

THE EFFECT OF FRACTION CONTAINING ALKALOIDS OF HIBISCUS FLOWER (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) RED VARIETY TO MUCOLYTIC ACTIVITIES *IN VITRO*

EFEK PEMBERIAN FRAKSI YANG MENGANDUNG ALKALOID DARI BUNGA KEMBANG SEPATU (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) VARIETAS MERAH TUNDUK TERHADAP AKTIVITAS MUKOLITIK SECARA *IN VITRO*

Ami Afiyati, Mimiiek Murrulkimihadi*

Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta Indonesia

ABSTRACT

Hibiscus flower (Hibiscus rosa-sinensis L.) is efficacious in cough remedies. This flower has many variations, one of which is a red flower with a crown subject. Ethanolic extract of the hibiscus flower has been studied and shown to have mucolytic activity. Fractionation will be closer in the process of finding active compounds. This study aimed to determine the effect of fractions containing alkaloids of red hibiscus flower varieties subject as mucolytics in vitro and determine the range of concentrations of the fractions equivalent to acetylcysteine effect of 0,1 %. This study included maceration, fractionation by VLC, the identification of fractions containing alkaloids, and mucolytic activity test fractions containing alkaloids. Mucolytic activity assay performed in vitro to decrease the viscosity of mucus cow. Test solutions were made with concentrations of fractions 0,4; 0,6; and 0,8 %. Acetylcysteine 0,1 % was used as a positive control. Viscosity values were analyzed statistically using one-way ANOVA test, followed by the LSD test level of 95 % to determine differences between treatment groups. The results showed that the fraction containing alkaloids of hibiscus flower with a concentration of 0,4 % has not shown mucolytic activity, whereas at a concentration of 0,6 % and 0,8 % has been demonstrated in vitro mucolytic activity. Fractions containing alkaloids of hibiscus flower with a concentration of 0,6 % and 0,8 % have mucolytic activity equivalent to 0,1 % acetylcysteine in vitro.

Keywords : Hibiscus rosa-sinensis L., fractions, alkaloids, mucolytics

ABSTRAK

Bunga kembang sepatu (Hibiscus rosa-sinensis L.) berkhasiat sebagai obat batuk. Bunga ini memiliki banyak variasi, salah satunya yaitu bunga berwarna merah dengan bentuk mahkota tunduk. Ekstrak etanolik bunga kembang sepatu tersebut telah diteliti dan terbukti memiliki aktivitas mukolitik. Fraksinasi akan lebih mendekati dalam proses pencarian senyawa aktif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek fraksi yang mengandung alkaloid dari bunga kembang sepatu varietas merah tunduk sebagai mukolitik secara in vitro dan mengetahui kisaran konsentrasi fraksi yang memberikan efek setara dengan efek asetilsistein 0,1%. Penelitian ini meliputi maserasi, fraksinasi dengan KCV, identifikasi fraksi yang mengandung alkaloid, dan uji aktivitas mukolitik fraksi yang mengandung alkaloid. Uji aktivitas mukolitik dilakukan secara in vitro terhadap penurunan viskositas mukus sapi. Larutan uji dibuat dengan konsentrasi fraksi 0,4; 0,6; dan 0,8%. Asetilsistein 0,1% digunakan sebagai kontrol positif. Nilai viskositas yang diperoleh dianalisis statistik menggunakan uji ANAVA satu arah, dilanjutkan uji LSD dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi yang mengandung alkaloid dari bunga kembang sepatu dengan konsentrasi 0,4% belum menunjukkan aktivitas mukolitik, sedangkan pada konsentrasi 0,6% dan 0,8% telah menunjukkan aktivitas mukolitik secara in vitro. Fraksi yang mengandung alkaloid dari bunga kembang sepatu dengan konsentrasi 0,6% dan 0,8% memiliki aktivitas mukolitik setara dengan asetilsistein 0,1% secara in vitro.

Kata kunci: Hibiscus rosa-sinensis L., fraksi, alkaloid, mukolitik.

Corresponding author : Mimiiek Murrulkimihadi
E-mail: mimiiekmurrulkimihadi@gmail.com

PENDAHULUAN

Kehidupan manusia sekarang cenderung menerapkan gaya hidup *back to nature* atau kembali ke alam, termasuk dalam hal pemilihan obat. Pengobatan menggunakan obat yang berasal dari bahan alam pun lebih banyak disukai. Negara Indonesia merupakan negara *megabiodiversity*, di mana terdapat beraneka ragam jenis tanaman yang dapat dimanfaatkan, salah satunya sebagai obat. Masyarakat Indonesia sendiri sudah sejak zaman dahulu mengenal dan memanfaatkan tanaman untuk tujuan pengobatan. Seiring dengan perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan, sudah banyak penelitian secara ilmiah mengenai khasiat tanaman obat. Di antara berbagai macam tanaman, kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) merupakan salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai obat. Tanaman ini dapat ditemukan di berbagai daerah. Salah satu daerah yang banyak dijumpai bunga kembang sepatu adalah daerah Wates, Yogyakarta dengan variasi mahkota merah tunduk. Bunga kembang sepatu merupakan tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat demam pada anak-anak, obat batuk, dan obat sariawan (Syamsuhidayat dan Hutapea, 2000) dan bagian bunga berkhasiat untuk mengobati berbagai penyakit seperti pelembut kulit, peluruh dahak, dan penurun panas (Anonim, 1985).

Penelitian sebelumnya telah dilakukan uji aktivitas mukolitik ekstrak etanolik bunga kembang sepatu varietas merah tunduk (Zuhri, 2009) dan disimpulkan bahwa ekstrak etanolik bunga kembang sepatu varietas merah tunduk pada konsentrasi 1,25% memiliki aktivitas mukolitik. Penelitian lebih lanjut masih dibutuhkan untuk mencari senyawa aktif yang bertanggung jawab memberikan efek farmakologi. Salah satu metode yang dapat digunakan yaitu fraksinasi. Oleh karena itu peneliti berinisiatif untuk melakukan fraksinasi ekstrak etanolik bunga kembang sepatu menggunakan Kromatografi Cair Vakum dan menguji aktivitasnya sebagai mukolitik. Aktivitas mukolitik dapat diuji dengan metode sederhana yaitu secara *in vitro* berdasarkan penurunan viskositas mukus usus sapi menggunakan viskometer Ostwald (Anonim, 1991).

METODOLOGI

Bahan dan alat

Alat yang digunakan adalah oven (Memmert), blender (Cosmos), corong Buchner (Pyrex®), plat silika gel 60 F254 (Merck®). Methanol (1:5) v/v derajat analisis, etil asetat : asam format : asam asetat glasial : air (100 : 11 :

11 : 27) v/v, Asam siliko wolframat, Hager, Wagner, Dragendorff dan AlCl₃.

Jalan Penelitian

Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menyari simplisia menggunakan metode maserasi. Cairan penyari yang digunakan adalah etanol 70%. Perbandingan antara serbuk simplisia dengan cairan yang digunakan adalah 1:10 (Voigt, 1984) yang berarti setiap 1 gram serbuk digunakan cairan penyari sebesar 10 mL. Sebelumnya, dilakukan maserasi menggunakan petroleum eter terlebih dahulu untuk menghilangkan senyawa zat-zat *ballast* yang tidak diinginkan seperti klorofil, lemak dan resin yang terkandung dalam simplisia. Serbuk simplisia sebanyak 290 gram dimasukkan ke dalam toples kaca dan kemudian ditambahkan petroleum eter sebanyak 2.175 mL (75% cairan penyari) dan diaduk. Maserasi dilakukan selama 5 hari. Pengadukan dilakukan setiap hari secara berkala untuk mengurangi terjadinya keseimbangan konsentrasi cairan di luar dan di dalam sel. Setelah 5 hari, maserat disaring menggunakan kain saring melalui corong buchner yang menggunakan pompa vakum sehingga penyaringan dapat berlangsung lebih cepat. Filtrat yang diperoleh disisihkan, sedangkan ampas diremaserasi menggunakan 725 mL cairan penyari yang sama (25% volume penyari). Maserat kemudian disaring, filtrat yang diperoleh disisihkan dan ampas dikeringkan. Ampas yang sudah kering kemudian dimaserasi menggunakan cairan penyari kedua yaitu etanol 70% dengan cara penyarian yang sama dengan petroleum eter. Filtrat yang diperoleh diuapkan menggunakan wajan aluminium di atas penangas air selama lebih kurang 2 jam untuk menghilangkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak kental etanolik. Selama proses penguapan dilakukan pengadukan secara berkala untuk meratakan panas dan mempermudah penguapan. Ekstrak etanolik yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya. Ekstrak dimasukkan ke dalam wadah kaca dan ditutup dengan aluminium foil kemudian disimpan di dalam eksikator.

Pembuatan ekstrak tidak larut etil asetat

Ekstrak etanolik yang diperoleh dipartisi dengan akuades dan etil asetat menggunakan corong pisah. Ekstrak kental etanolik dilarutkan dalam akuades dengan perbandingan 1:5, yang berarti setiap 1 gram ekstrak etanolik dilarutkan dalam 5 mL akuades. Sebanyak 43 gram ekstrak kental etanolik dilarutkan dalam 215 mL akuades. Kemudian larutan dimasukkan ke dalam corong pisah dan disari menggunakan etil asetat dengan

volume yang sama. Campuran digojog secukupnya dan kemudian didiamkan agar cairan penyari dan pelarut memisah. Fase air diambil dan disari kembali sampai dengan tiga kali penyarian. Selanjutnya fraksi air diuapkan di atas penangas air sambil diangin-anginkan hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang diambil adalah ekstrak yang tidak larut etil asetat (larut air). Ekstrak yang tidak larut etil asetat kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya.

Fraksinasi

Ekstrak yang tidak larut etil asetat difraksinasi menggunakan alat Kromatografi Cair Vakum (KCV). Fase gerak yang digunakan yaitu campuran etil asetat dan metanol dengan berbagai tingkat kepolaran. Mula-mula dibuat dulu sampel ekstrak. Sebanyak 2,5 gram ekstrak kental ditambah dengan 2 mL metanol dan dicampur homogen. Kemudian ditambahkan silika sebanyak 5 gram sedikit demi sedikit sambil dicampur hingga ekstrak metanol tersalut oleh silika dan dihomogenkan menggunakan mortir dan stamper. Campuran fase gerak divorteks agar homogen.

Kemudian kolom KCV dipersiapkan secara *packing* kering. Vakum harus selalu dinyalakan saat *packing* kolom. Bagian dasar kolom diisi dengan kertas saring, kemudian sebanyak 13 gram silika dimasukkan sedikit demi sedikit dan dipadatkan. Selanjutnya ekstrak yang sudah disalut dengan silika dimasukkan sedikit demi sedikit, dipadatkan, dan diratakan permukaannya kemudian atasnya diberi kapas agar kolom *packing* tidak rusak sewaktu penambahan fase gerak. Setelah kolom KCV siap, fase gerak pertama pada tabel I dimasukkan, dan diambil fraksinya. Kemudian dilanjutkan dengan fase gerak berikutnya secara berurutan. Sebelum memasukkan fase gerak berikutnya terlebih dahulu kolom ditunggu hingga benar-benar kering dari fase gerak sebelumnya. Fase gerak yang dialirkan dimulai dari fase gerak yang relatif non polar ke polar dan diperoleh 7 fraksi dari 7 macam fase gerak. Setiap fraksi yang diperoleh dilakukan analisis kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengetahui fraksi yang mengandung alkaloid. Fraksi yang mengandung alkaloid diuapkan menggunakan cawan porselen di atas penangas air. Selanjutnya ditimbang dan dihitung rendemennya.

Kontrol kualitas ekstrak etanolik bunga kembang sepatu

Pemeriksaan organoleptis

Pemeriksaan organoleptis terhadap ekstrak kental bunga kembang sepatu meliputi uji warna, bau, rasa, dan konsistensi ekstrak.

Susut pengeringan

Sebanyak 1 gram ekstrak kental ditimbang seksama dalam botol timbang yang telah memenuhi bobot (dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit). Ekstrak diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol hingga tebal lapisannya lebih kurang 5-10 mm. Botol yang telah berisi ekstrak dimasukkan dalam oven, dibuka tutupnya, dan dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam. Setelah 5 jam ekstrak dikeluarkan dan didinginkan dalam eksikator, kemudian ditimbang kembali. Pengerjaan dilakukan setiap kali dengan lama pemanasan 30 menit sampai tercapai bobot konstan (selisih 2 kali penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%).

Uji Daya Lekat Ekstrak

Sebanyak 0,1 gram ekstrak kental ditimbang dan diletakkan di titik tengah gelas obyek kemudian ditutup dengan gelas obyek yang lain. Selanjutnya gelas obyek tersebut diberi beban seberat satu kilogram selama lima menit. Kedua obyek gelas dipasang pada alat uji dan dipisahkan dengan jalan menarik gelas obyek yang ada di sebelah atas dengan beban seberat 80 gram melewati sebuah sistem katrol, sementara gelas obyek yang ada di bawah ditahan dengan sebuah penjepit. Waktu yang diperlukan untuk memisahkan kedua gelas obyek dicatat sebagai waktu lekat.

Identifikasi kandungan senyawa

Sebanyak 7 macam fraksi yang diperoleh dari hasil KCV diidentifikasi kandungan metabolitnya dengan KLT. Sistem KLT yang digunakan yaitu fase normal dengan fase diam berupa silika gel 60 F254 (Merck®) dan fase gerak berupa etil asetat: metanol (1:5)v/v. Hasil KLT dilakukan identifikasi bercak secara non-destruktif dengan menggunakan lampu UV 254 nm dan UV 366 nm dan destruktif dengan penyemprotan menggunakan pereaksi Dragendorff. Dari hasil identifikasi dapat diketahui fraksi yang mengandung alkaloid. Fraksi 6 dan 7 yang mengandung alkaloid selanjutnya dilakukan uji pengendapan alkaloid untuk memastikan keberadaan alkaloid pada fraksi tersebut. Fraksi 6 dan 7 dilarutkan dengan sedikit asam klorida 2N, dibagi menjadi 4 kemudian masing-masing dipindahkan ke gelas arloji sebanyak 3 tetes dan direaksikan dengan empat golongan larutan uji pengendapan yaitu Asam Siliko Wolframat, Wagner, Dragendorff, dan Hager. Pada gelas arloji diamati terbentuk endapan atau tidak. Fraksi dikatakan positif mengandung alkaloid jika

terbentuk endapan sekurang-kurangnya 2 reaksi dari empat golongan pereaksi pengendapan yang dilakukan. Fraksi 6 dan 7 juga diidentifikasi kandungan flavonoidnya dengan KLT. Fase diam yang digunakan sama dengan fase diam pada identifikasi alkaloid. Fase gerak yang digunakan adalah etil asetat-asam format-asam asetat glasialair (100:11:11:27) v/v. Bercak dideteksi dengan pereaksi semprot $AlCl_3$ kemudian diamati di bawah sinar UV 254 nm dan UV 366 nm.

Uji aktivitas mukolitik secara *in vitro*

Pengumpulan mukus usus sapi

Usus sapi yang diperoleh dibersihkan dari kotoran dan sisa-sisa makanan di bawah air mengalir. Cara mengumpulkan mukus yaitu dengan mengurut usus kemudian usus dipotong membujur. Selanjutnya lapisan mukosa dikerok pelan-pelan jangan sampai mengenai pembuluh darah kapiler dan lemak hingga bersih. Mukus yang telah terkumpul diaduk pelan-pelan sampai homogen. Mukus yang digunakan untuk uji mukolitik harus dalam keadaan masih segar.

Pembuatan larutan dapar fosfat pH 7

Larutan dapar fosfat pH 7 dibuat dengan cara mencampur sebanyak 50,0 mL kalium dihidrogenfosfat 0,2 M dengan 29,1 mL NaOH 0,2 N dan dimasukkan dalam labu takar 200,0 mL. Kemudian pada campuran ditambah air bebas CO_2 sampai batas tanda (Anonim, 1979). Dapar yang telah dibuat kemudian dicek pHnya dengan menggunakan pH meter. Apabila kurang basa dapat ditambah dengan NaOH dan apabila kurang asam ditambah dengan kalium dihidrogenfosfat.

Pembuatan larutan mukus-dapar fosfat 20% b/b

Larutan mukus-dapar fosfat 20% b/b dibuat dengan cara mencampur mukus sebanyak 20 bagian (dalam bobot) dengan dapar-fosfat pH 7 sebanyak 80 bagian (dalam bobot) sehingga total 100 bagian (dalam bobot). Campuran diaduk sampai homogen.

Pembuatan larutan kontrol negatif

Sebagai kontrol negatif digunakan larutan mukus-dapar fosfat 20% b/b tanpa penambahan ekstrak maupun obat standar (asetilsistein). Larutan kontrol negatif dibuat dengan mencampurkan tween 80 sebanyak 0,5% b/b dari bobot total atau sebesar 0,15 gram dengan larutan mukus-dapar fosfat hingga diperoleh bobot total sebesar 30 gram dan diaduk hingga campuran homogen.

Pembuatan larutan kontrol positif

Sebagai kontrol positif digunakan larutan mukus-dapar fosfat yang ditambah asetilsistein 0,1%. Larutan kontrol positif dibuat dengan mencampurkan asetilsistein 0,1% sebanyak 0,03 gram dengan tween 80 sebanyak 0,5% b/b dari bobot total atau sebesar 0,15 gram. Kemudian ditambahkan larutan mukus-dapar fosfat hingga diperoleh bobot total sebesar 30 gram dan diaduk hingga campuran homogen.

Pembuatan larutan uji

Larutan uji yang digunakan adalah fraksi yang mengandung alkaloid bunga kembang sepatu dengan konsentrasi 0,4; 0,6; dan 0,8%. Masing-masing larutan uji dibuat dengan mencampurkan fraksi yang mengandung alkaloid sebanyak konsentrasi masing-masing dengan tween 80 sebanyak 0,5% b/b dari bobot total atau sebesar 0,15 gram. Kemudian ditambahkan larutan mukus-dapar fosfat hingga diperoleh bobot total sebesar 30 gram dan diaduk hingga campuran homogen.

Uji aktivitas mukolitik secara *in vitro*

Uji aktivitas mukolitik dilakukan dengan melakukan pengukuran viskositas menggunakan viskometer Ostwald. Viskometer Ostwald diletakkan di *waterbath* sampai viskometer Ostwald tenggelam di dalam air hingga bagian yang menggelembung di atas batas garis atas viskometer Ostwald. Larutan uji diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 30 menit kemudian diisi larutan uji sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam viskometer Ostwald. Waktu yang diperlukan larutan uji untuk melewati batas garis atas hingga batas garis bawah dicatat. Waktu yang tercatat merupakan waktu alir (dalam detik) dari larutan uji. Selanjutnya dilakukan pengukuran kerapatan menggunakan piknometer. Bobot larutan uji diperoleh dengan mengurangi bobot larutan uji dan piknometer dengan bobot piknometer kosong. Kemudian dihitung viskositasnya dengan mengalikan waktu alir dan kerapatan. Larutan kontrol positif dan kontrol negatif diukur viskositasnya dengan cara yang sama seperti pengukuran pada larutan uji.

Analisis hasil

Data penurunan viskositas mukus diuji dengan ANAVA satu arah dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Selanjutnya untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna dilanjutkan analisis *Post-Hoc* (Dahlan, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Sebanyak 2.862,5 gram bunga segar dihasilkan 290,35 gram serbuk kering. Serbuk kering tersebut kemudian dimaserasi sebanyak 290 gram dengan etanol 70% dan menghasilkan 49,45 gram ekstrak kental, sehingga diperoleh rendemen ekstrak sebesar 17,05% b/b terhadap bobot simplisia kering. Ekstrak kental yang dihasilkan berwarna coklat kemerahan dengan rasa pahit dan bau agak manis.

Ekstrak yang dihasilkan kemudian dilakukan pengujian kontrol kualitas ekstrak. Kontrol kualitas ekstrak yang dilakukan meliputi susut pengeringan dan uji daya lekat ekstrak. Susut pengeringan ekstrak menunjukkan jumlah bagian dari ekstrak kental yang memiliki sifat mudah menguap seperti air, minyak atsiri, alkohol yang masih terkandung dalam ekstrak, dan lain-lain. Apabila di dalam ekstrak tidak mengandung minyak atsiri atau zat mudah menguap lainnya, maka susut pengeringan dapat menggambarkan kadar air dalam ekstrak. Susut pengeringan rata-rata ekstrak kental bunga kembang sepatu sebesar $18,60\% \pm 1,44$. Sedangkan daya lekat rata-rata ekstrak sebesar $31,17 \text{ detik} \pm 2,22$.

Fraksinasi

Ekstrak kental sebanyak 43 gram dari 49,45 gram ekstrak kental yang didapatkan dipartisi dengan etil asetat dan aquades. Partisi bertujuan untuk menghilangkan zat-zat yang tidak diinginkan yang juga terlarut dalam etanol. Fase larut etil asetat dipisahkan dan diambil fase larut air. Fase larut air diuapkan dan diperoleh 25,18 gram fase larut air kental. Selanjutnya fase larut air dari hasil partisi sebanyak 25 gram difraksinasi menggunakan Kromatografi cair vakum (KCV). Fraksinasi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan dalam jumlah besar dan dengan kemurnian yang lebih tinggi, dalam hal ini alkaloid. Alkaloid dapat dipisahkan dengan mudah dan cepat dengan kromatografi cair vakum (Pelletier dkk, 1985). Mekanisme pemisahan yang terjadi dalam KCV berupa adsorpsi dan partisi. Adsorpsi terjadi berdasarkan kemampuan zat terlarut berinteraksi dengan fase diam silika yang bersifat polar. Zat-zat yang bersifat polar akan lebih tertahan pada fase diam karena adanya interaksi antara zat-zat polar tersebut dengan gugus silanol dari silika membentuk ikatan hidrogen. Sedangkan pada mekanisme secara partisi, pemisahan terjadi berdasarkan kemampuan zat terlarut terdistribusi di antara dua fase cair. Zat-zat polar akan terlarut dalam pelarut polar, sedangkan zat-zat nonpolar akan terlarut dalam pelarut nonpolar seperti pada

prinsip *like dissolve like*. Elusi pada kromatografi cair vakum dimulai dari fase gerak yang relatif non polar ke fase gerak yang polar sehingga senyawa-senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang paling rendah akan terelusi terlebih dahulu oleh fase gerak awal. Senyawa dengan kepolaran lebih tinggi akan tertahan pada fase diam dan dengan meningkatnya kepolaran fase gerak, senyawa yang lebih polar akan terelusi dan seterusnya hingga senyawa yang paling polar akan terelusi paling akhir oleh fase gerak terakhir yang tingkat kepolarannya paling tinggi sehingga menghasilkan pemisahan yang cukup efektif. Kelebihan dari metode KCV yaitu proses pemisahan dapat berlangsung dalam waktu yang relatif singkat karena penggunaan vakum. Masing-masing fraksi yang diperoleh diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis untuk dideteksi fraksi yang mengandung alkaloid. Fraksi 6 dan 7 mengandung senyawa alkaloid dan digabung kemudian diuapkan sampai diperoleh fraksi kental (7,05 gram).

Identifikasi Senyawa Aktif

Identifikasi dilakukan terhadap senyawa yang terkandung di dalam kembang sepatu untuk mengetahui keberadaan alkaloid. Karakteristik alami dari alkaloid sering dijadikan sebagai penanda efek farmakologi. Masing-masing fraksi yang diperoleh dari hasil fraksinasi dengan KCV dilakukan pengecekan keberadaan alkaloid. Visualisasi juga dilakukan secara kimia menggunakan pereaksi semprot Dragendorff. Bercak yang mengandung alkaloid akan tampak sebagai bercak yang meredam di bawah sinar UV 254 nm dan akan berfluoresensi biru, biru kehijauan atau ungu di bawah sinar UV 366 nm, serta akan muncul dengan warna jingga hingga coklat segera saat penyemprotan dengan pereaksi Dragendorff dan warna yang dihasilkan stabil (Wagner dan Bladt, 1996). Gambar 1 dapat dilihat bahwa sebelum disemprot dengan pereaksi Dragendorff bercak belum terlihat jelas. Pada pengamatan di bawah sinar UV 254 nm terlihat beberapa bercak yang meredam pada fraksi 1 sampai 7 dengan R_f yang berbeda-beda, dan dengan sinar UV 366 nm juga terdapat beberapa bercak yang berfluoresensi. Setelah dilakukan penyemprotan dengan pereaksi Dragendorff bercak 1 dari fraksi 6 dan bercak 2 dari fraksi 7 menunjukkan warna jingga kecoklatan. Sedangkan pada fraksi 1-5 menunjukkan hasil yang negatif terhadap pereaksi Dragendorff. Pada bercak 1 dan 2 tersebut juga terjadi peredaman di bawah sinar UV 254 nm. Pada sinar UV 366 nm juga terjadi fluoresensi kebiruan pada kedua bercak tersebut, namun tidak terlihat jelas karena terjadi *tailing*

Tabel I. Viskositas Kontrol Negatif, Kontrol Positif, dan Larutan Uji dengan Tiga Variasi Konsentrasi

Replikasi	Kontrol negatif	Kontrol positif	Viskositas (cps)		
			0,4	0,6	0,8
I	1,3590	1,2704	1,3518	1,2971	1,1983
II	1,4700	1,3429	1,3743	1,3518	1,3387
III	1,4945	1,3738	1,4053	1,3505	1,3071
Rata-rata	1,4412	1,3290	1,3771	1,3331	1,2814
SD	0,0722	0,0531	0,0268	0,0312	0,0737

kadar ataupun jenis metabolit sekunder yang dibentuk sehingga efeknya dapat berbeda.

Tabel II. Hasil analisis uji LSD pada tiap kelompok perlakuan

Perlakuan	Probabilitas	Kesimpulan
Kontrol (-)	Kontrol (+)	BB
	Fraksi 0,4%	BTB
	Fraksi 0,6%	BB
	Fraksi 0,8%	BB
Kontrol (+)	Kontrol (-)	BB
	Fraksi 0,4%	BTB
	Fraksi 0,6%	BTB
	Fraksi 0,8%	BTB
Fraksi 0,4%	Kontrol (-)	BTB
	Kontrol (+)	BTB
	Fraksi 0,6%	BTB
	Fraksi 0,8%	BTB
Fraksi 0,6%	Kontrol (-)	BB
	Kontrol (+)	BTB
	Fraksi 0,4%	BTB
	Fraksi 0,8%	BTB
Fraksi 0,8%	Kontrol (-)	BB
	Kontrol (+)	BTB
	Fraksi 0,4%	BTB
	Fraksi 0,6%	BTB

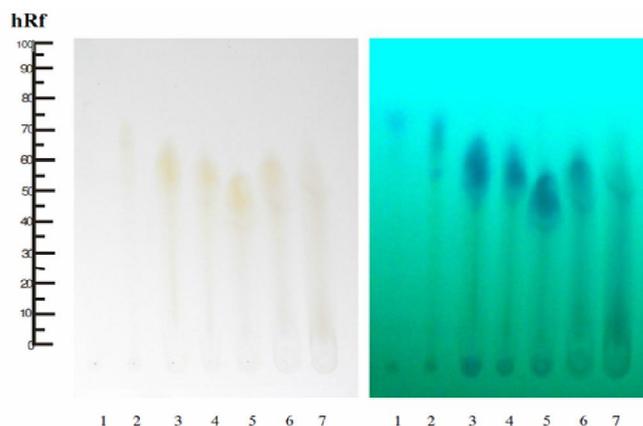
Keterangan : BB =Berbeda bermakna; BTB =Berbeda tidak bermakna

pada hasil elusi. Terjadinya *tailing* disebabkan antara lain karena sampel yang ditotolkan terlalu banyak dan terlalu pekat. Dari hasil kromatogram tersebut menunjukkan bercak yang positif terhadap Dragendorff yaitu bercak 1 dengan R_f sebesar 20 dan bercak 2 dengan R_f sebesar 22. Kedua bercak tersebut diduga mengandung alkaloid. Pereaksi semprot Dragendorff juga dapat bereaksi dengan beberapa senyawa non-alkaloid seperti iridoid dan beberapa flavonoid sehingga dapat menghasilkan reaksi positif palsu (Cannell, 1998). Namun kepekaan terhadap alkaloid lebih tinggi, yaitu sekitar sepuluh kalinya (Robinson, 1995). Uji yang dapat dilakukan untuk memastikan kandungan alkaloid pada fraksi 6 dan 7 tersebut yaitu uji pengendapan. Alkaloid dapat mengendap dalam larutan netral atau sedikit asam oleh pereaksi Mayer (kalium tetraiodomerkurat), Wagner (iodium dalam kalium iodida), asam silikotungstat 5%, asam tannat 5%, Hager (larutan

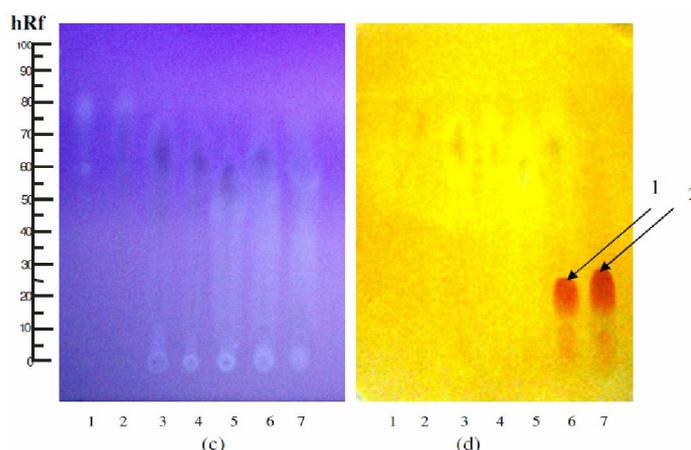
asam pikrat jenuh), iodoplatinat, dan pereaksi Dragendorff (Kalium tetraiodobismutat) (Robinson, 1995). Hasil uji pengendapan alkaloid ditunjukkan pada Gambar 2 yaitu fraksi 6 dan 7 bereaksi positif terhadap pereaksi Asam siliko wolframat dan Dragendorff; sedangkan dengan pereaksi Hager dan Wagner menunjukkan hasil yang negatif. Adanya kandungan alkaloid ditunjukkan jika sekurang kurangnya menggunakan dua golongan larutan percobaan (Anonim, 1977). Dengan demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa fraksi 6 dan 7 dari bunga kembang sepatu tersebut mengandung senyawa golongan alkaloid.

Aktivitas Mukolitik Secara In Vitro (viskositas)

Aktivitas mukolitik secara in vitro dilihat dari viskositas. Hasilnya dapat dilihat dalam Tabel I. Setelah diuji secara statistik, hasilnya dapat dilihat dalam Tabel II.



Gambar 1. Kromatografi Lapis Tipis fraksi (a) dan (b)



Gambar 2. Kromatografi Lapis Tipis fraksi (c) dan (d)

Dalam Tabel II dapat dilihat bahwa fraksi dengan konsentrasi 0,4% tidak memberikan penurunan viskositas yang bermakna ($p > 0,05$) terhadap kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi yang mengandung alkaloid dengan konsentrasi 0,4% belum memiliki aktivitas mukolitik, sedangkan fraksi dengan konsentrasi 0,6% dan 0,8% menunjukkan adanya aktivitas mukolitik yaitu menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan viskositas kontrol negatif ($p < 0,05$).

Fraksi dengan konsentrasi 0,6% dan 0,8% yang memiliki aktivitas mukolitik tersebut selanjutnya dibandingkan dengan kontrol positif untuk mengetahui konsentrasi fraksi yang aktivitas mukoliktinya setara dengan asetilsistein 0,1%. Hasilnya adalah fraksi dengan konsentrasi 0,6% dan 0,8% tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) terhadap kontrol positif (asetilsistein 0,1%). Dari hasil dapat disimpulkan bahwa fraksi yang mengandung alkaloid bunga kembang sepatu varietas merah tunduk pada

konsentrasi 0,6% dan 0,8% memiliki aktivitas mukolitik yang setara dengan asetilsistein 0,1%.

Sebelum dilakukan fraksinasi, ekstrak etanolik bunga kembang sepatu varietas merah tunduk memiliki aktivitas mukolitik pada konsentrasi 1,25% (Zuhri, 2009).

Dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, fraksi yang mengandung alkaloid bunga kembang sepatu warna merah muda dalam penelitian Rakhmawati (2010) dan fraksi yang mengandung alkaloid bunga kembang sepatu merah mahkota tegak dalam penelitian Suharyana (2010) memiliki aktivitas mukolitik yang setara dengan asetilsistein 0,1% pada konsentrasi 0,8%. Varietas bunga kembang sepatu diperkirakan mempengaruhi kadar ataupun jenis metabolit sekunder yang dibentuk sehingga efeknya dapat berbeda.

KESIMPULAN

Fraksi yang mengandung alkaloid dari bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.)

varietas merah tunduk pada konsentrasi 0,4% belum menunjukkan adanya aktivitas mukolitik, sedangkan pada konsentrasi 0,6% dan 0,8% telah menunjukkan adanya aktivitas mukolitik. Fraksi yang mengandung alkaloid dari bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) varietas merah tunduk pada konsentrasi 0,6% dan 0,8% memiliki aktivitas mukolitik yang setara dengan asetilsistein 0,1%

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1977, *Materia Medika Indonesia*, Jilid I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim, 1979, *Farmakope Indonesia*, Edisi III, 755, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim, 1985, *Tanaman Obat Indonesia*, Jilid I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim, 1991, *Penapisan Farmakologi, Pengujian Fitokimia dan Pengujian Klinik*, 69-71, Kelompok Kerja Ilmiah Yayasan Pengembangan Obat Bahan Alam Phyto Medica, Jakarta.
- Cannell, R.J.P., 1998, *Natural Product Isolation*, 1-53, 111-141, 264-265, 356, 379-381, Humana Press, New Jersey.
- Dahlan, M.S., 2009, *Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan*, Edisi Keempat, 68, 73, 85, 88, Salemba Medika, Jakarta.
- Rakhmawati, M., 2010, *Pengaruh Pemberian Fraksi yang Mengandung Alkaloid Bunga Kembang Sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) warna merah muda terhadap Aktivitas Mukolitik Mukus Usus Sapi secara *In Vitro* dengan Viskometer Ostwald*, skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Edisi Keenam, 285, 291, Penerbit ITB, Bandung.
- Steenis, C.G.G.J.V., Hoed, D.D., Bloembergen, S., & Eyma, P.J., 1975, *Flora untuk Sekolah di Indonesia*, diterjemahkan oleh Moeso Surjowinoto, Soenarto Hardjosuwarno, Soerjo Sodo Adisewojo, Wibisono, Margono Partodidjojo, Soemantri Wirjahardja, Cetakan Ketujuh, 35-37, 48-55, 276, 277, 280, PT Pradnya Pramita, Jakarta.
- Suharyana, P.A., 2010, *Aktivitas Mukolitik Fraksi yang Mengandung Senyawa Penanda dari Bunga Kembang Sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) warna merah pada Mukus Usus Sapi secara *In Vitro* dengan Viskometer Ostwald*, skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Voigt, R., 1984, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Edisi Kelima, diterjemahkan oleh Soendani Noerono, Cetakan Pertama, 81-89, 393, 566, 579-580, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Syamsuhidayat, S.S., dan Hutapea, J., 2000, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Jilid I, 131-132, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.