>	Bubuk kapsul	Kurkuminoid		Menurunkan konsentrasi TNF- $\alpha$	Setiawati <i>et al</i> (2017)

Roxb					
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb	Simplisia bubuk	<i>Bidesmethoxycurcumin, curcumin, demethoxycurcumin, dan xanthorrhizol</i>	<i>Nuclear Magnetic Resonance (H-NMR)</i>	Menghambat produksi enzim NO sintase	Park <i>et al</i> (2014)
<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb	Tepung temulawak			Meningkatkan titer antibodi pasca vaksinasi.	Pratiwi <i>et al</i> (2019)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L	Bunga kering	<i>Protocatechuic acid (phenolic compound)</i>		Menurunkan tingkat protein BCL-2	Tseng <i>et al</i> (2000)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L	Bunga kering			Menurunkan aktivitas enzim tyrosine kinase	Sensri <i>et al</i> (2020)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L	Kelopak bunga segar	Fenol dan flavonoid	Kromatografi lapis tipis	Meningkatkan proliferasi sel limfosit	Puspitowati <i>et al</i> (2021)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L	Serbuk bunga (kapsul)	Flavonoid		Meningkatkan persentase jumlah CD4	Mardhiyani <i>et al</i> (2018)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L	Kelopak bunga kering	Fenol dan flavonoid	Kromatografi lapis tipis	Meningkatkan proliferasi sel limfosit	Nirmalasari <i>et al</i> (2013)

<i>Hibiscus sabdariffa</i> L	Serbuk bunga	Terpenoid, fenol, dan flavonoid	Kromatografi lapis tipis	Meningkatkan proliferasi sel limfosit	Ulfah <i>et al</i> (2014)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L	Kelopak bunga segar			Meningkatkan jumlah neutrofil segmen	Mardiah <i>et al</i> (2019)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L	Bunga kering	1. Antosianin 2. polifenol 3. flavonoid	1. Metode Fuleki dan Francis 2. Metode Folin-Ciocalteu 3. Metode Jia	Menginduksi apoptosis	Lin <i>et al</i> (2006)
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L	Bunga kering			Inaktivasi virus influenza	Baatartsogt <i>et al</i> (2016)

**Keterangan :**

 : Tidak dilakukan identifikasi senyawa aktif dan uji fitokimia

## 3.2. Pembahasan

### 3.2.1. Aktivitas Senyawa Aktif Pada Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) Sebagai Immunostimulator Terhadap COVID-19

#### 3.2.1.1. *Xanthorrhizol* (XNT)

*Xanthorrhizol* (XNT) adalah senyawa sesquiterpenoid tipe bisabolane yang diekstrak dari temulawak. Pada tabel 6., dapat dilihat bahwa XNT memiliki aktivitas immunostimulator dengan menghambat aktivasi NF-kB dan produksi NO sintase. Pada tabel 6., ditemukan bahwa XNT dapat menghambat aktivasi NF-kB dengan uji *in vivo* menggunakan tikus ICR berjenis kelamin perempuan berusia 6 minggu sebagai subyek penelitian. Tikus ICR diinduksi dengan TPA (*tetradecanoylphorbol acetate*) yang menyebabkan inflamasi akut kemudian diberikan ekstrak *xanthorrhizol* secara topikal pada bagian kulit selama 30 menit dengan dosis (0,1  $\mu\text{m}$ , 0,3  $\mu\text{m}$ , dan 1,0  $\mu\text{m}$ ). Kemudian dilakukan pengujian inhibisi aktivasi NF-kB dengan uji *western blotting* (Chung *et al*, 2007). Hasil dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak *xanthorrhizol* dengan dosis 1,0  $\mu\text{m}$  dapat menghambat aktivasi NF-kB pada tikus yang telah diinduksi oleh TPA yang menyebabkan inflamasi akut.

Bila dihubungkan dengan adanya infeksi virus COVID-19, aktivasi NF-kB dapat memicu respon inflamasi terhadap virus COVID-19 yang menyerang saluran pernapasan (Lee JY *et al.*, 2019). Menurut penelitian yang dilakukan oleh De Diego *et al* (2014), beberapa protein struktural maupun non-struktural SARS-CoV, termasuk protein N, protein S, nsp1, nsp3a, dan nsp7a dapat merangsang aktivasi NF-kB. XNT terbukti dapat menghambat aktivasi NF-kB, maka disaat terjadi *over-expression*, XNT dapat berperan dalam menghambat aktivasi NF-kB sehingga dapat menghindari meningkatnya inflamasi di dalam tubuh. Namun karena belum adanya penelitian yang secara langsung menguji bahwa dengan adanya penurunan aktivasi NF-kB dapat menurunkan inflamasi saat terjadi infeksi virus COVID-19, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Park *et al* (2014), XNT dengan konsentrasi 27.47 g dapat menghambat produksi enzim NO sintase pada sel RAW 264.7 (sel makrofag mencit) dengan hasil IC<sub>50</sub> sebesar  $31,80 \pm 3,22 \mu\text{M}$  (dilihat pada tabel.6). Dibandingkan senyawa aktif lainnya yaitu kurkumin beserta turunannya (*Bidesmethoxycurcumin* dan *Demethoxycurcumin*), XNT memiliki nilai IC<sub>50</sub> yang jauh lebih tinggi sehingga kurang efektif sebagai inhibitor enzim NO sintase. Produksi nitrat dan nitrit (metabolit NO) pada pasien COVID-19 memiliki peningkatan secara signifikan dibandingkan dengan individu sehat dengan jumlah NO<sub>2</sub><sup>-</sup> sebesar  $7.6 \pm 3.9 \mu\text{mol/L}$  pada individu sehat dan  $10.7 \pm 7.9 \mu\text{mol/L}$  pada pasien COVID-19, sedangkan jumlah NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pada individu sehat sebesar  $22.4 \pm 15.3 \mu\text{mol/L}$  dan pada pasien COVID-19 sebesar  $44.7 \pm 30.1 \mu\text{mol/L}$  (Alamdari, D. H *et al.*, 2020).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Gong, J *et al* (2020) dihasilkan bahwa infeksi virus menyebabkan peningkatan sitokin dan kemokin pro-inflamasi secara signifikan sehingga menyebabkan terjadinya badai sitokin yang menyebabkan inflamasi berlebih dalam tubuh. Ketika peradangan tinggi berlangsung lama, maka dapat menyebabkan adanya kerusakan pada beberapa jaringan dan organ. Selain itu, peradangan yang tinggi juga menyebabkan adanya ketidakseimbangan jumlah NO sehingga memicu adanya stres oksidatif. Hal ini ditemukan pada pasien COVID-19 dimana terdapat badai sitokin (Huang, C *et al.*, 2020) dan peningkatan jumlah NO secara signifikan. Dengan adanya hal ini, maka diperlukan *inhibitor* pada produksi NO dalam tubuh. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Park *et al* (2014), senyawa aktif pada temulawak seperti XNT, kurkumin beserta turunannya (*bidesmethoxycurcumin* dan *demethoxycurcumin*) dapat menghambat produksi enzim NO sintase, sehingga akan membantu penurunan produksi NO dalam tubuh.

### 3.2.1.2. Kurkuminoid

Pada tabel 6., juga dapat dilihat bahwa senyawa kurkuminoid dan turunannya seperti *bidesmethoxycurcumin* dan *demethoxycurcumin* memiliki aktivitas yang sama dengan *xanthorrhizol*, yaitu menghambat produksi enzim NO sintase. Dibandingkan dengan *xanthorrhizol*, kurkuminoid beserta turunannya memiliki nilai  $IC_{50}$  yang lebih rendah dengan nilai  $8.21 \pm 0.56 \mu M$  (*bidesmethoxycurcumin* dengan kadar 0.46 g),  $10.01 \pm 0.710 \mu M$  (kurkuminoid dengan kadar 10.69 g), dan  $4.86 \pm 0.54 \mu M$  (*demethoxycurcumin* dengan kadar 2.35 g), sedangkan *xanthorrhizol* memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $31.80 \pm 3.22 \mu M$  dengan kadar 27.47 g. Berdasarkan nilai tersebut, dapat dikatakan bahwa kurkuminoid beserta turunannya (*bidesmethoxycurcumin* dan *demethoxycurcumin*) memiliki aktivitas inhibisi produksi enzim NO sintase lebih tinggi dibandingkan *xanthorrhizol* sehingga kurkuminoid tidak efektif dalam menghambat produksi enzim NO sintase.

Pada tabel 6, dihasilkan bahwa senyawa aktif kurkuminoid dapat menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase yang dianalisa dengan *microplate reader* (Nurcholis *et al*, 2015). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Nurcholis *et al* (2015) menunjukkan bahwa varietas temulawak yang memiliki aktivitas inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase tertinggi adalah temulawak yang berasal dari Wonogiri dengan nilai  $IC_{50}$  paling rendah dibandingkan varietas lainnya, yaitu  $333,27 \mu g/mL$  dengan kadar kurkuminoid 85,19 mg/g. Namun bila dibandingkan standar obat komersial yang digunakan yaitu akar bosa, kurkuminoid sangat kurang efektif dalam menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase dikarenakan akar bosa memiliki nilai  $IC_{50}$  yang jauh lebih rendah yaitu  $0,53 \mu g/mL$ . Perbandingan nilai  $IC_{50}$  antara akar bosa dan ekstrak temulawak yang mengandung kurkuminoid sangat jauh, sehingga dapat dikatakan ekstrak temulawak memiliki potensi dalam menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase, namun kurang efektif.

Zhao *et al* (2015) menyatakan bahwa sel virus yang masuk dalam tubuh dengan protein SARS-CoV dapat dicegah dengan adanya inhibitor enzim  $\alpha$   $\alpha$ -glukosidase. Enzim  $\alpha$ -glukosidase diperlukan untuk pematangan glikoprotein ACE-2 dan SARS-1. Karena SARS-2 juga memerlukan ACE2 sebagai reseptor untuk masuk ke dalam sel, maka inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase dapat digunakan sebagai alternatif obat antivirus SARS-2 (Reyes, H *et al.*, 2021). Hingga saat ini, sudah ada beberapa obat antivirus yang memiliki prinsip kerja dengan menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase, salah satunya adalah castanospermine. Castanospermine dapat menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase I dan II, hal ini juga membuktikan bahwa castanospermine efektif dalam menghambat replikasi virus SARS-CoV-2 (Clarke E.C *et al.*, 2020). Selain dapat menghambat replikasi virus, inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase dapat bermanfaat bagi penderita diabetes. Enzim  $\alpha$ -glukosidase adalah enzim eksokarbohidrat yang memiliki fungsi sebagai katalisator dalam pelepasan  $\alpha$ -glukosa dari karbohidrat. Saat terjadi inhibisi enzim  $\alpha$ -glukosidase, maka pencernaan karbohidrat akan tertunda dan menurunkan penyerapan glukosa sehingga dapat menurunkan gula darah (Narkhede, 2012).

Selain itu, pada tabel 6 juga dihasilkan bahwa kurkuminoid dapat menurunkan konsentrasi TNF- $\alpha$  pada pasien SLE dengan pemberian kapsul ekstrak temulawak yang mengandung 50 mg kurkuminoid/kapsul. Pada penelitian ini, dengan pemberian kapsul ekstrak temulawak dapat menurunkan konsentrasi TNF- $\alpha$  hingga 0 pg/mL dibandingkan dengan sebelum pemberian kapsul ekstrak temulawak yaitu 10,25 pg/mL (Setiawati *et al.*, 2017). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Huang, C *et al* (2020), pasien COVID-19 yang dirawat di ICU memiliki tingkat plasma TNF- $\alpha$  yang lebih tinggi dibandingkan pasien COVID-19 yang tidak dirawat di ICU. Penelitian terkait juga dilakukan oleh Merza, M.Y *et al* (2021), yang menyatakan bahwa konsentrasi TNF- $\alpha$  pada pasien COVID-19 lebih tinggi dibandingkan pasien yang telah sembuh dari COVID-19 dengan



konsentrasi sebesar  $86.3 \pm 5.2$  pg/ml pada pasien COVID-19 dan  $57.9 \pm 3.8$  pg/ml pada pasien yang telah sembuh.

TNF- $\alpha$  adalah sitokin yang diproduksi oleh makrofag pada respon inflamasi terhadap serangan dari virus maupun bakteri. Saat terjadi infeksi virus COVID-19, maka akan terjadi peradangan dalam jaringan tubuh dan terjadi peningkatan TNF- $\alpha$ . Oleh karena itu, kurkuminoid dapat meredakan inflamasi dalam tubuh dengan menurunkan TNF- $\alpha$ . Namun karena belum adanya penelitian secara langsung mengenai potensi kurkuminoid untuk menghambat aktivitas NO sintase, enzim  $\alpha$  – glukosidase, dan menurunkan TNF- $\alpha$  pada pasien COVID-19, maka hal ini belum dapat dipastikan sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

### **3.2.1.3. Polisakarida (arabinosa, galaktosa, glukosa, mannososa, rhamnosa, dan silosa)**

Pada tabel 6., dihasilkan bahwa polisakarida pada temulawak seperti arabinosa, galaktosa, glukosa, mannososa, rhamnosa, dan silosa dapat meningkatkan aktivitas fagositosis seiring dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak polisakarida yang diberikan. Hasil tertinggi terdapat pada penambahan ekstrak polisakarida dengan konsentrasi tertinggi, yaitu dapat meningkatkan aktivitas fagositosis hingga 340% pada sel RAW 264.7 yang diinkubasi dengan bakteri *E.coli* dengan pemberian ekstrak polisakarida sebesar 50  $\mu$ g/mL dengan kadar polisakarida kasar 10 mg (Kim *et al.*, 2007). Fagositosis adalah langkah pertama dalam respon makrofag terhadap mikroorganisme maupun virus yang menyerang. Bila terjadi aktivasi fagositosis, maka terjadi peningkatan respon imun bawaan. Selama proses fagositosis, makrofag yang teraktivasi akan memproduksi spesies oksigen reaktif (ROS) seperti NO dan H<sub>2</sub> yang dapat menginduksi aktivitas imunostimulan dalam makrofag (Kim *et al.*, 2007). Makrofag adalah pusat dari proses seluler yang dapat berkontribusi pada pemulihan infeksi COVID-19. Makrofag dapat menghilangkan *debris* dan jaringan nekrotik melalui aktivitas fagositosis (Werz *et al.*, 2018). Fagositosis virus SARS-

CoV-2 dicapai dengan adanya sistem kekebalan tubuh yang dapat mendeteksi adanya virus melalui pengenalan molekuler patogen (PAMPs) oleh makrofag alveolar yang mengaktifkan sitokin seperti IL-6 dan TNF  $\alpha$  hingga terjadi fagositosis virus (Zhou.P *et al.*, 2020). Untuk membuktikan bahwa ekstrak polisakarida pada temulawak dapat meningkatkan fagositosis virus COVID-19, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

#### **3.2.1.4. Zedoaraldehyde, Germacrone, dan 13-Hydroxygermacrone**

*Zedoaraldehyde*, *germacrone*, dan *13-hydroxygermacrone* adalah senyawa aktif pada temulawak yang dapat meningkatkan protein sirtuin (SIRT 1) seperti yang ditampilkan pada tabel 6. Penelitian ini dilakukan dengan analisis tingkat ekspresi protein sirtuin (SIRT 1) menggunakan metode *western blot* pada sel HEK293 yang diberi ekstrak temulawak sebanyak 20  $\mu$ m selama 24 jam (Zhang *et al.*, 2015). Ekstrak temulawak yang digunakan mengandung *zedoaraldehyde* (3,7 mg), *germacrone* (29 mg), dan *13-Hydroxygermacrone* (5,2 mg). Nilai peningkatan SIRT1 ditunjukkan dengan *fold change* dengan hasil 1.37-*fold* (*zedoaraldehyde*), 1.7-*fold* (*13-hydroxygermacrone*), dan 1.73-*fold* (*germacrone*) (Zhang *et al.*, 2015). Hasil menunjukkan bahwa *germacrone* memiliki nilai *fold* yang lebih tinggi dibandingkan *zedoaraldehyde* dan *13-hydroxygermacrone*. Protein sirtuin atau SIRT 1 adalah protein pleiotropik yang mampu menargetkan beberapa faktor transkripsi sehingga dapat mengatur beberapa jalur intraseluler terkait dengan kematian atau kelangsungan hidup sel (Mendes *et al.*, 2007). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Bordoni.V *et al* (2021), dihasilkan bahwa ekspresi deasetilase SIRT 1 pada pasien COVID-19 lebih rendah dibandingkan orang yang sehat. Protein sirtuin (SIRT 1-7) memiliki peran dalam mengendalikan ketahanan terhadap stres dan mempertahankan pertahanan terhadap patogen (Kwon *et al.*, 2008). Selain itu, SIRT 1 juga memerankan peran penting dalam menekan replikasi virus dan terjadinya inflamasi (Kwon *et al.*, 2008).

### 3.2.2. Uji Fitokimia Pada Rimpang Temulawak

#### 3.2.2.1. *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

*Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) adalah instrumen yang digunakan untuk memperoleh informasi mengenai struktur dari suatu senyawa kimia. NMR merupakan metode yang cukup baik dalam menentukan struktur senyawa organik. Metode spektroskopi NMR memanfaatkan interaksi antar inti dan juga interaksi antara inti dengan elektron yang dapat membantu untuk menentukan suatu senyawa kimia (Hilal *et al.*, 2017). Terdapat 2 jenis spektroskopi NMR, yaitu  $^1\text{H}$ -NMR dan  $^{13}\text{C}$ -NMR. Spektrum  $^1\text{H}$ -NMR menunjukkan informasi adanya pergeseran kimia dengan perbedaan jenis proton di dalam sampel,  $^{13}\text{C}$ -NMR dapat memberikan informasi struktural berdasarkan pergeseran kimia dari berbagai jenis karbon (Hameed *et al.*, 2017).

#### 3.2.2.2. *High-Performance Anion Exchange Chromatography / Pulsed Amperometric Detection* (HPAEC-PAD)

Pada tabel 6., dapat dilihat bahwa uji fitokimia yang dilakukan oleh Kim *et al* (2007) untuk menentukan kandungan polisakarida digunakan metode *High-Performance Anion Exchange Chromatography / Pulsed Amperometric Detection* (HPAEC-PAD). Pada penelitian ini, uji fitokimia diawali dengan hidrolisis ekstrak polisakarida dari temulawak pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 3 jam di bawah nitrogen lalu dinetralkan dengan 200 ml amonium hidroksida 12 N pada suhu ruang. 20 ml polisakarida yang terhidrolisis kemudian dilarutkan dalam 2,8 ml akuades lalu disuntikkan ke dalam HPAEC-PAD. Kolom pada HPAEC-PAD dielusi dengan 200 mM NAOH pada kecepatan 0,5 ml/menit. Kemudian komposisi glukosa, arabinosa, galaktosa, manosa, xilosa, dan rhamnosa diidentifikasi berdasarkan waktu retensi dengan masing-masing standar menggunakan DX-500 Sistem Bio-LC. HPAEC yang dikombinasikan dengan deteksi amperometrik berdenyut (PAD) adalah metode yang kuat, sangat sensitif, dan efisien untuk memisahkan karbohidrat yang kurang teraktivasi (Cataldi *et al.*, 2000).

### 3.2.2.3. HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPLC adalah teknik analisis yang paling sering digunakan untuk analisis kandungan kurkuminoid dan juga XNT karena memiliki separasi yang kuat (Choi, S *et al.*, 2017). Pada tabel 6., dapat dilihat bahwa penelitian yang dilakukan oleh Nurcholis *et al* (2015) menggunakan HPLC untuk mengidentifikasi senyawa aktif pada temulawak. Tahapan yang dilakukan pada penelitian tersebut dalam melakukan uji fitokimia menggunakan HPLC adalah dengan melarutkan sampel ke dalam 50ml metanol lalu disaring kemudian diinjeksi ke dalam kolom HPLC. Fase diam yang digunakan adalah C<sub>18</sub>, sedangkan untuk fase gerak digunakan metanol. Laju alir yang digunakan yaitu 1mL/menit dengan panjang gelombang 254 nm kemudian kandungan kurkuminoid pada temulawak ditentukan berdasarkan perbandingan antara luas area sampel dengan luas area standar kurkuminoid. Erpina, E *et al* (2017) mengatakan bahwa penggunaan HPLC untuk analisis kurkuminoid dan XNT dapat berjalan secara optimal dengan beberapa parameter seperti menggunakan laju alir pada 1mL/menit dan juga menggunakan panjang gelombang yang sesuai yaitu 250 nm untuk analisa kandungan kurkuminoid. Erpina, E *et al* (2017) menambahkan bila zat aditif seperti asam format, asam asetat, dan asam fosfat ditambahkan ke dalam fase gerak berupa campuran asetonitril dan air maka hasil analisa akan lebih akurat. Hal ini disebabkan karena asam format, asam asetat, dan asam fosfat dapat meningkatkan separasi.

Tabel 7. Aktivitas Imunostimulator Pada Rimpang Temulawak

Senyawa Aktif	Dosis	Metode Penelitian	Desain Penelitian	Subyek Penelitian	Aktivitas Imunostimulator	Referensi
<i>Xanthorrhizol</i>	- 0,1 $\mu$ m - 0,3 $\mu$ m - 1,0 $\mu$ m	- Tikus ICR berjenis kelamin perempuan berusia 6 minggu diberi ekstrak <i>xanthorrhizol</i> dengan tiga macam dosis secara topikal pada bagian kulit selama 30 menit, kemudian diinduksi dengan 10 nmol TPA ( <i>tetradecanoylphorbol 13-acetate</i> ). Setelah 1 jam, tikus dibunuh dan kulit bagian dorsal disimpan pada suhu -80° C sampai analisa dilakukan.  - Untuk menganalisa	<i>In vitro</i>	Tikus ICR	Menghambat aktivasi NF-kB pada pemberian ekstrak <i>xanthorrhizol</i> dengan dosis 1,0 $\mu$ m	Chung <i>et al</i> (2007)

		adanya penghambatan NF-kB, dilakukan pengujian menggunakan metode <i>western blotting</i>				
<i>Xanthorrhizol</i>	27.47 g	Sel makrofag mencit RAW264.7 yang telah dicampur dengan senyawa pada temulawak lalu diinduksi dengan 1 µg/mL LPS ( <i>lipopolysaccharide</i> ) di dalam media kultur sel bebas serum dan didiamkan selama 24 jam. Kemudian dilakukan pengujian kadar nitrit (NO <sub>2</sub> ) menggunakan metode <i>Griess</i>	<i>In vitro</i>	Sel RAW 264.7 (sel makrofag mencit)	Menghambat produksi enzim NO sintase dengan hasil IC <sub>50</sub> (µM) : <sup>1</sup> 31,80 ± 3,22; <sup>2</sup> 8,21 ± 0,56; <sup>3</sup> 10,01 ± 0,710 ; <sup>4</sup> 4,86 ± 0,54  ( <sup>1</sup> <i>Xanthorrhizol</i> , <sup>2</sup> <i>Bidesmethoxycurcumin</i> , <sup>3</sup> Kurkumin, <sup>4</sup> <i>Demethoxycurcumin</i> )  * Nilai IC <sub>50</sub> menunjukkan konsentrasi senyawa aktif yang dapat menghambat enzim NO sintase hingga 50%	Park <i>et al</i> (2014)
<i>Bidesmethoxycurcumin</i>	0.46 g					
Kurkumin	10.69 g					
<i>Demethoxycurcumin</i>	2.35 g					

Kurkuminoid	<p>- Wonogiri : 85,19 mg/g</p> <p>- Sukabumi : 73,82 mg/g</p> <p>- Ngawi : 35,57 mg/g</p> <p>-Karanganyar: 74,2 mg/g</p> <p>- Bogor- Balitro : 82,19 mg/g</p>	<p>Larutan enzim <math>\alpha</math>-glukosidase yang telah disiapkan dicampur dengan larutan ekstrak temulawak pada konsentrasi 50, 100, 250, 500, dan 1000 <math>\mu\text{g/mL}</math> dalam pelarut DMSO (dimetil sulfoksida). Kemudian dilakukan analisis aktivitas inhibisi enzim <math>\alpha</math>-glukosidase diukur dengan <i>microplate reader</i> pada panjang gelombang 410 nm, kemudian ditentukan nilai <math>\text{IC}_{50}</math>. Hasil dibandingkan dengan standar obat komersial</p>	<i>In vitro</i>	Larutan enzim $\alpha$ -glukosidase	<p>Menghambat aktivitas enzim <math>\alpha</math>-glukosidase dengan nilai <math>\text{IC}_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>):</p> <p>Akarbosa = 0,53</p> <p>Wonogiri = 333,27</p> <p>Sukabumi = 347,10</p> <p>Ngawi = 908,35</p> <p>Karanganyar = 892</p> <p>Kursina = 438,04</p>	Nurcholis <i>et al</i> 2015

		untuk inhibisi aktivitas enzim $\alpha$ -glukosidase yaitu akarbosa.				
Kurkuminoid	50 mg	Pengujian dilakukan kepada pasien SLE berusia 20-59 tahun sebanyak 10 orang dengan pemberian kapsul gelatin mengandung 50 mg kurkuminoid/kapsul. Pemberian kapsul sebanyak 3 kapsul/hari. Untuk kelompok kontrol digunakan plasebo pada 4 orang. Pada pengujian ini, pasien tetap mengonsumsi obat terapi SLE yaitu <i>methylprednisolone</i> dan <i>mycofenolate</i> . Kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi TNF- $\alpha$	<i>In vivo</i>	Manusia (pasien SLE)	Menurunkan konsentrasi TNF- $\alpha$ dengan hasil penurunan tertinggi yaitu : - Kelompok perlakuan : Sebelum pemberian ekstrak temulawak sebesar 10,25 pg/mL dan setelah pemberian ekstrak temulawak sebesar 0 pg/mL. - Kelompok kontrol : Sebelum plasebo sebesar 22 pg/mL dan setelah plasebo sebesar 14,38 pg/mL	Setiawati <i>et al</i> (2017)



		dilakukan dengan menggunakan ELISA pada sampel serum darah penderita SLE.				
Polisakarida (arabinosa, galaktosa, glukosa, manosa, ramnosa, silosa)	10 mg	Sel RAW 264.7 diberi perlakuan dengan konsentrasi ekstrak polisakarida temulawak yang berbeda (5, 20, 30, dan 50 $\mu\text{g/mL}$ ) pada suhu 37° C selama 24 jam. Kemudian diinkubasi bersama dengan bakteri <i>E.coli</i> pada suhu 37° C selama 2 jam. Kemudian aktivitas fagositosis pada sel RAW (sel makrofag mencit) diukur dengan <i>fluorecence microplate reader</i>	<i>In vitro</i>	Sel RAW 264.7 (sel makrofag mencit)	Aktivitas fagositosis meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak polisakarida dari temulawak dengan hasil (% efek fagositosis) :  1. Kontrol (0 $\mu\text{g/mL}$ ) = 100%  2. Penambahan ekstrak polisakarida : - 5 $\mu\text{g/mL}$ = 167% - 10 $\mu\text{g/mL}$ = 200% - 30 $\mu\text{g/mL}$ = 251% - 50 $\mu\text{g/mL}$ = 340%	Kim <i>et al</i> (2007)

Zedoaraldehyde	3,7 mg	Sel HEK293 diletakkan di 6 media plat dengan berat $5 \times 10^5$ sel/plat dan diinkubasi pada suhu $37^\circ$ C. Kemudian sel diberi perlakuan pemberian ekstrak temulawak sebanyak $20 \mu\text{m}$ selama 24 jam. Kemudian dilakukan lisis dan sentrifugasi pada sel. Supernatan digunakan untuk analisa tingkat ekspresi protein sirtuin (SIRT 1) menggunakan metode <i>western blot</i>	<i>In vitro</i>	Sel HEK293 (sel pada ginjal embrionik)	Peningkatan level protein sirtuin dihasilkan dengan nilai <i>fold change</i> (peningkatan ekspresi). Hasil dari penelitian ini adalah : - Zedoaraldehyde = 1.37-fold - 13 Hydrocygermacrone = 1.7 fold - Germacrone = 1,73-fold	Zhang <i>et al</i> (2015)
Germacrone	29 mg					
13-Hydrocygermacrone	5,2 mg					

### **3.2.3. Aktivitas Senyawa Aktif Pada Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) Sebagai Immunostimulator Terhadap COVID-19**

#### **3.2.3.1. Fenol (*Protocatechuic Acid*) dan Flavonoid (Antosianin)**

Pada tabel 7., dapat dilihat bahwa asam *protocatechuic acid* pada ekstrak bunga rosella sebanyak 2mM dapat menginduksi apoptosis dengan menurunkan protein BCL-2 hingga 47% setelah 1.5 jam *treatment* pada sel leukemia manusia (Tseng *et al.*, 2000). Penelitian lainnya juga dilakukan oleh Lin *et al* (2006) yang menyatakan bahwa ekstrak bunga rosella yang mengandung senyawa aktif polifenol (17.0 mg/L), flavonoid (14.3 mg/L), dan senyawa aktif yang tergolong dalam polifenol dan flavonoid yaitu antosianin (25.0 mg/L) yang dapat menginduksi apoptosis hingga 30% pada sel kanker hati manusia. Keluarga protein BCL-2 merupakan salah satu produk gen yang memiliki kaitan dengan proses apoptosis. Setelah virus COVID-19 menginfeksi sel inangnya, beberapa jalur sinyal di dalam tubuh dapat memfasilitasi replikasi virus. Sebagian besar jalur pensinyalan ini, seperti EGFR, PI3K/AKT, JNK, dapat diaktifkan secara berlebihan oleh protein virus corona sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi dalam tubuh. Protein virus corona juga dapat menyebabkan disregulasi ekspresi BCL-2 sehingga dapat menyebabkan ekspresi berlebih. Selain itu, Tan, T.X *et al* (2007) mengatakan bahwa ekspresi berlebih pada BCL-XL yang merupakan anggota *prosurvival* dari keluarga BCL-2 dapat menghambat apoptosis virus corona. Proses apoptosis memiliki fungsi untuk mengeliminasi virus yang menginfeksi tubuh.

#### **3.2.3.2. Fenol, flavonoid, dan Terpenoid**

Selain itu, pada tabel 7., juga dapat dilihat bahwa sebanyak 68,21 gram ekstrak bunga rosella yang mengandung fenol dan flavonoid dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit pada mencit jantan dengan nilai OD tertinggi pada fraksi air ekstrak etanol bunga rosella 400 µg/mL yaitu  $0,536 \pm 0,020$  (Puspitowati *et al.*, 2021). Penelitian serupa juga dilakukan oleh Nirmalasari *et al* (2013) yang menyatakan bahwa peningkatan proliferasi sel limfosit mencit jantan ditunjukkan oleh nilai OD tertinggi pada fraksi etil

asetat ekstrak etanol bunga rosella 400  $\mu\text{g/mL}$  yaitu  $0,725 \pm 0,040$ . Dan juga terdapat penelitian yang dilakukan oleh Ulfa *et al* (2014) yang menyatakan bahwa dengan 40,13 gram ekstrak bunga rosella yang mengandung fenol, flavonoid, dan terpenoid dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit dengan nilai OD tertinggi dihasilkan oleh fraksi etil asetat bunga rosella yaitu  $0,725 \pm 0,040$ . Berdasarkan dari ketiga penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa bunga rosella fraksi etil asetat dapat meningkatkan proliferasi sel lebih tinggi dibandingkan fraksi air. Hal ini disebabkan karena fraksi etil asetat memiliki kemampuan melarutkan lebih tinggi dibandingkan fraksi air.

Sel limfosit dapat memberikan respon imun spesifik dengan mengenali adanya patogen yang pertama kali dihadapi dan bila terjadi paparan berulang oleh patogen yang sama maka dapat meningkatkan respon imun spesifik. Sel limfosit yang berinteraksi dengan patogen akan mengalami proliferasi dan mengaktifkan sel-sel efektor untuk mematikan patogen yang masuk ke tubuh (Baratawidjaya & Rengganis, 2012). Proliferasi merupakan fungsi biologis mendasar limfosit yaitu proses diferensiasi dan pembelahan (mitosis) sel. Fungsi limfosit dan status imun tubuh dapat digambarkan dengan adanya respon proliferasi pada kultur limfosit (Roitt & Delves, 2011). Dengan demikian, dengan adanya peningkatan proliferasi sel limfosit dalam tubuh, maka akan meningkatkan sistem pertahanan tubuh terhadap virus COVID-19.

### 3.2.3.3. Flavonoid

Pada tabel 7., juga dapat dilihat bahwa bunga rosella yang mengandung senyawa aktif flavonoid dapat meningkatkan jumlah sel CD4 dengan pemberian kapsul yang berisi 500 mg serbuk bunga rosella pada laki-laki dan perempuan sehat berusia 18-50 satu kali/hari. Setelah hari ke-31, jumlah sel CD4 mengalami peningkatan dengan persentase 34,15% sedangkan pada hari ke-0 yaitu 30,85% (Mardhiyani *et al.*,2018). Menurut Chen.G *et al* (2019), orang yang terinfeksi virus COVID-19 mengalami penurunan jumlah sel T CD4 hingga kurang dari 20% sedangkan persentase normal

CD4 adalah 25-60%. Hal ini sering disebut sebagai limfopenia yang kerap terjadi pada pasien COVID-19 (He *et al.*, 2005). Sel CD4 memiliki peran penting dalam mengatur respon imun, mengatur penghapusan dan amplifikasi sel imun. Sel T CD4 memfasilitasi produksi antibodi spesifik virus melalui aktivasi sel B. Dengan demikian, bunga rosella yang mengandung senyawa aktif flavonoid dapat berperan penting dalam meningkatkan jumlah sel CD4 dan sel imun juga meningkat. Namun karena belum adanya penelitian secara klinis mengenai potensi senyawa aktif pada bunga rosella terhadap COVID-19, maka diperlukan penelitian lebih lanjut.

### **3.2.4. Uji Fitokimia Pada Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L*)**

#### **3.2.4.1. KLT (Kromatografi Lapis Tipis)**

KLT memiliki prinsip kerja dengan pemisahan campuran karena adanya pergerakan solven yang melewati permukaan datar dan komponen tersebut akan berpindah dengan kecepatan yang berbeda tergantung dari kelarutan, daya serap, ukuran molekul, serta elusinya. Untuk mengidentifikasi senyawa aktif pada bunga rosella dapat digunakan KLT karena praktis, sederhana, efektif, cepat, tervalidasi, dan sensitif (Fifield & Kealey, 2000). Pada tabel 6., dapat dilihat bahwa pada penelitian yang dilakukan oleh Ulfah *et al* (2014), Nirmalasari *et al* (2013), dan Puspitowati *et al* (2021) menggunakan KLT untuk mengidentifikasi senyawa aktif pada bunga rosella. Pengamatan KLT dilakukan dengan membandingkan antara warna bercak yang dihasilkan pada KLT setelah elusi dengan literatur dan membandingkan antara bercak senyawa uji dengan bercak senyawa standar di bawah sinar UV dengan absorbansi 254 nm dan 366 nm. Pembanding yang digunakan adalah kuersetin yang merupakan flavonoid golongan flavonol. Hasil analisis yang dilakukan adalah bunga rosella mengandung senyawa aktif flavonoid.

KLT adalah jenis kromatografi di mana fase geraknya adalah cairan dan fase diamnya adalah lapisan tipis material di atas pelat datar (sorben). Fase gerak merupakan pelarut (*solvent*) yang membawa zat terlarut (*solute*)

melalui fase diam (Santiago & Strobel.,2013). Fase diam yang digunakan dalam penelitian Ulfah *et al* (2014), Nirmalasari *et al* (2013), dan Puspitowati *et al* (2021) adalah *silica gel*, sedangkan untuk fase gerak digunakan campuran antara butanol, asam asetat, dan air. Fase gerak yang digunakan adalah campuran dari berbagai pelarut yang bertujuan untuk meningkatkan polaritas fase gerak (Santiago & Strobel.,2013). Zat yang tertarik kuat ke sorben akan bergerak lebih lambat sedangkan zat lainnya yang bergerak lebih cepat akan larut dalam fase gerak. Oleh karena itu, senyawa dengan sifat yang berbeda dapat dipisahkan satu sama lain (Santiago & Strobel.,2013).

#### **3.2.4.2. Metode *Fuleki and Francis, Folin-Ciocalteu, dan Jia***

Selain KLT, metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa aktif pada bunga rosella adalah metode *Fuleki* dan *Francis, Folin-Ciocalteu*, dan *Jia*. Pada tabel 6., dapat dilihat bahwa pada jurnal penelitian Lin *et al* (2006) terdapat identifikasi senyawa aktif yang dilakukan oleh peneliti lainnya. Dalam mengidentifikasi senyawa polifenol digunakan metode *Folin-Ciocalteu* (Lakenbrink *et al.*, 2000). Langkah yang dilakukan dalam metode *Folin-Ciocalteu* adalah ekstrak bunga rosella dilarutkan dengan air suling terlebih dahulu kemudian ditambahkan reagen *Folin-Ciocalteu* dan didiamkan selama 3 menit lalu ditambahkan  $\text{Na}_2\text{CO}$  2%. Selanjutnya dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer dengan absorbansi 750 nm (Lakenbrink *et al.*, 2000). Kemudian diamati perubahan warna larutan, bila mengandung senyawa polifenol maka warna akan berubah menjadi biru (Sahala & Soegihardjo., 2012).

Sedangkan untuk analisa total kandungan flavonoid digunakan metode *Jia* menggunakan rutin sebagai standar. Tahapan dari metode ini adalah dengan mengencerkan ekstrak bunga rosella kemudian ditambahkan 5% larutan  $\text{NaNO}_3$ . Kemudian setelah 6 menit ditambahkan 10% larutan  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dan ditunggu selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan 1 MnaOH dan air suling. Kemudian diukur menggunakan spektrofotometer dengan absorbansi

510nm. Dan untuk menganalisa kandungan antosianin total dalam ekstrak bunga rosella dapat digunakan metode Fuleki dan Francis (Lin *et al.*, 2006). Tahapan pertama yang perlu dilakukan dalam metode Fuleki dan Francis adalah dengan pengenceran ekstrak bunga rosella dengan buffer pH 1,0 dan 4,5 kemudian dilakukan pengukuran absorbansi sampel pada 535 nm dan menggunakan akuades sebagai kontrol. Terdapat perbedaan absorbansi total dari pada pH 4,5 dan 1,0 lalu dilakukan pengurangan sebagai perhitungan.



Tabel 8. Aktivitas Imunostimulator pada Bunga Rosella

<b>Senyawa Aktif</b>	<b>Dosis</b>	<b>Metode Penelitian</b>	<b>Desain Penelitian</b>	<b>Subyek Penelitian</b>	<b>Aktivitas Imunostimulator</b>	<b>Referensi</b>
<i>Protocatechuic acid (phenolic compound)</i>	2mM	Sel HL-60 yang ditumbuhkan dalam labu (10 mmol/mL) selama 18 jam. Setelah pelabelan, sel-sel dikumpulkan dan disuspensikan kembali dengan berat $1 \times 10^5$ sel/mL, lalu diinkubasi dengan Hibiscus PCA ( $0 \pm 2$ mM) selama 12 jam. Kemudian penurunan tingkat protein BCL-2 diukur dengan ELISA	<i>In vitro</i>	Sel leukemia pada manusia (HL-60)	Menginduksi apoptosis dengan menurunkan BCL-2 protein hingga 47% setelah 1.5 jam treatment	Tseng <i>et al</i> (2000)
Fenol dan flavonoid	68,21 g ekstrak bunga rosella	100 $\mu$ L sel limfosit didistribusikan ke sumuran mikropelat 96 wells. Sumuran yang			Meningkatkan proliferasi sel limfosit dengan hasil : - Kontrol sel (kontrol -) :	Puspitowati <i>et al</i> (2021)



		<p>hanya berisi sel limfosit saja merupakan kontrol dan sumuran yang ditambahkan vaksin hepatitis B sebanyak 10 <math>\mu</math>L merupakan kelompok dengan perlakuan. Kemudian sel diinkubasi selama 24 jam lalu ditambahkan larutan uji yang terbuat dari fraksi air ekstrak etanol kelopak bunga rosella dengan 6 konsentrasi (10, 20, 50, 100, 200, 400 <math>\mu</math>g/mL) dan 10 <math>\mu</math>g/mL untuk kontrol positif.</p> <p>Kemudian uji aktivitas proliferasi sel</p>	<p><i>In vitro</i></p>	<p>Limpa mencit jantan galur Swiss</p>	<p>0,345 <math>\pm</math> 0,037</p> <p>- PHA 10 <math>\mu</math>g/mL (kontrol +) : 0,366 <math>\pm</math> 0,039</p> <p>- Fraksi air 10 <math>\mu</math>g/mL : 0,383 <math>\pm</math> 0,032</p> <p>- Fraksi air 20 <math>\mu</math>g/mL : 0,419 <math>\pm</math> 0,040</p> <p>- Fraksi air 50 <math>\mu</math>g/mL : 0,418 <math>\pm</math> 0,058</p> <p>- Fraksi air 100 <math>\mu</math>g/mL : 0,350 <math>\pm</math> 0,015</p> <p>- Fraksi air 200 <math>\mu</math>g/mL : 0,403 <math>\pm</math> 0,020</p> <p>- Fraksi air 400 <math>\mu</math>g/mL :</p>	
--	--	--	------------------------	--	---	--

		<p>dilakukan dengan ELISA reader dengan hasil berupa nilai OD (<i>Optical Density</i>).</p> <p>*nilai OD = jumlah sel yang hidup</p>		<p><b>0,536 ± 0,020</b></p> <p>Fraksi air ekstrak etanol bunga rosella 400 µg/ml memiliki nilai OD tertinggi, yaitu 0,536 ± 0,020</p>	
		<p>100 µL sel limfosit didistribusikan ke sumuran mikropelat 96 wells. Sumuran yang hanya berisi sel limfosit saja merupakan kontrol dan sumuran yang ditambahkan vaksin hepatitis B sebanyak 10 µL merupakan kelompok dengan perlakuan. Kemudian sel diinkubasi selama 24 jam lalu</p>		<p>Meningkatkan proliferasi sel limfosit dengan hasil :</p> <p>- Kontrol sel (kontrol -) : 0,324 ± 0,022</p> <p>- PHA 10 µg/mL (kontrol +) : 0,340 ± 0,029</p> <p>- Fraksi etil asetat 10 µg/mL : 0,349 ± 0,027</p> <p>- Fraksi etil asetat 20</p>	<p>Nirmalasari <i>et al</i> (2013)</p>

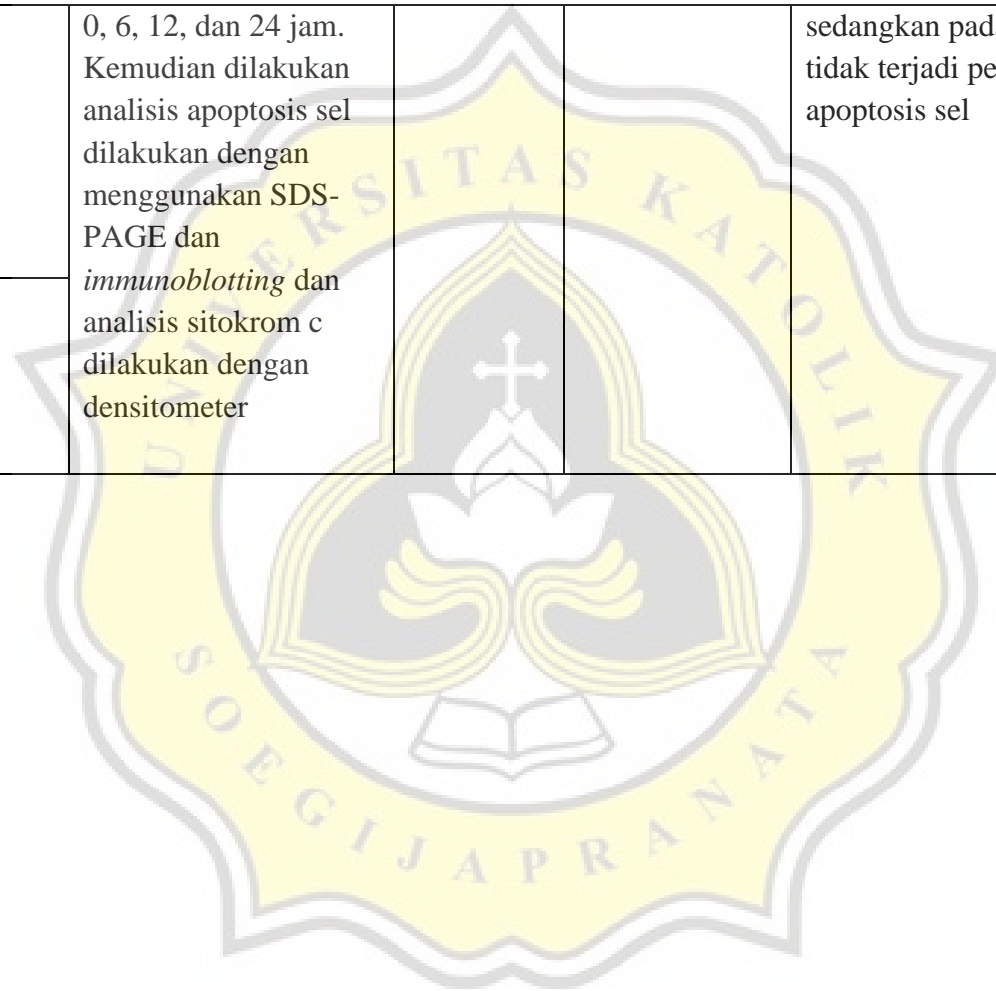
		<p>ditambahkan larutan uji yang terbuat dari fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella dengan 6 konsentrasi (10, 20, 50, 100, 200, 400 <math>\mu\text{g/mL}</math>) dan 10 <math>\mu\text{g/mL}</math> untuk kontrol positif.</p> <p>Kemudian uji aktivitas proliferasi sel dilakukan dengan ELISA <i>reader</i> dengan hasil berupa nilai OD (<i>Optical Density</i>).</p> <p>*nilai OD = jumlah sel yang hidup</p>			<p><math>\mu\text{g/mL}</math> :  <math>0,351 \pm 0,023</math></p> <p>- Fraksi etil asetat 50  <math>\mu\text{g/mL}</math> :  <math>0,398 \pm 0,037</math></p> <p>- Fraksi etil asetat 100  <math>\mu\text{g/mL}</math> :  <math>0,450 \pm 0,100</math></p> <p>- Fraksi etil asetat 200  <math>\mu\text{g/mL}</math> :  <math>0,539 \pm 0,077</math></p> <p>- Fraksi etil asetat 400  <math>\mu\text{g/mL}</math> :  <b><math>0,725 \pm 0,040</math></b></p> <p>Fraksi air ekstrak etil asetat bunga rosella 400 <math>\mu\text{g/ml}</math> memiliki nilai OD</p>	
--	--	--	--	--	--	--

					tertinggi, yaitu $0,725 \pm 0,040$	
Flavonoid	500 mg serbuk bunga rosella	Penelitian dilakukan dengan pemberian kapsul serbuk bunga rosella dengan dosis 500 mg, satu kali sehari selama 30 hari. pada laki-laki dan perempuan sehat berusia 18-50 tahun kemudian untuk pemeriksaan CD4 dilakukan dengan pengambilan darah pada bagian vena <i>median cubiti</i> dan dimasukkan ke dalam tabung EDTA lalu jumlah sel CD4 diukur menggunakan FACS	<i>In vivo</i>	Manusia	Meningkatkan jumlah sel CD4 dengan hasil persentase : - Hari ke-0 = 30,85% - Hari ke-31 = 34,15%	Mardhiyani <i>et al</i> (2018)

		<i>flow cytometer</i>				
Terpenoid, fenol, dan flavonoid	40,13 g ekstrak bunga rosella	100 µL sel limfosit didistribusikan ke sumuran mikropelat 96 wells. Sumuran yang hanya berisi sel limfosit saja merupakan kontrol dan sumuran yang ditambahkan vaksin hepatitis B sebanyak 10 µL merupakan kelompok dengan perlakuan. Kemudian sel diinkubasi selama 24 jam lalu ditambahkan larutan uji yang terbuat dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi air ekstrak kelopak bunga rosella dengan 6 konsentrasi (10, 20,	<i>In vitro</i>	Sel limfosit	Meningkatkan proliferasi sel limfosit dengan nilai OD tertinggi dihasilkan oleh fraksi etil asetat bunga rosella sebesar $0,725 \pm 0,040$	Ulfah <i>et al</i> (2014)

		<p>50, 100, 200, 400 <math>\mu\text{g/mL}</math>) dan 10 <math>\mu\text{g/mL}</math> untuk kontrol positif.</p> <p>Kemudian uji aktivitas proliferasi sel dilakukan dengan ELISA <i>reader</i> dengan hasil berupa nilai OD (<i>Optical Density</i>).</p> <p>*nilai OD = jumlah sel yang hidup</p>				
Antosianin	25.0 mg/L	<p>Ekstrak bunga rosella dengan (0, 1.0, 2.0, dan 3.0 mg/mL) ditambahkan pada media kultur dengan 4 perlakuan waktu yaitu</p>	<i>In vitro</i>	Sel kanker hati manusia	Menginduksi apoptosis dengan persentase apoptosis sel sebesar 30% pada konsentrasi ekstrak bunga rosella sebesar 3 mg/ml	Lin <i>et al</i> (2006)

Polifenol	17.0 mg/L	0, 6, 12, dan 24 jam. Kemudian dilakukan analisis apoptosis sel dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE dan <i>immunoblotting</i> dan analisis sitokrom c dilakukan dengan densitometer			sedangkan pada kontrol tidak terjadi peningkatan apoptosis sel	
Flavonoid	14.3 mg/L					



### **3.2.5. Aplikasi dan Stabilitas Senyawa Aktif Pada Temulawak dan Rosella**

#### **3.2.5.1. Aplikasi Temulawak dan Rosella**

Pada umumnya rimpang temulawak dan bunga rosella dikonsumsi dalam bentuk simplisia segar dengan menyeduhnya. Namun untuk meningkatkan umur simpan produk maka digunakan teknologi pengeringan maupun dibuat dalam bentuk serbuk yang biasa digunakan dalam industri pengobatan tradisional. Menurut Ma'mun *et al* (2006), jika suatu bahan memiliki kadar air yang tinggi maka akan memicu enzim untuk mengubah senyawa kimia yang ada di dalam bahan tersebut sehingga mengubah kualitas bahan tersebut hingga menghilangkan efek farmakologi yang dimiliki. Dengan demikian, metode pengeringan memiliki peran penting dalam mempertahankan kualitas temulawak dan rosella. Proses termal seringkali diaplikasikan pada proses pengolahan pangan dengan tujuan untuk perbaikan warna dan tekstur, inaktivasi enzim, perbaikan mutu gizi, serta untuk sterilisasi. Terdapat beberapa contoh proses termal yang biasa dilakukan pada proses pengolahan pangan seperti *blanching*, *roasting* (pemangangan), *boiling* (perebusan), *microwaving* (penggunaan oven gelombang mikro), dan sterilisasi (Rohadi and Wahjuningsih, 2019). Namun perlu diingat bahwa dalam mengolah bahan pangan herbal seperti temulawak dan rosella diperlukan suhu yang sesuai agar tidak menyebabkan penurunan senyawa aktif yang terkandung dikarenakan beberapa senyawa aktif memiliki sifat termolabil. Selain itu, menurut Mardiah, M *et al* (2017) sebelum dilakukannya pengeringan perlu dilakukan pengecilan ukuran dengan pisau ataupun tangan. Pengecilan ukuran ini akan membuka jaringan sel dan menyebabkan senyawa di dalam sel keluar karena adanya tekanan mekanis. Dengan demikian, terdapat beberapa kasus yang menyebabkan penurunan kadar senyawa aktif pada suatu bahan dikarenakan kerusakan mekanis.

Banyak manfaat kesehatan yang terdapat pada rimpang temulawak dan bunga rosella. Hal ini menyebabkan banyaknya pengembangan produk yang



dilakukan. Selain untuk obat tradisional yang biasa dikonsumsi dengan penyeduhan maupun dalam bentuk kapsul, rimpang temulawak dan bunga rosella dapat digunakan sebagai pewarna alami. Pada penelitian yang dilakukan oleh Rahardian, R *et al* (2017), bunga rosella ditambahkan pada pembuatan permen jeli sebagai pewarna dan juga menambah rasa dan memiliki preferensi panelis yang lebih tinggi dibandingkan tanpa penambahan bunga rosella. Selain itu, terdapat penelitian yang dilakukan oleh Khamidah (2014) mengenai pembuatan kue kering temulawak. Temulawak yang digunakan adalah dalam bentuk bubuk instan yang ditambahkan pada adonan kue kering dengan formulasi yang telah ditetapkan. Hasil dari penelitian ini adalah secara umum panelis menyukai kue kering temulawak dari segi rasa, warna, aroma, dan tekstur. Dikarenakan rasa temulawak yang pahit, maka diperlukan adanya formulasi khusus untuk mengembangkan produk berbasis temulawak. Seperti menambahkan gula maupun pemanis lainnya yang dapat meningkatkan preferensi konsumen.

### **3.2.5.2. Stabilitas Senyawa Aktif Pada Temulawak dan Rosella**

Temulawak dan Rosella merupakan bahan pangan herbal yang mengandung berbagai senyawa aktif di dalamnya. Keberadaan senyawa aktif tersebut bersifat tidak stabil saat pengolahan dan penyimpanan. Terdapat beberapa parameter yang dapat mempengaruhi stabilitas senyawa aktif yang terkandung pada temulawak dan rosella seperti :

#### **1. Suhu**

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Moehady (2015), senyawa kurkumin yang terkandung dalam temulawak memiliki titik optimum dengan meningkatnya suhu. Kandungan kurkumin meningkat pada suhu pengeringan 45° C dibandingkan dengan suhu 35° C. Kemudian terjadi sedikit penurunan pada suhu 45°-50° C namun pada saat mencapai suhu 60° C, kandungan kurkumin mengalami penurunan secara cepat. Pada suhu 35° C, kandungan kurkumin belum mengalami peningkatan dikarenakan pada

ekstrak temulawak masih mengandung air, sedangkan saat mencapai suhu pengeringan 60° C, kandungan kurkumin menurun dikarenakan banyaknya kurkumin yang terbuang bersama uap air. Dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa jumlah kandungan kurkumin yang optimal diperoleh pada pengeringan dengan suhu yang berkisar antara 45°-55° C.

Selain itu, suhu juga berpengaruh terhadap tingkat kecerahan produk temulawak. Semakin tinggi suhu pengeringan, maka semakin rendah tingkat kecerahan serbuk sari temulawak. Hal ini dikarenakan dengan adanya peningkatan suhu pengeringan maka akan memicu adanya proses pencoklatan non-enzimatis (reaksi *maillard*). Pada suhu pengeringan 60° C akan cepat memacu proses pencoklatan pada bubuk sari temulawak sehingga dihasilkan produk akhir yang berwarna lebih coklat kekuningan dibandingkan dengan suhu pengeringan 40°-50° C (Wiyono, R.,2011).

Sama halnya dengan temulawak, kandungan senyawa aktif pada rosella juga memiliki stabilitas yang rendah pada suhu yang tinggi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wulandari, R (2013) didapatkan bahwa semakin meningkatnya suhu pemanasan, maka terjadi hidrolisis ikatan glikosidik sehingga menyebabkan menghilangnya gugus glikosil pada antosianin. Hal ini berdampak pada kurang stabilnya aglikon yang dihasilkan sehingga menyebabkan hilangnya senyawa antosianin. Hasil penelitian ini juga diperkuat oleh hasil penelitian lain yang dilakukan oleh Suzery *et al* (2020) yang menyatakan bahwa pemanasan bunga rosella yang dilakukan pada perlakuan suhu 40° C, 60° C, dan 80° C menyebabkan total antosianin menurun seiring dengan meningkatnya suhu pemanasan dikarenakan struktur antosianin mengalami degradasi.

## 2. pH

pH merupakan parameter yang penting untuk diperhatikan terutama saat terdapat komposisi bahan lain yang diformulasikan dengan herbal yang digunakan seperti temulawak dan bunga rosella. Senyawa aktif kurkumin

yang terkandung pada temulawak memiliki kestabilan yang optimal saat pH di bawah 7. Namun, yang menjadi kekurangan dalam kondisi pH tersebut, kurkumin sulit untuk larut dalam air (Kumavat *et al.*, 2013). Sementara rosella memiliki stabilitas senyawa fenolik pada kisaran pH 2-8. Semakin tinggi kondisi pH, maka total fenolik dalam ekstrak rosella akan semakin rendah. Hal ini dikarenakan sebagian besar kandungan fenolik dalam rosella ditentukan oleh sifat antosianin. Selim *et al* (2005) mengatakan bahwa dalam kisaran pH 2-4, senyawa antosianin dalam rosella memiliki retensi yang cukup tinggi. Kandungan fenolik pada bunga rosella relatif stabil pada pH 2-4 kemudian menurun seiring dengan meningkatnya pH.

### 3. Cahaya

Selain pH dan suhu, cahaya juga merupakan parameter penting yang perlu diperhatikan dalam mengetahui stabilitas senyawa aktif yang terkandung pada temulawak dan rosella. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kumavat *et al* (2013), dihasilkan bahwa pada kondisi tanpa cahaya, kandungan kurkumin pada temulawak akan mengalami degradasi <1% kurkumin (dari keseluruhan total kurkumin) dalam 6 jam, sedangkan pada kondisi terkena cahaya, kurkumin akan mengalami degradasi 40%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa cahaya dapat menyebabkan terdegradasinya senyawa aktif pada temulawak. Selain itu, senyawa aktif pada rosella juga memiliki sensitivitas terhadap cahaya. Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nur & Fadraersada (2015) yang menyatakan bahwa jenis cahaya dan lamanya penyinaran akan mempengaruhi seberapa besar proses degradasi pada senyawa aktif antosianin yang terkandung dalam rosella. Ekstrak bunga rosella yang diberi penyinaran dengan sinar matahari akan mengalami degradasi warna lebih besar dibandingkan cahaya lampu. Cahaya dengan energi yang besar dapat menyebabkan fotooksidasi sehingga cincin flavium dari antosianin akan terbuka lebar dan menyebabkan terbentuknya struktur kalkon yang tidak berwarna dalam jumlah banyak (Andarwulan & Fitri, 2012).



### 3.3. Metode Ekstraksi Pada Rimpang Temulawak dan Bunga Rosella Untuk Identifikasi Senyawa Aktif

Berikut merupakan tabulasi data mengenai metode ekstraksi senyawa aktif pada rimpang temulawak dan bunga rosella. Pada tabel 8., terdapat total 5 data ekstraksi senyawa aktif pada rimpang temulawak dan bunga rosella. Senyawa aktif yang diekstraksi pada temulawak adalah XNT (*Xanthorrhizol*) dan antosianin pada bunga rosella. Terdapat 2 macam metode ekstraksi konvensional yaitu maserasi dan *Soxhlet*, sedangkan untuk metode ekstraksi non-konvensional terdapat UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*) dan MAE (*Microwave Assisted Extraction*).

Tabel 9. Metode Ekstraksi Senyawa Aktif Pada Rimpang Temulawak dan Bunga Rosella

Jenis Sampel	Bentuk Sampel	Senyawa Aktif	Metode Ekstraksi	Jenis Pelarut	Waktu	Kadar	Referensi
Temulawak ( <i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb)	Serbuk rimpang kering (300 gram)	XNT	Maserasi	Metanol dengan rasio bahan : pelarut (1:5 b/v)	72 jam dengan penggantian pelarut setiap 24 jam	61,57 mg/g	Wahyuni <i>et al</i> (2017)
				Dietil eter dengan rasio bahan : pelarut (1:5 b/v)		78,30 mg/g	
				n-heksana dengan rasio bahan : pelarut (1:5 b/v)		168,12 mg/g	

			<i>Soxhlet</i>	Metanol dengan rasio bahan : pelarut (1:5 b/v)	6 jam	61,96 mg/g		
				Dietil eter dengan rasio bahan : pelarut (1:5 b/v)		78,48 mg/g		
				n-heksana dengan rasio bahan : pelarut (1:5 b/v)		163,35 mg/g		
	Serbuk rimpang kering (1 gram)	XNT	UAE	Metanol (8mL/g) LS ratio	20 menit dengan suhu 50° C	85,68 mg/g	Azemi <i>et al</i> (2020)	
Rosella ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L)	Serbuk bunga rosella (100 gram)	Antosianin	Maserasi	96% Etanol (300mL)	24 jam dengan suhu 25° C	17,6884 g	Suzery <i>et al</i> (2010)	
			<i>Soxhlet</i>		8 jam dengan suhu 78° C	10,4242 g		
	Serbuk bunga rosella (50 g)	Antosianin	UAE		Akuades dengan rasio bahan:pelarut (1:7 b/v)	30 menit dengan suhu 30° C	53,776 mg/100 g	Djaeni, M <i>et al</i> (2017)
					Akuades dengan rasio bahan:pelarut (1:13 b/v)	60 menit dengan suhu 30° C	115,353 mg/100 g	

			Maserasi	Akuades dengan rasio bahan:pelarut (1:13 b/v)	8 jam dengan suhu 30° C	9,360 mg/100 g	
Serbuk rosella (10 g)	bunga kering	Antosianin	MAE	Akuades 100 mL dengan rasio bahan : pelarut (1:10 w/v)	5 menit dengan daya 325 W	13,8591 mg/100 g	Purbowati & Maksum (2019)



### **3.3.1 Metode Ekstraksi Konvensional**

#### **3.3.1.1. Maserasi**

Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi konvensional yang dilakukan dengan perendaman bahan menggunakan pelarut yang sesuai dengan senyawa aktif (Chairunnisa, S *et al.*, 2019). Proses ekstraksi dengan metode maserasi dilakukan dengan perendaman bahan organik dan pelarut kemudian dilakukan pengadukan secara berulang pada suhu ruang. Kelebihan dari cara ini adalah mudah dan memperkecil kemungkinan bahan organik untuk rusak dikarenakan tidak perlunya pemanasan. Pada metode ini penting dilakukan pemilihan pelarut yang sesuai berdasarkan kelarutan dan polaritasnya untuk memudahkan proses pemisahan senyawa dalam sampel. Pada umumnya proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan suhu ruang (25-30° C). Hal ini menyebabkan senyawa aktif kurang terlarut dengan sempurna (Susanty & Bachmid, 2016). Hal lain yang perlu diperhatikan dalam menggunakan metode ekstraksi maserasi adalah waktu. Semakin lama waktu maserasi maka semakin lama zat pelarut kontak dengan bahan sehingga meningkatkan jumlah sel yang pecah dan senyawa aktif yang terlarut (Wahyuni & Widjanarko, 2015).

#### **3.3.1.2. Soxhlet**

Metode ekstraksi konvensional lainnya yang sering digunakan untuk ekstraksi senyawa aktif pada bahan organik adalah metode *Soxhlet*. Ekstraksi metode Soxhlet dilakukan menggunakan alat Soxhlet yang terbuat dari kaca (*glass*) yang bekerja secara kontinyu dalam proses penyarian. Prinsip kerja pada metode ekstraksi *Soxhlet* adalah dengan memasukkan sampel ke dalam alat *Soxhlet* dan dielusi dengan pelarut yang tepat dalam waktu kurang lebih 30 menit. Metode ekstraksi ini menggunakan panas yang dapat diatur. Dengan adanya pemanasan dapat menyebabkan pelarut menguap ke atas lalu diembunkan oleh pendingin udara dan berkondensasi menjadi tetesan-tetesan yang berkumpul kemudian menetes pada bahan yang diekstraksi. Proses ini dilakukan secara kontinyu hingga mencapai hasil yang maksimal.



### **3.3.2. Metode Ekstraksi Non-Konvensional**

#### **3.3.2.1 MAE (*Microwave Assisted Extraction*)**

Salah satu metode ekstraksi non-konvensional adalah dengan metode MAE (*Microwave Assisted Extraction*). Metode MAE memanfaatkan energi gelombang mikro yang menghasilkan panas sehingga menyebabkan dinding sel bahan organik hancur dan senyawa aktif yang akan di ekstrak keluar kemudian berdifusi dengan pelarut (Nguyen, 2020). Gelombang mikro yang digunakan memiliki frekuensi dari 0,3 hingga 300 GHz. Pada umumnya, metode ekstraksi MAE menggunakan air sebagai pelarut sehingga tidak meninggalkan residu yang beracun serta meminimalkan penggunaan pelarut organik (Purbowati & Maksum, 2019).

#### **3.3.2.2. UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*)**

Selain MAE, terdapat metode ekstraksi non-konvensional lainnya yaitu UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*) yang menggunakan gelombang suara ultrasonik dengan frekuensi antara 20 kHz – 100 MHz (3). Efek kavitasi ultrasonik dapat meningkatkan transportasi massa dengan merusak dinding sel bahan organik yang di ekstraksi sehingga dapat menyebabkan lepasnya senyawa aktif yang diekstraksi. Selain itu, gelombang ultrasonik juga dapat menyebabkan pembesaran pori-pori dinding sel sehingga terjadi pembengkakan dan terjadinya proses hidrasi sehingga meningkatkan proses difusi (Nurhadi *et al.*, 2019).

### **3.3.3. Efektivitas Metode Ekstraksi Senyawa Aktif Pada Rimpang**

#### **Temulawak**

Pada tabel 8., dapat dilihat bahwa kadar XNT tertinggi terdapat pada sampel temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) yang diekstraksi dengan metode maserasi yaitu 168,12 mg/g. Pada penelitian yang dilakukan oleh Wahyuni *et al* (2017) dilakukan masing-masing 3 percobaan pada metode ekstraksi maserasi dan Soxhlet dengan masing-masing 3 jenis pelarut yaitu metanol, dietil eter, dan n-heksana dengan rasio bahan : pelarut (1:5 b/v). Waktu yang

digunakan adalah 72 jam dengan penggantian pelarut setiap 24 jam. Karena lamanya waktu dalam proses maserasi maka semakin lama kontak antara pelarut dan bahan yang diekstraksi sehingga akan memperbanyak jumlah sel yang pecah dan bahan aktif yang terlarut (Wahyuni & Widjanarko, 2015). Sedangkan waktu yang dibutuhkan pada metode ekstraksi *Soxhlet* lebih cepat yaitu hanya 6 jam. Meskipun hasil ekstraksi dengan metode maserasi lebih tinggi, namun hasilnya tidak jauh berbeda dengan penggunaan ekstraksi metode *Soxhlet* yaitu 163,35 mg/g.

Bila dibandingkan dengan penggunaan metode ekstraksi UAE yang dilakukan oleh Azemi et al (2020), kadar XNT pada metode ekstraksi maserasi lebih tinggi. Dengan penggunaan metode ekstraksi UAE dihasilkan kadar XNT sebanyak 85,68 mg/g. Namun terdapat perbedaan jumlah sampel yang diekstraksi dimana jumlah sampel yang digunakan dalam metode maserasi sebanyak 300 gram, sedangkan yang digunakan dalam metode UAE hanya sebanyak 1 gram dalam bentuk yang sama yaitu serbuk rimpang kering. Hal ini dapat disimpulkan bahwa pada metode ekstraksi UAE memiliki keunggulan pada penggunaan sampel dalam jumlah yang kecil. Selain itu, waktu yang digunakan dalam metode ekstraksi UAE pun lebih cepat yaitu hanya 20 menit. Sedangkan waktu yang dibutuhkan pada metode ekstraksi maserasi jauh lebih lama yaitu 72 jam. Dengan ini, metode ekstraksi UAE memiliki efisiensi waktu dan penggunaan jumlah sampel. Hanya saja pada metode ekstraksi maserasi tidak menggunakan panas sedangkan pada metode ekstraksi UAE menggunakan panas. Namun suhu panas yang digunakan pada UAE dapat diatur sehingga dapat mengurangi penurunan komponen termolabil

#### **3.3.4. Efektivitas Metode Ekstraksi Senyawa Aktif Pada Bunga Rosella**

Selain rimpang temulawak, pada tabel 8., dapat dilihat juga metode ekstraksi yang digunakan pada bunga rosella untuk ekstraksi senyawa aktif antosianin. Pada penelitian yang dilakukan oleh Suzery *et al* (2010),

dilakukan 2 jenis metode ekstraksi, yaitu maserasi dan *Soxhlet* dan dihasilkan kadar antosianin tertinggi pada metode ekstraksi maserasi yaitu sebanyak 17,68 g dengan proses ekstraksi selama 24 jam menggunakan suhu 25° C dengan pelarut 96% Etanol (300 mL). Sedangkan pada penggunaan metode ekstraksi *Soxhlet*, dihasilkan kadar antosianin sebesar 10,42 g dengan proses ekstraksi selama 8 jam menggunakan suhu 78° C dengan pelarut 96% Etanol (300 mL). Metode *Soxhlet* menggunakan suhu yang lebih tinggi dibandingkan maserasi sehingga beresiko untuk menurunkan komponen yang bersifat termolabil. Perihal waktu, metode *Soxhlet* memiliki efisiensi yang lebih besar dibandingkan maserasi.

Dibandingkan dengan metode UAE, proses ekstraksi dengan maserasi menghasilkan kadar antosianin yang rendah. Pada penelitian yang dilakukan oleh Djaeni, M *et al* (2017), kadar antosianin yang dihasilkan melalui proses ekstraksi UAE sebesar 115,353 mg/100 g dengan waktu 60 menit dan suhu 30°C serta menggunakan pelarut akuades dengan rasio bahan : pelarut (1:13 b/v). Proses ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dengan sampel serbuk bunga rosella 50 g. Sedangkan kadar antosianin yang dihasilkan melalui proses ekstraksi maserasi sebesar 9,360 mg/100 g dengan waktu 8 jam dan suhu 30° C menggunakan pelarut yang sama dengan metode ekstraksi UAE.

Dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Djaeni, M *et al* (2017), dapat disimpulkan bahwa metode ekstraksi UAE lebih efisien dibandingkan maserasi dikarenakan prosesnya yang lebih cepat dan menghasilkan kadar antosianin yang jauh lebih tinggi. Bila dibandingkan dengan metode ekstraksi UAE, metode ekstraksi MAE menghasilkan kadar antosianin yang lebih rendah yaitu 13,8591 mg/100 g dengan waktu 5 menit dan daya 325 W serta menggunakan pelarut akuades 100 mL dengan rasio bahan : pelarut (1:10 w/v). Dari hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa metode MAE memiliki efisiensi waktu yang tinggi dibandingkan UAE. Namun kadar antosianin yang dihasilkan jauh lebih rendah dibandingkan dengan menggunakan metode ekstraksi UAE. Antosianin adalah senyawa yang

sensitif terhadap panas sehingga bersifat termolabil, maka bila waktu ekstraksi semakin lama, antosianin akan terdegradasi (He *et al.*, 2016). Dengan penggunaan suhu ruang dan waktu yang tidak begitu lama dibandingkan proses ekstraksi dengan maserasi namun menghasilkan kadar yang lebih tinggi, metode UAE merupakan metode yang efisien dalam ekstraksi antosianin pada bunga rosella. Selain itu, pada metode ekstraksi UAE digunakan akuades sebagai pelarut sehingga tidak beracun dan meminimalkan penggunaan pelarut organik (10,15,16). Dan akuades bersifat polar sehingga dapat mengekstraksi antosianin dengan baik, zat terlarut akan terlarut dengan sempurna karena memiliki nilai polaritas yang sama dengan pelarut (Pandey & Tripathi 2014; Kumoro, 2015).

