

UJI SITOTOKSISITAS FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL HERBA ALFALFA (*Medicago sativa* L.) TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D DAN SEL KANKER LEHER RAHIM (SEL HeLa) SERTA UJI KANDUNGAN SENYAWA KIMIANYA

Devi Nisa Hidayati, Ibrahim Arifin, Sri Susilowati
Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

ABSTRAK

Kanker payudara dan kanker leher rahim merupakan jenis penyakit ganas di Indonesia maupun dunia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi sitotoksik fraksi etil asetat dari ekstrak etanol herba alfalfa terhadap sel kanker payudara (sel T47D) dan sel kanker leher rahim (sel HeLa) serta mengetahui kandungan kimianya.

Proses ekstraksi herba alfalfa dilakukan dengan metode sokletasi menggunakan pelarut etanol kemudian dilanjutkan fraksinasi secara bertingkat menggunakan *n*-heksan, kloroform, dietil eter dan etil asetat. Uji sitotoksitas menggunakan metode MTT dengan seri konsentrasi fraksi uji 1000; 500; 250; 125; 62,5 µg/ml terhadap kultur sel T47D dan sel HeLa. Data berupa absorbansi sel hidup digunakan untuk menghitung persentase kehidupan sel T47D dan sel HeLa kemudian ditetapkan IC₅₀ dengan analisis probit menggunakan *SPSS 16 for Windows*. Uji kandungan kimia dilakukan dengan pereaksi kimia kemudian dilanjutkan dengan kromatografi lapis tipis (KLT).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa memiliki efek sitotoksik terhadap sel T47D namun tidak memiliki efek sitotoksik pada sel HeLa. Potensi sitotoksik fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa terhadap sel T47D yang dinyatakan dalam nilai IC₅₀ sebesar 1893,4 µg/ml. Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol herba alfalfa mengandung flavonoid.

Kata kunci: Uji sitotoksitas, fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa (*Medicago sativa* L.), sel T47D, sel HeLa, flavonoid

PENDAHULUAN

Kanker payudara yang dalam istilah medis biasa disebut *Carcinoma Mammae* muncul akibat terganggunya sistem pertumbuhan sel di dalam jaringan payudara. Kanker leher rahim merupakan salah satu penyakit yang menimbulkan dampak psikososial yang luas, terutama bagi pasien dan keluarganya.

Salah satu tanaman yang dipercaya dapat dijadikan obat adalah alfalfa. Alfalfa dipercaya dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit diantaranya kanker (Astawan dan Kasih, 2008). Menurut penelitian Hong dkk (2011), *Coumestrol* merupakan komponen fitoestrogen dari alfalfa. Meningkatnya kejadian kanker payudara maupun kanker leher rahim, diperkirakan dipicu oleh hormon estrogen. Kelebihan estrogen yang menyebabkan kanker payudara dapat diturunkan risikonya dengan asupan tinggi fitoestrogen karena fitoestrogen dapat berikatan dengan reseptor estrogen pada sel-sel payudara sehingga menurunkan risiko kanker payudara (Winarsi, 2005). Bo-ping dkk (2010) menyebutkan bahwa dalam ekstrak etanol alfalfa terkandung flavonoid. Fraksinasi dengan pelarut yang sesuai akan menghasilkan kandungan spesifik dari herba alfalfa yang memiliki aktivitas antikanker. *Coumestrol* merupakan isoflavonoid (Newall dkk., 1996). Isoflavonoid merupakan senyawa flavonoid yang bersifat kurang polar dapat tersari dalam etil asetat (Andersen dan Markham, 2006). Berdasarkan berbagai pernyataan dan

penelitian tersebut, sangatlah menarik untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek sitotoksik herba alfalfa. Dalam penelitian ini digunakan fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa dan dilakukan secara *in vitro* terhadap sel T47D dan sel HeLa.

METODOLOGI

Bahan Penelitian

Herba alfalfa diperoleh dari kebun alfalfa di Selo Pass Boyolali Jawa Tengah. Pelarut etanol 96%, *n*-heksan, kloroform, dietil eter dan etil asetat. sel T47D dan sel HeLa, medium RPMI 1640, medium penumbuh mengandung *growth factor* 10% FBS – 0,5 % fungison – 2% antibiotik penisilin dan streptomisin (GIPCO), dimetil sulfoksida (E.Merck), aquades, tripsin (Sigma), PBS, larutan MTT 5 mg/ml PBS, larutan SDS 10% dalam HCl 0,01 N, doksorubisin. FeCl₃, butanol, asam asetat, aquades, lempeng KLT (Selulosa).

Alat Penelitian

Alat membuat serbuk dan larutan uji adalah blender (Maspion), ayakan nomor 25 mesh, timbangan elektrik (Acis), seperangkat alat sokletasi, corong pisah, *thermostatic waterbath* (Memmert), viskometer (Rion VT-04C). Alat pembuatan kultur sel yaitu tangki nitrogen cair, mikropipet 1 ml (Gilson), *conical tube* (Nunclon), *petri dish flask* (Nunclon), *Laminar Air Flow Cabinet* (Gelman Sciences), sentrifugator (Sarfal MC12V), mikroskop fase kontras (Zeiss MC 80) dan CO₂ *Incubator* (Heraeus). Alat untuk panen sel : pipet pasteur steril, mikropipet 1 ml dan 200 µl (Gilson), *conical tube* (Nunclon), mikroskop fase kontras (Zeiss MC 80), *haemocytometer* (Neubauer), *counter*. Alat uji sitotoksitas yaitu timbangan elektrik (Sartorius), *96-well plate* (Nunclon), *conical tube* (Nunclon), dan *ELISA reader* (SLT 240 ATC). Alat uji KLT adalah lempeng KLT, bejana kromatografi, pipa kapiler, sinar lampu UV λ_{366} .

Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi terhadap tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro Semarang.

2. Pembuatan Senyawa Uji

a. Pembuatan Serbuk

Herba Alfalfa dipanen pada bulan Februari-Maret tahun 2011. Herba alfalfa dicuci bersih dan dikeringkan dengan sinar matahari ditutupi kain hitam. Simplisia kering diblender. Serbuk diayak dengan ayakan ukuran 25 mesh, kemudian diukur kadar airnya dengan *moisture balance*.

b. Pembuatan Ekstrak Etanol Herba Alfalfa

Proses sokletasi dilakukan 12 kali dengan jumlah total serbuk sebanyak 606,4 gram menggunakan 5,5 liter etanol 96%. Serbuk dibungkus kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam selongsong alat sokletasi dengan labu alas bulat 500 ml yang terisi kira-kira 450 ml etanol dan beberapa butir batu didih. Serbuk herba alfalfa diekstraksi dengan etanol 96% menggunakan alat soklet pada suhu 78°C kemudian ditunggu hingga zat aktif dalam simplisia tersari seluruhnya yang ditandai dengan jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifron. Sari atau menstrum herba alfalfa diuapkan dengan *thermostatic waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental. Kekentalan ekstrak diukur dengan viscometer.

Ekstrak etanol herba alfalfa yang diperoleh selanjutnya dikumpulkan dan diukur bobotnya untuk menghitung rendemen yang dihasilkan.

c. Pembuatan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Herba Alfalfa

Ekstrak kental herba alfalfa yang diperoleh dilarutkan ke dalam campuran air dan etanol dengan perbandingan 9:1. Selanjutnya, difraksinasi dengan menggunakan corong pisah berturut-turut dengan pelarut *n*-heksan, kloroform, dietil eter dan etil asetat. Proses ini dilakukan hingga cairan jernih. Jumlah pelarut yang digunakan untuk fraksinasi sebanding dengan jumlah air-etanol yang ditambahkan ke dalam ekstrak etanol (perbandingan 1:1). Fraksi etil asetat ditampung dan diuapkan menggunakan *thermostatic waterbath* pada suhu 50° C. Fraksi etil asetat yang diperoleh diukur beratnya dan dilakukan uji sitotoksisitas.

3. Uji Sitotoksisitas

a. Penyiapan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dari fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa. Larutan uji tersebut kemudian diencerkan menjadi 5 seri konsentrasi dengan menggunakan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO). Angka kelipatan seri konsentrasi diperoleh berdasarkan rumus:

$$f = \sqrt[n-1]{\frac{Dt}{Dr}}$$

Dimana:

- f = Angka kelipatan seri konsentrasi
- n = Banyaknya seri konsentrasi
- Dt = Konsentrasi tertinggi
- Dr = Konsentrasi terendah (CCRC, 2010)

Pada penelitian ini, konsentrasi tertinggi yang digunakan sebesar 1000 µg/ml dan konsentrasi terendah sebesar 62,5 µg/ml dengan angka kelipatan seri konsentrasi 2. Seri konsentrasi yang digunakan adalah 62,5; 125; 250; 500 dan 1000 µg/ml.

b. Preparasi Sel

Sel yang inaktif dalam wadah ampul diambil dari tangki nitrogen cair dan segera dicairkan pada suhu 37°C kemudian ampul disemprot etanol 70%. Ampul dibuka dan sel dipindahkan ke dalam tabung conical steril yang berisi medium RPMI 1640. Suspensi sel disentrifuge 3000 rpm selama 10 menit, kemudian bagian supernatan dibuang, pellet ditambah satu ml medium penumbuh yang mengandung 10% FBS, disuspensikan hingga homogen, selanjutnya sel ditumbuhkan dalam beberapa *petri dish flask* kecil (3-4 buah), diinkubasikan dalam inkubator suhu 37°C CO₂ 5%. Setelah 24 jam, medium diganti dan sel ditumbuhkan lagi hingga konfluen dan jumlahnya cukup untuk penelitian.

c. Pemanenan Sel

Setelah jumlah sel cukup, medium dibuang dan sel dicuci koloninya. Larutan tersebut dibuang, lalu ditambah larutan tripsin 2,5% sebanyak 1 ml. Supaya distribusi sel merata maka ditambah larutan PBS 3 ml, didiamkan sekitar 3-5 menit agar tripsin bekerja dengan baik. Sel kemudian dipindah ke dalam tabung conical steril dan ditambah PBS sampai volume 10 ml dan disentrifuge 3000 rpm selama 10 menit. Sel dicuci dua kali dengan medium yang sama dan dihitung jumlah selnya menggunakan *haemocytometer*. Suspensi sel ditambah dengan sejumlah medium kultur sehingga diperoleh konsentrasi sel sebesar yang diperlukan.

d. Uji Sitotoksisitas (Metode MTT)

Suspensi sel dalam medium PRF RPMI 1640 sebanyak 100 µl (kepadatan sel T47D 5 x 10³ dan sel HeLa 1,0 x 10⁴ sel/sumuran) dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran berbeda dan *plate* diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5%. Kemudian

ditambahkan sampel 100 µl dalam medium padat tiap sumuran yang berbeda sehingga diperoleh kadar akhir dari sampel dengan variasi kadar. Selanjutnya plate diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada akhir inkubasi, medium pada masing-masing sumuran dibuang dan dicuci dengan PBS kemudian ditambahkan 100 µl MK campuran MTT 0,5% dalam PBS. *Plate* diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Formazan dilarutkan dalam larutan SDS, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. Serapan dibaca pada ELISA *reader* pada λ 595 nm.

4. Uji Kandungan Kimia

Uji kandungan kimia dalam penelitian ini hanya dilakukan terhadap senyawa golongan flavonoid. Uji kandungan kimia terhadap larutan uji pada penelitian ini dilakukan melalui uji pendahuluan dengan pereaksi kimia yang dilanjutkan uji KLT. Pada uji pendahuluan, pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan cara ekstrak dilarutkan dalam etanol 96% kemudian ditetesi dengan FeCl₃. Perubahan warna pada awalnya berwarna kuning bening menjadi kuning pekat menandakan adanya flavonoid dalam fraksi uji. Pada uji Kromatografi Lapis Tipis digunakan fase gerak, fase diam dan reagen untuk deteksi bercak dalam pemeriksaan senyawa flavonoid sebagai berikut:

Fase Diam : Selulosa
Fase Gerak : Butanol –Asam Asetat – Air (7:1:2)
Reagen Pendeteksi : Uap ammonia

5. Uji Sitotoksitas

Data yang didapat dari hasil pembacaan ELISA *reader* berupa absorbansi (OD) masing-masing sumuran dikonversikan dalam persentase kehidupan sel. OD kontrol pelarut dianggap sama dengan OD kontrol sel maka dihitung persentase sel hidup dengan rumus:

$$\text{Persentase kehidupan sel} = \frac{\text{OD sel dengan perlakuan} - \text{OD kontrol media}}{\text{OD kontrol sel} - \text{OD kontrol media}} \times 100\%$$

Data persentase kehidupan sel T47D tersebut digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ yang merupakan potensi sitotoksik fraksi etil asetat dari ekstrak etanol herba alfalfa menggunakan program SPSS 16 *for windows* melalui analisis probit (CCRC, 2010).

6. Analisis Kandungan Kimia

Analisis hasil identifikasi golongan senyawa aktif dari fraksi uji dilakukan dengan 2 uji yaitu uji pendahuluan dan uji KLT. Uji pendahuluan dilakukan dengan melihat perubahan warna pada larutan uji. Uji KLT dengan membandingkan kesesuaian warna bercak pada KLT setelah elusi dan bercak senyawa standar dengan literatur. Pengamatan lempeng KLT dilakukan di bawah sinar UV λ₃₆₆ dan pereaksi semprot.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Senyawa Uji

Herba alfalfa yang sudah dicuci bersih dikeringkan di bawah sinar matahari agar menjadi kering sehingga mempermudah proses pembuatan menjadi serbuk memiliki tujuan untuk meningkatkan luas permukaan bahan baku (Voigt, 1994). Serbuk simplisia herba alfalfa memiliki kadar air sebesar 6 %. Secara umum kadar air simplisia tanaman obat maksimum 10%. Pemantauan kadar air ini dimaksudkan untuk mencegah tumbuhnya kapang dan menurunkan reaksi enzimatis sehingga dapat menghindari terjadinya penurunan mutu atau pengrusakan simplisia (Gunawan dan Mulyani, 2004).

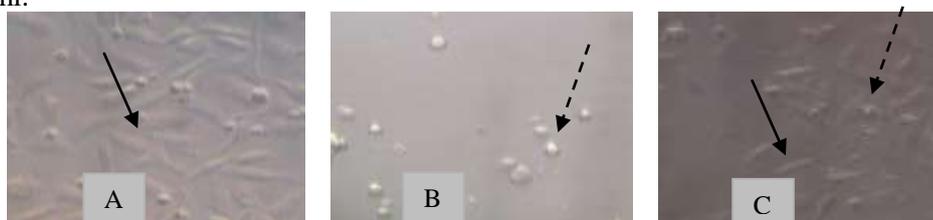
Serbuk simplisia herba alfalfa sebesar 1576,2 gram diperoleh dari 13,5 Kg herba alfalfa segar. Serbuk simplisia herba alfalfa yang digunakan dalam penelitian sebesar 606,4 gram. Serbuk herba alfalfa diekstraksi menggunakan metode sokletasi. Metode ini membutuhkan bahan pelarut dalam jumlah kecil (Voigt, 1994). Pemilihan etanol sebagai larutan penyari dikarenakan etanol dapat menyari hampir semua jenis senyawa aktif terekstraksi, yaitu senyawa yang bersifat polar, semi polar, hingga non polar. Ekstrak kental yang dihasilkan dalam penelitian ini sebanyak 113,6 gram, sehingga rendemen hasil yang diperoleh adalah 18,73 % dengan kekentalan sebesar 100 cPa.s. Secara makroskopis ekstrak etanol herba alfalfa berwarna hijau kehitaman dengan bau seperti gula-gula kacang.

Ekstrak kental yang digunakan untuk fraksinasi sebesar 50 gram. Fraksi etil asetat yang diperoleh setelah diuapkan adalah 548 mg dengan rendemen sebesar 1,09 %. Rendemen yang diperoleh pada proses pembuatan larutan uji sangat kecil karena proses fraksinasi dilakukan secara bertingkat sehingga senyawa aktif telah banyak tersari pada pelarut sebelumnya. Proses fraksinasi dilakukan secara bertingkat dengan pelarut *n*-heksan, kloroform, dietil eter, dan etil asetat. Metode partisi cair-cair bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan kelarutannya artinya memisahkan senyawa yang terlarut dalam *n*-heksan, kloroform, dietil eter dan etil asetat.

Uji Sitotoksitas

1. Uji Sitotoksitas Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Herba Alfalfa terhadap Sel T47D

Fraksi uji pada penelitian ini menunjukkan efek sitotoksik yang rendah terhadap sel T47D meskipun perlakuan fraksi uji pada konsentrasi tertinggi yaitu 1000 µg/ml menyebabkan kematian terhadap sel T47D. Sel T47D yang hidup berbentuk memanjang seperti daun sedangkan yang mati berbentuk bulat (Gambar 1). Tabel I menunjukkan hasil uji sitotoksitas fraksi uji terhadap sel T47D dengan berbagai seri konsentrasi. Data analisis probit dari persentase kehidupan sel diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 1893,4 µg/ml.



Gambar 1. Efek Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Herba Alfalfa terhadap Sel T47D.

- (A) Kontrol sel T47D
 - (B) Kontrol positif, doxorubisin konsentrasi 20 µg/ml
 - (C) Perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa 1000 µg/ml terhadap sel T47D
- ▶ Sel T47D hidup
 - - -▶ Sel T47D yang mati

Nilai IC₅₀ doxorubisin dalam penelitian ini tidak dapat dihitung karena data persentase kehidupan sel yang didapat di bawah 50 %, bahkan pada konsentrasi terendah (2,5 µg/ml) masih menunjukkan persentase kehidupan sel yang rendah yaitu 16,1 % (Tabel II). Bila dilihat dari nilai persentase kehidupan sel pada perlakuan doxorubisin

maka persentase kehidupan sel pada fraksi uji jauh lebih besar. Bisa disimpulkan bahwa potensi fraksi uji masih terlalu jauh dibandingkan kontrol positifnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa doksorubisin memiliki efek sitotoksik terhadap sel T47D yang lebih besar dibandingkan dengan efek sitotoksik senyawa uji.

Tabel I. Hasil Uji Sitotoksitas Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Herba Alfalfa terhadap Sel T47D

Konsentrasi larutan uji ($\mu\text{g/ml}$)	Persentase kehidupan sel T47D (%)	Probit	IC ₅₀
1000	88,9	8,8	1893,4 $\mu\text{g/ml}$
500	93,9	9,7	
250	106,8	9,8	
125	114,3		
62,5	102,5		

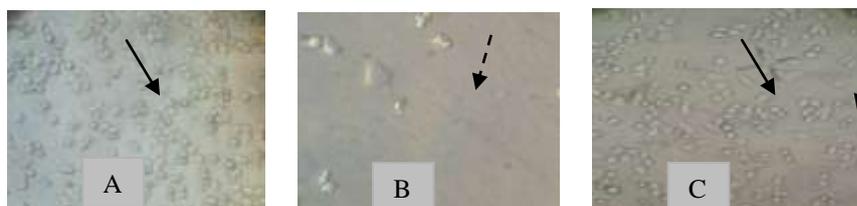
Tabel II. Hasil Uji Sitotoksitas Doksorubisin terhadap Sel T47D

Konsentrasi doksorubisin ($\mu\text{g/ml}$)	Persentase kehidupan sel T47D (%)
20	13,3
10	13,6
5	14,0
2,5	16,1

Doksorubisin merupakan senyawa tunggal yang berfungsi sebagai antikanker (Nafrialdi dan Ganiswarna, 1995). Sementara fraksi uji kemungkinan besar terdiri dari beberapa senyawa sehingga efek sitotoksik belum terlalu dominan. Potensi sitotoksitas yang rendah tersebut diduga diakibatkan karena sedikitnya kandungan senyawa aktif flavonoid pada larutan uji.

2. Uji Sitotoksitas Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Herba Alfalfa terhadap Sel HeLa

Hasil uji sitotoksitas fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa terhadap sel HeLa dengan metode MTT *assay* dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Efek Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Herba Alfalfa terhadap Sel HeLa.

- (A) Kontrol sel HeLa
 - (B) Perlakuan doksorubisin dengan konsentrasi 5 $\mu\text{g/ml}$
 - (C) Perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa 1000 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel HeLa
- > sel HeLa hidup
 - - - -> sel HeLa yang mati

Tabel III menunjukkan bahwa pada konsentrasi rendah tidak terdapat sel yang mati namun fraksi uji pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ memperlihatkan adanya kematian sel.

Analisis probit digunakan untuk membuat kurva yang sigmoid menjadi linier, namun karena persentase kehidupan sel pada fraksi uji sebagian besar lebih dari 100%, maka analisis probit tidak bisa digunakan.

Tabel III. Hasil Uji Sitotoksitas Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Herba Alfalfa terhadap Sel HeLa.

No	Konsentrasi larutan uji ($\mu\text{g/ml}$)	% Kehidupan Sel
1	62,5	103,3
2	125	104,3
3	250	101,6
4	500	106,2
5	1000	96,7

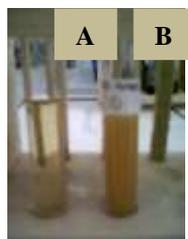
Tabel IV. Hasil Uji Sitotoksitas Dokсорubisin terhadap Sel HeLa

Konsentrasi dokсорubisin ($\mu\text{g/ml}$)	Persentase kehidupan sel HeLa (%)	Probit	IC ₅₀
5	47,2	4,2	3,6 $\mu\text{g/ml}$
2,5	47,2	5,6	
1,25	56,9	6,4	
0,625	66,4	6,7	
0,3125	79,8	6,9	

Kontrol positif dokсорubisin terhadap sel HeLa memiliki nilai IC₅₀ 3,6 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel IV). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi uji tidak memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker leher rahim (sel HeLa) meskipun pada konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ mengakibatkan kematian sel, namun tidak signifikan.

Uji Kandungan Kimia

Uji pendahuluan dilakukan sebagai awal identifikasi golongan senyawa aktif dalam fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa. Hasil uji flavonoid pada uji pendahuluan menggunakan FeCl₃ menghasilkan warna yang lebih intens dari warna semula, yang awalnya berwarna kuning jernih berubah menjadi kuning orange (Gambar 3). Perubahan warna yang terjadi menandakan bahwa larutan uji mengandung senyawa turunan fenolik. Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol alam (Harborne, 1987). Perubahan warna yang terjadi pada larutan uji dikarenakan adanya gugus hidroksi pada inti aromatis yang bisa berikatan dengan Fe.



Keterangan:

A = fraksi uji + etanol 96%

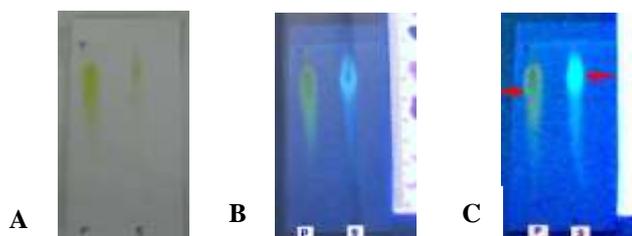
B = fraksi uji + etanol 96% + FeCl₃

Gambar 3. Uji Flavonoid dengan Pereaksi FeCl₃ terhadap Larutan Uji

Berdasarkan hasil uji pendahuluan yang sudah dilakukan sebelumnya, maka uji KLT dilakukan untuk identifikasi flavonoid. Uap amoniak digunakan sebagai pereaksi penampak bercak untuk memberikan suasana basa pada bercak supaya dapat terdeteksi secara visibel maupun di bawah sinar ultraviolet. Flavonoid akan membentuk warna kuning atau orange dengan pereaksi amoniak secara visibel (Wagner dan Bladt, 1995) seperti terlihat pada gambar 4. Perbandingan yang digunakan yaitu kuersetin. Kuersetin

dan glikosidanya berada dalam jumlah sekitar 60-75% dari total jumlah flavonoid yang ada (Harborne, 1987). Tujuan penggunaan pembanding kuersetin dalam uji ini hanya untuk menegaskan adanya senyawa flavonoid dalam senyawa uji.

Pengamatan dilakukan secara visibel dan di bawah sinar UV 366 nm sebelum dan sesudah diuapi amoniak. Bercak sampel terlihat coklat kekuningan pada pengamatan secara visible. Bercak sampel terlihat berfluoresensi biru muda di bawah sinar UV 366 nm sebelum diuapi amonia, namun terjadi perubahan fluorensensi menjadi warna murup biru muda setelah diuapi amonia. Diduga, flavonoid yang terkandung adalah isoflavon (Riyanto, 1989). Isoflavon memberikan warna biru muda cemerlang setelah diuapi ammonia bila dilihat di bawah sinar UV (Harborne, 1987). Kandungan isoflavon pada akar alfalfa telah dinyatakan pada penelitian Tiller (1994). Kromatogram sampel menunjukkan nilai R_f sebesar 0,775 sedangkan R_f pembanding kuersetin sebesar 0,625 sehingga R_f sampel lebih besar dari R_f pembanding. Hasil KLT membuktikan bahwa fraksi uji mengandung flavonoid sehingga golongan senyawa yang menyebabkan efek sitotoksik terhadap sel T47D kemungkinan adalah flavonoid, namun untuk sel HeLa tidak menimbulkan efek sitotoksik.



Gambar 4. Kromatogram Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (S) dan Pembanding Kuersetin (P)

Keterangan:

- A. Pengamatan secara visibel
- B. Pengamatan pada sinar UV 366 nm sebelum diuapi amoniak
- C. Pengamatan pada sinar UV 366 nm setelah diuapi amoniak

Fase Diam : Selulosa

Fase Gerak : Butanol-Asam Asetat-Air (7:1:2)

Beberapa mekanisme flavonoid dalam melawan kanker adalah: (1) sebagai antioksidan, (2) menekan produksi prostaglandin E2 (Winarsi, 2005). Beberapa penelitian juga telah menyebutkan tentang efek antikanker terkait dengan kandungan flavonoid yang ada pada tumbuhan lain, yaitu: Penelitian pada tanaman sambung nyawa sebagai agen kemopreventif. Pada penelitian tersebut flavonoid diduga bertanggung jawab atas efek kemopreventif yang ditimbulkan, ekstrak etanolik daun sambung nyawa telah terbukti dapat menghambat proliferasi sel HeLa dan sel T47D serta memacu terjadinya apoptosis (Setiawati dkk., 2007)

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol herba alfalfa mempunyai efek sitotoksik terhadap sel T47D namun tidak memiliki efek sitotoksik pada sel HeLa.
2. Nilai IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa terhadap sel T47D sebesar 1893,4 $\mu\text{g/ml}$.
3. Fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa mengandung flavonoid.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi flavonoid dari herba alfalfa yang memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara.
2. Perlu dilakukan uji sitotoksitas senyawa flavonoid fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfalfa terhadap sel-sel kanker lainnya seperti sel MCF-7, sel WiDr, agar diketahui keefektifan dari senyawa uji pada sel kanker lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, Q.M., and Markham, K.R., 2006, *Flavonoid; Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press, USA, 2
- Astawan, M., dan Kasih, A.L., 2008, *Khasiat Warna Warni Makanan*, Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 212-214
- Bo-ping, W., Yong-mei, Z., Zhi-Zhong, C., and Yong-zhil, T., 2010, Study on Extraction of Flavonoids in Alfalfa Assisted With Ultrasonic Wave, *Acta Agrestia Sinica*, **6**
- CCRC., 2010, *Standard Operating Procedure*, Cancer Chemoprevention Research Cancer Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Gunawan, D., dan Mulyani, S., 2004, *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)*, Jilid I, Cetakan I, Penebar Swadaya, Jakarta, 12-13
- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia; Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Penerbit ITB, Bandung, 13, 47, 49, 69
- Hong, Y., Wang, S., Hsu, C., Lin, B., Kuo, Y., and Huan, C., 2011, Phytoestrogenic Compounds in Alfalfa Sprout (*Medicago Sativa*) Beyond Coumestrol, *J. Agri. Food Chem*, **59**, 131-137
- Newall, C.A., Anderson, L.A., and Phillipson, J.D., 1996, *Herbal Medicine; A Guide for Health-care Professionals*, The Pharmaceutical Press, London, 23
- Riyanto, S., 1989, Flavonoid, dalam Mursyidi, A., *Analisis Metabolit Sekunder*, PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 304
- Setiawati, A., Endah, P.S., Titi, R.W., dan Rifki, R., 2007, Sambung Nyawa (*Gynura Procumbens* (Lour.) Merr.) Sebagai Agen Kemopreventif, *Pharmacon*, **5**, 1-12
- Tiller, S.A., Parry, A.D., and Edwards, R., 1994, Change In The Accumulation of Flavonoid and Isoflavonoid Conjugates Associated With Plant Age and Nodulation In Alfalfa, *Physiologia Plantarum*, **91**, 27-36
- Voigt, R., 1994, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, Diterjemahkan oleh Soendani Noerono Soewandhi, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 135, 570-571
- Wagner, H., and Bladt, S., 1995, *Plant Drug Analysis- A Thin Layer Chromatography Atlas*, Second Edition, Springer, German, 196-197
- Winarsi, H., 2005, *Isoflavon*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 53, 58