

UJI AKTIVITAS IMUNOSTIMULATOR EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI-FRAKSI KELOPAK BUNGA ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa* L.) TERHADAP PROLIFERASI SEL LIMFOSIT MENCIT GALUR SWISS SECARA *IN VITRO* BESERTA IDENTIFIKASI KANDUNGAN KIMIANYA

Maria Ulfah^{1*}, Nirmalasari¹, Desi Yulianti¹, Riyanto Sakti¹, Oktarina Heni¹, Ediati Sasmito²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim Semarang
Jl. Menoreh Tengah X/22, Sampangan, Semarang

²Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
Sekip Utara Jl. Kaliurang Km. 4 Yogyakarta

*E-mail: Mariau_astra@yahoo.com

Abstrak

Agen imunostimulator berperan penting dalam pengobatan penyakit infeksi akibat patogen. Kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai minuman kesehatan untuk meningkatkan sistem imun tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunostimulator fraksi etil asetat ekstrak etanol kelopak bunga rosella terhadap proliferasi sel limfosit mencit galur swiss beserta identifikasi kandungan kimianya. Ekstraksi kelopak bunga rosella dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian dilanjutkan fraksinasi secara bertingkat dengan menggunakan *n*-heksana, etil asetat dan air. Sampel uji ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air masing-masing dibuat dengan konsentrasi 10, 20, 50, 100, 200, 400 µg/mL dan kontrol positif PHA 10 µg/mL untuk diujikan terhadap kultur sel limfosit. Uji aktivitas imunostimulator menggunakan metode MTT Assay. Aktivitas proliferasi sel limfosit dianalisis secara statistik terhadap nilai Optical Density (OD) dari Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) reader menggunakan statistik parametrik uji Oneway Anova dilanjutkan uji Tukey ($p < 0,05$), serta statistik non parametrik Kruskal Wallis Test dilanjutkan Mann Whitney Test ($p < 0,05$) yang dibandingkan terhadap masing-masing kontrol sel limfosit. Identifikasi kandungan senyawa fenolik dan flavonoid dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelopak bunga rosella memiliki aktivitas imunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit yang terlihat pada konsentrasi 50, 100, 200 dan 400 µg/mL untuk ekstrak etanol dan fraksi etil asetat; 200 dan 400 µg/mL untuk fraksi *n*-heksana serta 400 µg/mL untuk fraksi air. Ekstrak etanol dan fraksi dari kelopak bunga rosella memiliki kandungan senyawa terpenoid, fenolik dan flavonoid.

Kata kunci : kelopak bunga rosella, ekstrak etanol, fraksi, MTT Assay, imunostimulator

1. PENDAHULUAN

Kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) secara tradisional dapat digunakan sebagai obat dan dapat dimanfaatkan sebagai produk makanan dan minuman (Ismail *et al.*, 2008). Di Indonesia, pemanfaatan kelopak bunga rosella oleh masyarakat umumnya digunakan dan dipercaya sebagai minuman kesehatan untuk meningkatkan sistem imun tubuh. Mahadevan *et al.* (2009) menyatakan bahwa kelopak bunga rosella mengandung beberapa senyawa terpenoid, fenolik dan flavonoid. Fraksinasi dengan *n*-heksana, etil asetat dan air ditujukan agar dapat menarik secara spesifik senyawa-senyawa tersebut (Seidel, 2006). Senyawa terpenoid, fenolik dan flavonoid merupakan senyawa yang dapat digunakan sebagai imunostimulator, hal tersebut telah dikemukakan oleh Chiang *et al.* (2003).

Penelitian mengenai aktivitas imunomodulator kelopak bunga rosella telah dilakukan oleh Fakeye *et al.* (2008), menggunakan metode *Haemagglutination test* secara *in vivo*. Fakeye *et al.*, juga melakukan pengukuran terhadap konsentrasi *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) sebagai sitokin pro inflamasi dan Interleukin-10 (IL-10) sebagai sitokin anti inflamasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelopak bunga rosella mampu meningkatkan sistem imun. Hal itu terjadi akibat adanya peningkatan produksi IL-10 sehingga mampu menekan produksi TNF- α dan berpengaruh terhadap sel limfosit B untuk menghasilkan antibodi.

Penelitian ini berbeda dengan yang dilakukan oleh Fakeye *et al.* (2008) yaitu untuk mengetahui mekanisme aksi aktivitas imunostimulator ekstrak etanol dan fraksi kelopak bunga

rosella terhadap proliferasi sel limfosit secara keseluruhan dengan metode *MTT Assay*, sehingga dapat memberikan tambahan bukti secara ilmiah mengenai manfaat tumbuhan rosella terhadap sistem imun.

2. METODE PENELITIAN

A. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan Penelitian : simplisia kelopak bunga rosella kering ($B_2P_2TO_2T$), etanol 96%, *n*-heksana, etil asetat, air (Brataco), *Silica gel* 60 F₂₅₄, toluene, metanol, asam formiat, butanol, asam asetat, vanillin asam sulfat, ferri chloride, uap amoniak, terpineol, asam galat (Merck), kuersetin (Sigma), organ limpa dari mencit jantan galur swiss berumur 2 bulan, etanol 70% (Merck), Medium *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco), RPMI 1640 media komplit berisi *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% (v/v) (Caisson), *Phosfat Buffer Saline* (PBS) (Gibco), vaksin hepatitis B (Engerix), *Phytohemagglutinin-P* (PHA-P, Sigma), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma), stopper 10% *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) (Merck), HCl (Merck) 0.01 N, penicillin-streptomycin (Gibco), fungizon/amphoterasin B (Gibco), tween 80 0,5% (Merck).

Alat Penelitian : seperangkat alat maserasi (Pyrex), blender (Maspion), timbangan elektrik (Ohaus), *moisture balance* 23 (Ohaus), *vacuum rotary evaporator* (Heidolph WE 2000), bejana KLT (Camag), kertas penjunuh, pipa kapiler, alat penampak bercak, lampu UV 254 nm dan 366 nm, timbangan elektrik (Mettler Toledo), alat-alat bedah steril (Smicss), tabung mikropipet (Gibco), *ependorf tube* (Extragen), sentrifugasi (Sorvall), pipet pastur (Brand), petri dish steril 50 mm (Costar), spuit injeksi 10 mL (Terumo), tabung sentrifugasi 15 mL (Nunc), *vortex* (Bio-Rad), *laminar air flow* (Nuair), *hemocytometer* (Neubauer), *inverted microscope* (Olympus), inkubator CO₂ 5% (Heraeus), mikroplate 96 (Costar), *microplate reader* (Bio-Rad), mikropipet (Gibson) *ependorf tube* (Extragen), *vortex* (Brandstead), *laminar air flow* (Nuair), *white tip*, *yellow tip*, *blue tip* (Brand).

B. Jalannya Penelitian

Jalannya penelitian ini, meliputi :

1. Identifikasi Kelopak Bunga Rosella

Identifikasi kelopak bunga rosella dilakukan untuk mengetahui identitas dari simplisia yang akan digunakan sebelum penelitian berlangsung. Identifikasi simplisia dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Obat dan Obat Tradisional ($B_2P_2TO_2T$), Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pembuatan Serbuk Simplisia Kelopak Bunga Rosella

Kelopak bunga rosella kering diukur kadar airnya dengan *moisture balance*, kemudian sebanyak 1 kg simplisia diserbukkan sampai halus dengan blender atau alat penyerbuk, kemudian diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh.

3. Ekstraksi Kelopak Bunga Rosella

Serbuk simplisia sebanyak 502 gram diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan 4,5 L cairan penyari etanol 96% yang dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama 3,375 L etanol digunakan untuk maserasi awal dibiarkan selama tiga hari dalam bejana tertutup dengan pengadukan sehari minimal 2 kali dan kemudian disaring sehingga didapat filtrat I. Setelah tiga hari ampas diperas, ampas ditambah etanol sebanyak 1,125 L, diaduk dan dibiarkan dalam bejana tertutup selama dua hari. Ampas dan endapan dipisah dari filtratnya dengan kertas saring, filtrat I dan II dicampur dan dienaptuangkan selama dua hari untuk selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental kemudian dihitung rendemennya dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat simplisia}} \times 100 \%$$

4. Fraksinasi *n*-heksana, Etil Asetat dan Air Kelopak Bunga Rosella

Ekstrak kental kelopak bunga rosella sebanyak 40,13 gram dilarutkan ke dalam air:etanol (9:1) sebanyak 150 mL. Selanjutnya dipartisi secara bertingkat dengan menggunakan corong pisah menggunakan pelarut *n*-heksana dilanjutkan etil asetat.

Jumlah pelarut yang digunakan untuk fraksinasi sebanding dengan jumlah air yang ditambahkan ke dalam ekstrak etanol (perbandingan 1:1). Proses fraksinasi berakhir pada saat pelarut *n*-heksana dan etil asetat yang masing-masing berada pada lapisan atas berubah menjadi jernih. Fraksi *n*-heksana etil asetat dan sisa fraksinasi (fraksi air) yang diperoleh kemudian ditampung dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu tidak lebih dari 50°C. Kemudian ekstrak etanol fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air kental kelopak bunga rosella yang diperoleh siap untuk diuji aktivitas imunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit.

5. Uji Aktivitas Imunostimulator

Uji aktivitas imunostimulator, meliputi :

a. Preparasi Sampel Uji Fraksi Etil Asetat

Sampel uji ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana fraksi etil asetat dan fraksi air kelopak bunga rosella dibuat larutan stok dengan konsentrasi 5 mg/mL dengan pelarut 0,5% tween 80 dan RPMI. Kemudian dibuat pengenceran dengan empat seri konsentrasi yaitu 10, 20, 50, 100, 200 dan 400 µg/mL.

b. Preparasi Kontrol Positif PHA

Larutan stok PHA dengan konsentrasi 1 mg/mL digunakan sebagai kontrol positif, kemudian dibuat sampel uji dengan konsentrasi 10 µg/mL dalam *phosphat buffer saline*.

c. Isolasi dan Kultur Sel Limfosit

Jaringan limpa diisolasi secara aseptis dari mencit galur swiss dan diletakkan dalam petri dish berdiameter 50 mm yang berisi 10 mL medium RPMI. Media RPMI dipompakan ke dalamnya sehingga limfosit ikut keluar bersama media. Suspensi sel dimasukkan dalam tabung sentrifugasi 10 mL dan disentrifus pada 3000 rpm 4°C selama 5 menit. Pellet yang didapat disuspensikan dalam 5 mL buffer tris ammonium klorida untuk melisiskan eritrosit. Sel dicampur hingga homogen dan didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit atau sampai warnanya berubah menjadi agak kekuningan. Kemudian tambahkan RPMI ad 10 mL, disentrifugasi pada 3000 rpm 4°C selama 5 menit, supernatan dibuang. Pelet yang didapat dicuci 2 kali dengan RPMI. Sel dihitung dengan hemositometer. Selanjutnya sel limfosit siap untuk dikultur (Hay and Westwood, 2002).

d. Uji Proliferasi Sel Limfosit dengan Metode MTT Assay

Sel limfosit ($1,5 \times 10^6$ sel/mL) sebanyak 100 µL didistribusikan ke dalam sumuran mikroplate 96-wells dan ditambahkan vaksin hepatitis B sebanyak 10 µL tiap sumuran, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37°C, setelah inkubasi 24 jam ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat serta fraksi air kelopak bunga rosella masing-masing konsentrasi 10, 20, 50, 100, 200, 400 µg/mL dan PHA sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 10 µg/mL ditambahkan sebanyak 100 µL. Semua perlakuan tersebut diinkubasi lagi selama 48 jam. Setelah inkubasi 48 jam, masing-masing sumuran ditambahkan larutan 10 µL MTT 5 mg/mL. Kemudian diinkubasi lagi 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambah reagen stopper yaitu larutan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 10% dalam asam klorida 0,01N sebanyak 100 µL pada tiap sumuran dan didiamkan sampai 24 jam. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan mikroplat *reader* pada panjang gelombang 550 nm (Hay and Westwood, 2002).

6. Identifikasi Kandungan Kimia dengan KLT

Identifikasi kandungan kimia menggunakan KLT dilakukan dengan cara menjenuhkan bejana kromatografi terlebih dahulu dengan fase gerak. Sampel uji dan baku pembanding ditotolkan pada lempeng KLT dengan jarak 1 cm dari dasar lempeng, kemudian dielusi dengan fase gerak sampai batas atas pengembangan, diambil, dikeringkan, diamati baik secara visibel maupun pada sinar UV 254 nm, 365 nm dan 366 nm. Selanjutnya dideteksi dengan penampak bercak dan dihitung masing-masing harga *R_f*-nya.

C. Analisis hasil

Analisis hasil penelitian, meliputi :

1. Uji Aktivitas Imunostimulator

Data yang didapat dari hasil pembacaan ELISA *reader* berupa absorbansi atau *Optical Density* (OD). Nilai OD yang terbaca bersifat proposional terhadap jumlah sel yang hidup. Data OD setelah pemberian sampel uji dianalisis menggunakan program SPSS 17 for windows menggunakan perhitungan statistik parametrik uji *Oneway Anova* dilanjutkan uji *Tukey*, serta statistik non parametrik *Kruskal Wallis Test* dilanjutkan *Mann Whitney Test*.

2. Identifikasi Kandungan Kimia

Analisis hasil identifikasi golongan senyawa aktif dari sampel uji dilakukan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terhadap senyawa terpenoid, fenolik dan flavonoid. Identifikasi dilakukan dengan cara membandingkan warna bercak yang ditimbulkan setelah elusi dengan yang terdapat pada literatur dan dibandingkan bercak senyawa uji dengan bercak senyawa standar. Pengamatan lempeng KLT dilakukan di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dan pereaksi semprot, kemudian masing-masing bercak dihitung harga R_f -nya.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Identifikasi Tumbuhan dan Pembuatan Sampel Uji

Berdasarkan surat keterangan hasil determinasi dari B₂P₂TO₂T membuktikan bahwa tumbuhan yang digunakan adalah rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Hasil masing-masing fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air yang diperoleh setelah proses penguapan secara berurutan adalah 5,14; 13,68 dan 12,08 gram dari ekstrak kental sebesar 40,13 gram.

B. Uji Aktivitas Imunostimulator Terhadap Proliferasi Sel Limfosit

Uji aktivitas imunostimulator dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui respon imun fraksi uji terhadap proliferasi sel limfosit mencit galur swiss. Aktivitas proliferasi sel limfosit diuji dengan menggunakan metode *MTT Assay*, dimana garam tertrazolium MTT yang berwarna kuning akan direduksi oleh enzim suksinat dehidrogenase dalam mitokondria sel limfosit yang hidup, menjadi kristal formazan berwarna ungu. Intensitas warna kristal formazan yang terbaca pada ELISA *reader* setara dengan jumlah sel limfosit yang mengalami proliferasi, sehingga pengukuran aktivitas proliferasi sel limfosit dapat diketahui dari nilai *Optical Density* (OD). Semakin besar nilai OD, maka semakin besar pula aktivitas proliferasi sel limfosit tersebut. Hasil pembacaan OD pada ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm terhadap proliferasi sel limfosit dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai OD hasil pembacaan ELISA *reader* pada panjang gelombang 550 nm terhadap proliferasi sel limfosit mencit galur swiss

Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella								
Replikasi	OD							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	0,332	0,323	0,371	0,354	0,338	0,392	0,459	0,564
2	0,323	0,332	0,328	0,339	0,349	0,366	0,423	0,529
3	0,276	0,314	0,319	0,330	0,348	0,329	0,420	0,524
4	0,284	0,337	0,311	0,345	0,373	0,356	0,441	0,548
Rata-rata	0,304	0,326	0,332	0,342	0,352*	0,366*	0,436*	0,541*
SD	0,028	0,010	0,027	0,010	0,015	0,026	0,018	0,018
Fraksi <i>n</i> -heksana Kelopak Bunga Rosella								
1	0,357	0,372	0,391	0,389	0,387	0,388	0,485	0,551
2	0,320	0,313	0,330	0,340	0,347	0,351	0,407	0,536
3	0,300	0,334	0,335	0,339	0,333	0,353	0,536	0,492
4	0,321	0,334	0,340	0,341	0,366	0,358	0,468	0,531
Rata-rata	0,324	0,338	0,349	0,353	0,358	0,362	0,474*	0,527*
SD	0,023	0,034	0,028	0,024	0,023	0,053	0,053	0,025

Fraksi Etil Asetat Kelopak Bunga Rosella								
1	0,357	0,383	0,374	0,386	0,412	0,600	0,585	0,637
2	0,313	0,330	0,369	0,346	0,367	0,403	0,591	0,826
3	0,313	0,327	0,319	0,335	0,443	0,398	0,425	0,778
4	0,310	0,321	0,333	0,339	0,369	0,401	0,554	0,768
Rata-rata	0,324	0,340	0,349	0,351	0,398*	0,450*	0,539*	0,725*
SD	0,022	0,029	0,027	0,023	0,037	0,100	0,077	0,040
Fraksi Air Kelopak Bunga Rosella								
1	0,394	0,423	0,415	0,474	0,489	0,367	0,429	0,559
2	0,326	0,351	0,351	0,407	0,419	0,338	0,395	0,512
3	0,310	0,334	0,405	0,379	0,415	0,337	0,383	0,544
4	0,352	0,356	0,360	0,417	0,348	0,359	0,407	0,529
Rata-rata	0,345	0,366	0,383	0,419	0,418	0,350	0,403	0,536*
SD	0,037	0,039	0,032	0,040	0,058	0,015	0,020	0,020

Keterangan:

Kelompok kontrol sel limfosit: sel limfosit dengan vaksin (A), Kelompok kontrol positif: phytohemagglutinin konsentrasi 10 µg/mL (B), Kelompok sampel uji konsentrasi 10 µg/mL (C), Kelompok sampel uji konsentrasi 20 µg/mL (D), Kelompok sampel uji konsentrasi 50 µg/mL (E), Kelompok sampel uji konsentrasi 100 µg/mL (F), Kelompok sampel uji konsentrasi 200 µg/mL (G), Kelompok sampel uji konsentrasi 400 µg/mL (H).

* = berbeda bermakna dengan kontrol sel limfosit, $p < 0,05$ (sampel uji ekstrak etanol dan fraksi air kelopak bunga rosella menggunakan perhitungan statistik parametrik uji *Oneway Anova* dilanjutkan uji *Tukey*, sedangkan fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat menggunakan perhitungan statistik non parametrik *Kruskal Wallis Test* dilanjutkan *Mann Whitney Test*).

Berdasarkan data nilai OD pada Tabel 1. menunjukkan bahwa pada pemberian seluruh sampel uji memberikan hasil peningkatan aktivitas proliferasi sel limfosit jika dibandingkan dengan kelompok kontrol sel limfosit yang berbeda bermakna ($p < 0,05$). Perbedaan bermakna proliferasi sel limfosit yang menandai adanya aktivitas imunostimulator pada sampel uji ekstrak etanol dan fraksi etil asetat pada konsentrasi 50; 100; 200 serta 400 µg/mL, sampel uji fraksi *n*-heksana pada konsentrasi 200 dan 400 µg/mL, sedangkan sampel uji fraksi air pada konsentrasi 400 µg/mL.

Mekanisme terjadinya proliferasi sel limfosit secara umum, yaitu ketika suatu antigen berikatan dengan permukaan sel T dan sel B, bersama dengan interleukin-1 (IL-1) dari *Antigen Presenting Cell* (APC) dapat mengaktifasi G-protein yang kemudian memproduksi fosfolipase C. Enzim ini menghidrolisis fosfatidil inositol bifosfat (PIP₂) menjadi diasil gliserol (DAG) dan inositol trifosfat (IP₃). Reaksi tersebut berlangsung dalam membran plasma. DAG mengaktifasi secara langsung protein kinase C dengan cara memfosforilasi residu asam amino (serin atau treonin) pada sel target. IP₃ kemudian menstimulasi pelepasan Ca²⁺ ke dalam sitoplasma sehingga konsentrasi Ca²⁺ meningkat. Peningkatan Ca²⁺ ini berperan penting dalam menstimulasi kerja enzim protein kinase C dan 5-lipoxygenase. Protein kinase C menstimulasi produksi interleukin-2 (IL-2), IL-2 ini kemudian mengaktifasi proliferasi sel limfosit (Roitt, 1997).

C. Identifikasi Kandungan Kimia

Identifikasi kandungan kimia kelopak bunga rosella menggunakan kromatografi lapis tipis secara langsung ditujukan kepada senyawa terpenoid, fenolik dan flavonoid. Hasil identifikasi kandungan kimia kelopak bunga rosella dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil identifikasi kandungan kimia kelopak bunga rosella

Sampel Uji	Terpenoid	Fenolik	Flavonoid
Ekstrak etanol	+	+	+
Fraksi <i>n</i> -heksana	+	-	-
Fraksi Etil Asetat	-	+	+
Fraksi Air	-	+	+

4. PENUTUP**A. Kesimpulan**

1. Kelopak bunga rosella memiliki aktivitas imunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit mencit galur swiss secara *in vitro* yang terlihat pada konsentrasi 50, 100, 200

dan 400 µg/mL untuk ekstrak etanol dan fraksi etil asetat; 200 dan 400 µg/mL untuk fraksi *n*-heksana serta 400 µg/mL untuk fraksi air.

2. Ekstrak etanol dan fraksi dari kelopak bunga rosella memiliki kandungan senyawa terpenoid, fenolik dan flavonoid.

B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air kelopak bunga rosella diatas konsentrasi 400 µg/mL agar didapatkan konsentrasi optimal dalam memberikan aktivitas imunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit.
2. Perlu dilakukan penelitian uji aktivitas imunostimulator ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air kelopak bunga rosella terhadap kapasitas fagositosis makrofag, agar dapat diketahui keefektifan dari senyawa uji terhadap respon imun non spesifik.
3. Perlu dilakukan isolasi dan pengujian lanjutan terhadap senyawa terpenoid, fenolik dan flavonoid, untuk membuktikan apakah ketiga senyawa tersebut benar-benar bertanggung jawab terhadap peningkatan aktivitas imunostimulator terhadap proliferasi sel limfosit.

DAFTAR PUSTAKA

- Chiang, L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., and Lin, C.C, (2003), Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *plantago species*, *Planta Medica*, 69, 600-604.
- Fakeye, T.O., Pal, A., Bawankule, D.U., and Khanuja, S.P.S, (2008), Immunomodulatory Effect of Extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (Family Malvaceae) in a Mouse Model, *Phytother. Res.* 22, 664-668.
- Hay, F.C, and Westwood, O.M.R., (2002), *Practical Immunology*, Fourth Edition, 185, 309, Blackwell Publishing Company, United Kingdom.
- Mahadevan, N., Shivali, and Kamboj, P., (2009), *Hibiscus sabdariffa* Linn.- An Overview, *Review Paper Natural Product Radiance*, 8(1), 77-78.
- Roitt, I.M., 1997, *Roitt's Essential Immunology*, Ninth Edition, 169, University Collage London Medical School, London.