

UJI SITOTOKSISITAS FRAKSI *n*-HEKSANA EKSTRAK ETANOL HERBA ALFALFA (*Medicago Sativa L.*) PADA SEL T47D DAN SEL HeLa SERTA IDENTIFIKASI KANDUNGAN SENYAWA KIMIANYA

Sri Susilowati¹⁾, Anggun Claresa¹⁾, Ibrahim Arifin¹⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

INTISARI

Kanker payudara dan kanker serviks merupakan jenis kanker yang memiliki angka kejadian cukup tinggi di dunia maupun di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas sitotoksik dan potensi sitotoksitas fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa (*Medicago sativa L.*) pada sel T47D dan sel HeLa, serta untuk mengetahui kandungan senyawa kimianya.

Fraksi uji dibuat melalui proses sokletasi dengan pelarut etanol dilanjutkan dengan fraksinasi dengan pelarut *n*-heksana. Uji sitotoksitas digunakan metode *MTT assay* dengan seri konsentrasi fraksi uji 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/ml. Data yang berupa absorbansi dari pembacaan *ELISA reader* digunakan untuk menghitung persentase kehidupan sel T47D dan sel HeLa, selanjutnya dihitung nilai IC_{50} dengan analisis probit pada *SPSS 16 for Windows*. Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan dengan pereaksi kimia dan kromatografi kertas. Analisis data kandungan senyawa kimia dilakukan secara kualitatif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dan sel HeLa. Potensi sitotoksitas senyawa uji terhadap sel T47D dan sel HeLa yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} secara berurutan yaitu 523,9 µg/ml dan 503,5 µg/ml. Fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa mengandung kumarin dan flavonoid.

Kata kunci : uji sitotoksitas, fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa, *Medicago sativa L.*, sel T47D, sel HeLa, kumarin, flavonoid

ABSTRACT

Breast and cervical cancers were the high prevalence, both in the world and Indonesia. This study aimed to determine the cytotoxic activities and its potency of *n*-hexane fraction of ethanol extract alfalfa herb (*Medicago sativa L.*) in T47D cells and HeLa cells, also identified its chemical compounds.

Extraction was done using ethanol by soxhletation method and then followed fractionation with *n*-hexane. Cytotoxic assay to get the value of IC_{50} was carried out by using *MTT assay* with a series of concentration of fraction 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/ml. The cytotoxic activities was determined with viability cells from absorbance *ELISA reader*. Identification of chemical compounds of *n*-hexane fraction of ethanol extract alfalfa herb was done using chemical reactan and paper chromatography and then was evaluated qualitatively.

The results showed that the *n*-hexane fraction of ethanol extract of alfalfa herb had cytotoxic activities in T47D cells and HeLa cells. The IC_{50} values were 523,9 µg/ml in T47D cells and 503,5 µg/ml in HeLa cells. The chemical compounds of *n*-hexane fraction of ethanol extract of alfalfa herb were coumarin and flavonoid.

Key words : cytotoxic assay, *n*-hexane fraction of ethanol extract of herb alfalfa, *Medicago sativa L.*, T47D cells, HeLa cells, flavonoid, coumarin

PENDAHULUAN

Kanker payudara dan kanker serviks merupakan jenis kanker yang menjadi penyebab utama kematian. Diperkirakan pada tahun 2010 di Amerika Serikat, terdapat 230.480 kasus kanker payudara pada wanita dan 2.140 kasus pada pria, dengan 39.520 kasus kematian pada wanita dan 450 kasus kematian pada pria (Anonim, 2011). Di Indonesia, kanker payudara menempati urutan kedua setelah kanker leher rahim (Tjindarbumi dan Mangunkusuma, 2002).

Kemoterapi merupakan salah satu jenis pengobatan yang dapat dilakukan untuk mengobati kanker payudara dan kanker serviks. Secara umum, kombinasi obat lebih sering diberikan pada pengobatan kanker payudara dan kanker serviks, agar memperoleh hasil yang optimum. Namun, kemoterapi ini sering menimbulkan efek samping yang kompleks. Penggunaan doxorubicin dan epirubicin dapat menyebabkan gangguan hati pada seseorang yang belum memiliki riwayat penyakit hati. Selain itu kemoterapi juga menyebabkan efek samping sementara seperti mual, muntah, lemah, dan rambut rontok. Pengobatan ini juga menyebabkan proses produksi sel darah putih, sel darah merah dan trombosit terganggu, serta terjadi penghentian siklus menstruasi secara permanen atau sementara (Anonim, 2007).

Alfalfa merupakan salah satu tanaman yang dipercaya dapat menyembuhkan berbagai penyakit, salah satunya adalah kanker (Astawan dan Kasih, 2008). Hasil penelitian Bo-ping *et al*, (2010) menyebutkan bahwa dalam ekstrak etanol alfalfa terkandung flavonoid. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa *coumestrol* merupakan fitoestrogen komponen dari alfalfa (Hong *et al*, 2011).

Penelitian aktivitas antikanker herba alfalfa pada kanker usus sudah pernah dilakukan (Castleman, 2001), namun penelitian tentang aktivitas antikanker herba alfalfa secara spesifik pada kanker payudara dan kanker serviks belum pernah dilakukan. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian uji sitotoksitas herba alfalfa terhadap sel kanker payudara dan kanker serviks, dimana dalam penelitian ini digunakan sel T47D dan sel HeLa. Untuk mengetahui golongan senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa maka juga dilakukan identifikasi kandungan senyawa kimianya yaitu dengan pereaksi kimia dan kromatografi kertas.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Herba Alfalfa diperoleh dari Selopas, Boyolali. Etanol 96% dan *n*-heksana, sel T47D, sel HeLa, medium RPMI 1640, medium penumbuh yang mengandung *growth factor* 10% FBS (Fetal Bovine Serum) - 0,5 fungizon - 2% antibiotic

penisilin dan streptomisin (GIPCO), DMSO (SIGMA), natrium karbonat (E.Merck), kertas saring 0,2 μm , aquades, hepes (SIGMA), dan tripsin (SIGMA), *Phosphat Buffered Saline* (PBS), larutan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-241)- 2,5-difeniltetrazolium bromida) 5 mg/ml PBS, larutan sodium dodecyl sulphat (SDS) 10% dalam HCl 0,01 N, doksorubisin. Kertas whatman, FeCl₃, klorofom, methanol, NaOH 10%, amoniak dan quercetin.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah, *tissue culture flask* (Nunclon), *Laminar Air Flow Cabinet* (Gelman Sciences), sentrifugator (Sarvall MC12V), mikroskop fase kontras (Zeiss MC 80), CO₂ *Incubator* (Heraeus), pipet Pasteur steril, mikropipet (Gilson), *white tip* steril, *conical tube* (Nunclon), *haemocytometer* (Neubauer), *counter*; kamera digital (Canon Power Shoot A80,4,0 mega pixels). timbangan elektrik (Sartorius), *96-well plate* (Nunclon), *yellow tip* dan *blue tip*, ELISA reader (SLT 240 ATC), blender (Maspion), ayakan mesh 40, alat-alat gelas, *thermostatic waterbath* (Memmert), bejana kromatografi, pipa kapiler, alat penampak bercak, lampu UV 254 nm dan lampu UV 366 nm.

Jalannya Penelitian

1. Pembuatan fraksi uji

Fraksi uji yaitu fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode sokletasi menggunakan pelarut etanol dari bahan simplisia herba alfalfa. Fraksinasi terhadap ekstrak etanol dilakukan berulang kali hingga jernih dengan menggunakan pelarut *n*-heksana. Hasil fraksinasi tersebut kemudian diuapkan dengan waterbath untuk memperoleh hasil fraksi yang kering untuk dilanjutkan uji sitotoksitas dan identifikasi kandungan senyawa kimianya.

2. Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT assay. Suspensi sel dalam medium RPMI 1640 sebanyak 100 μl (kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran) dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran berbeda dan *plate* diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5%. Kemudian ditambahkan fraksi uji dengan seri konsentrasi 62,5; 125; 250; 500; 1000 $\mu\text{g/ml}$ (sebanyak 3 replikasi) 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 medium baru dan 10 μl MTT 0,5% dalam PBS. *Plate* diinkubasi lagi selama 2,5 jam pada suhu 37°C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Formazan dilarutkan dalam larutan SDS, lalu

diinkubasi selama 12 jam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm (CCRC, 2010). Untuk kontrol positif digunakan doksorubisin, konsentrasi pada sel T47D yaitu 20; 10; 5; 2,5 µg/ml, sedangkan pada sel HeLa yaitu 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 µg/ml.

3. Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia fraksi *n*-heksana ekstrak etanol dilakukan dengan pereaksi kimia terhadap senyawa kumarin dan flavonoid, karena dalam beberapa penelitian, pelarut *n*-heksana mampu menyari senyawa kumarin (Djamil *et al*, 2006) dan flavonoid (Ridwan *et al*, 2006; Pradipta *et al*, 2007).

Identifikasi kumarin dilakukan melalui ekstraksi sampel (fraksi uji) dengan CH₃OH selama 5 hari. Hasil ekstraksi disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tabung reaksi dipanaskan dan mulut tabung reaksi ditutup dengan kertas saring yang dibasahi dengan NaOH 10%. Pemanasan dibiarkan berlangsung selama 10 menit, kemudian dikeringkan dalam oven, dilihat warna fluoresensi dengan sinar UV λ₂₅₄ nm. Adanya kumarin ditandai oleh warna fluoresensi kuning kehijauan (Harborne, 1987).

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara menambah beberapa ml fraksi uji dengan beberapa tetes FeCl₃. Warna oranye sampai merah yang muncul (lebih intens) mengindikasikan adanya flavonoid. Identifikasi flavonoid dilanjutkan dengan kromatografi kertas dengan fase diam, fase gerak, dan reagen untuk deteksi bercak secara berturut-turut yaitu kertas whatman, kloroform : metanol (1:10), dan uap amoniak. Perbandingan yang digunakan yaitu quersetin. Pengamatan hasil kromatogram dilakukan secara visibel dan di bawah sinar UV 366 nm.

Analisis Data

Analisis data dari uji sitotoksitas dilakukan untuk menghitung persentase kehidupan sel dan nilai IC₅₀. Persentase kehidupan sel dihitung dari data absorbansi hasil pembacaan ELISA reader dengan rumus sebagai berikut :

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

Dari data persentase kehidupan sel tersebut, dihitung nilai IC₅₀, yang merupakan potensi sitotoksitas fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa, menggunakan analisis probit program SPSS 16 for windows (CCRC, 2010).

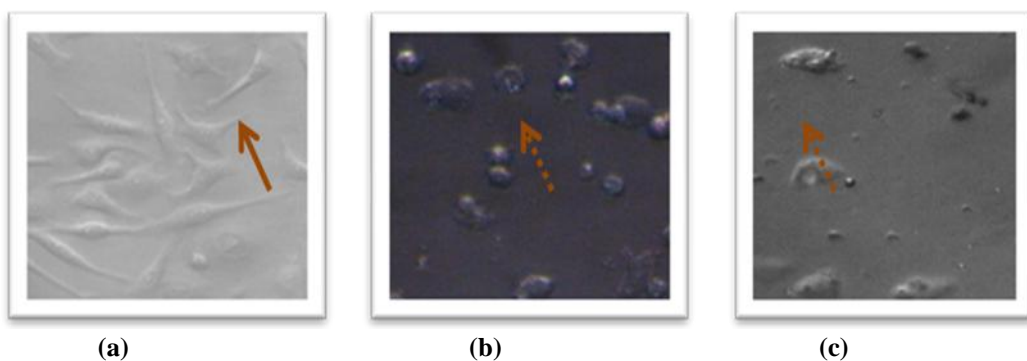
Analisis kandungan kimia dilakukan secara kualitatif baik terhadap pemeriksaan dengan pereaksi kimia maupun kromatografi kertas.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Uji Sitotoksitas Fraksi *n*-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa

1. Uji Sitotoksitas pada Sel T47D

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan fraksi uji pada sel T47D dapat menginduksi kematian sel dan berpengaruh terhadap morfologi sel (Gambar 1). Sel yang hidup tampak berbentuk memanjang seperti daun, ini terlihat pada kontrol sel (Gambar 1 (a)) sedangkan sel yang mati tampak berbentuk bulat, ini terlihat pada kontrol positif doksorubisin (Gambar 1(b)) dan perlakuan fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa (Gambar 1(c)). Hal ini membuktikan bahwa fraksi uji memiliki aktivitas sitotoksik pada sel T47D.



Gambar 1. Aktivitas sitotoksik Fraksi *n*-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa pada Sel T47D. Keterangan gambar : (a) Kontrol Sel T47D, (b) Kontrol Positif Doksorubisin Konsentrasi 20 mg/ml, (c) Perlakuan Fraksi *n*-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa Konsentrasi 1000 mg/ml. → sel hidup ; ---> sel mati

Aktivitas sitotoksik fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa terhadap sel T47D menunjukkan adanya fenomena *dose dependent*. Semakin tinggi konsentrasi fraksi *n*-heksana ekstrak

etanol herba alfalfa yang diberikan maka semakin kecil persentase kehidupan sel T47D dan semakin besar sifat sitotoksitasnya (Tabel I). Potensi sitotoksitas fraksi uji yang dinyatakan dalam nilai

IC₅₀ diperoleh melalui analisis probit antara konsentrasi fraksi uji vs probit (Gambar 2) dan

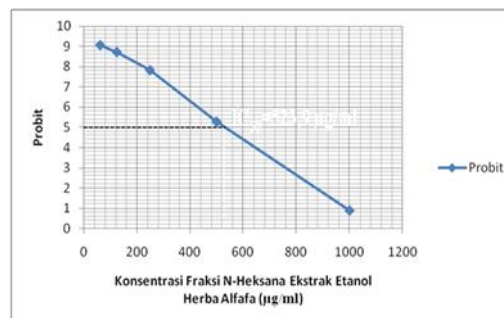
diperoleh nilai sebesar 523,9 µg/ml (Tabel I).

Tabel I. Hasil Uji Sitotoksitas Fraksi *n*-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa pada Sel T47D

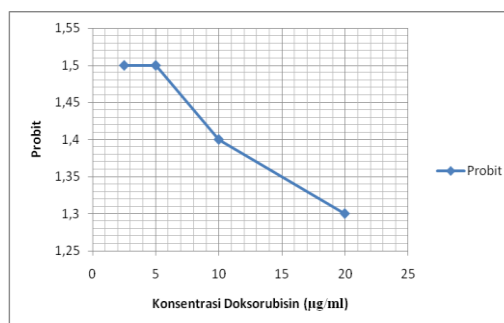
Konsentrasi senyawa uji (µg/ml)	Persentase Kehidupan Sel T47D (%)	Probit	IC ₅₀
1000	11,5	0,9	523,9 µg/ml
500	46,5	5,3	
250	74,9	7,8	
125	91,7	8,7	
62,5	91,7	9,1	

Tabel II. Hasil Uji Sitotoksitas Doksorubisin pada Sel T47D

Konsentrasi senyawa uji (µg/ml)	Persentase Kehidupan Sel T47D (%)	Probit
20	13,3	1,3
10	13,6	1,4
5	13,9	1,5
2,5	16,1	1,5



Gambar 2. Grafik Konsentrasi Fraksi *n*-Heksan Ekstrak Etanol Herba Alfalfa Sel T47D vs Probit



Gambar 3. Grafik Konsentrasi Doksorubisin Ekstrak Etanol Herba Alfalfa Sel T47D vs Probit

Pada penelitian ini digunakan doksorubisin sebagai kontrol positif. Hasil uji sitotoksitas doksorubisin terhadap sel T47D menunjukkan bahwa doksorubisin sangat poten karena memiliki nilai IC₅₀ di bawah 20 µg/ml (Tabel II, Gambar 3). Menurut Skehan *et al* (1990) suatu senyawa dikatakan poten jika memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 20 µg/ml. Di samping itu sel T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doksorubisin (Zampieri *et al*,

2002). Nilai IC₅₀ doksorubisin tidak dapat dihitung secara langsung karena rentang konsentrasi doksorubisin yang digunakan dalam penelitian ini terlalu lebar.

Doksorubisin merupakan senyawa murni yang diisolasi dari *Streptomyces peucetius var caesius* pada tahun 1960an. Doksorubisin bersifat sitotoksik dengan mekanisme menghambat sintesa DNA dan RNA melalui daya kerjanya terhadap

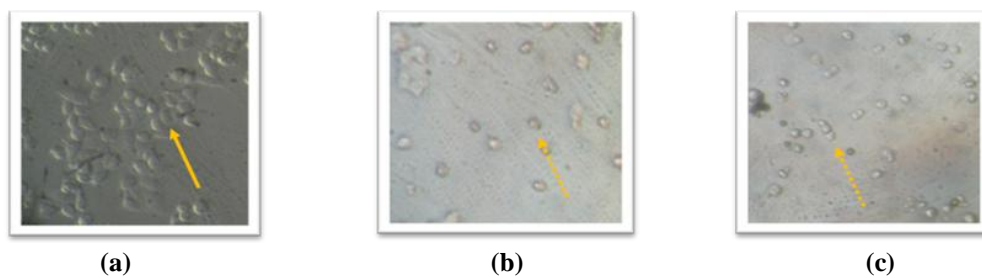
enzim topoisomerase II (Tjay dan Raharja, 2007). Secara klinis, doksorubisin merupakan terapi adjuvant untuk kanker payudara. Selain itu, doksorubisin merupakan agen kemoterapi yang aktif mengobati kanker payudara pada fase metastatik dan menghasilkan respon 50% sampai 60% sebelum memperoleh kemoterapi pada tahap metastatik (Dipiro *et al*, 2005).

Perbandingan hasil uji sitotoksitas pada sel T47D antara fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa dan doksorubisin menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik fraksi uji jauh lebih kecil daripada doksorubisin. Hal ini disebabkan doksorubisin merupakan senyawa murni tunggal, sedangkan fraksi uji kemungkinan masih mengandung beberapa senyawa. Adanya zat balast

yang terkandung dalam fraksi uji dapat mengganggu aktivitas sitotoksik fraksi uji.

2. Uji Sitotoksitas pada Sel HeLa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan fraksi uji juga menyebabkan kematian pada sel HeLa dan berpengaruh terhadap morfologi selnya (Gambar 4). Sel yang hidup berbentuk bulat berkoloni dan semi melekat, seperti terlihat pada kontrol sel HeLa (Gambar 4(a)), sedangkan sel yang mati berbentuk bulat mengambang, ini terlihat pada kontrol positif doksorubisin (Gambar 4(b)) dan perlakuan fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa (Gambar 4(c)). Hal ini membuktikan bahwa fraksi uji memiliki aktivitas sitotoksik pada sel HeLa.



Gambar 4. Aktivitas sitotoksik Fraksi *n*-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa pada Sel HeLa.

Keterangan gambar : (a) Kontrol Sel HeLa, (b) Kontrol Positif, Doksorubisin Konsentrasi 5 µg/ml, (c) Perlakuan Fraksi *n*-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa Konsentrasi 1000 µg/ml. → sel hidup ; --- > sel mati

Aktivitas sitotoksik fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa pada sel HeLa juga menunjukkan adanya fenomena *dose dependent*. Semakin tinggi konsentrasi fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa yang diberikan maka semakin kecil persentase kehidupan sel HeLa dan semakin besar sifat sitotoksitasnya (Tabel III). Potensi sitotoksitas fraksi uji yang dinyatakan dalam nilai IC_{50} diperoleh melalui analisis probit antara konsentrasi fraksi uji vs probit (Gambar 5) dan diperoleh nilai sebesar 503,5 µg/ml (Tabel III).

Hasil penelitian terhadap kontrol positif menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik doksorubisin pada sel HeLa cukup besar terlihat

dari nilai IC_{50} doksorubisin sebesar 3,6 µg/ml (Tabel IV, Gambar 6). Doksorubisin merupakan senyawa tunggal yang mempunyai efek antikanker spektrum luas, selain sensitif terhadap sel kanker payudara, doksorubisin juga sensitif dan poten terhadap kanker lain seperti kanker serviks (Nefrialdi dan Ganiswara, 2007).

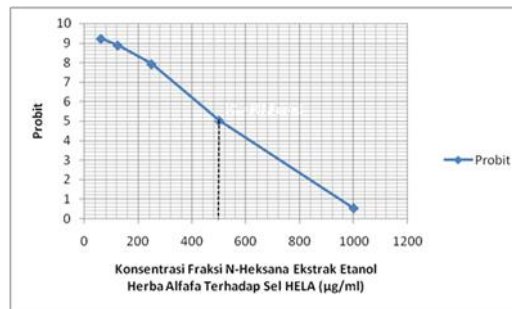
Perbandingan hasil uji sitotoksitas terhadap sel HeLa antara fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa dan doksorubisin menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik fraksi uji jauh lebih kecil daripada doksorubisin. Hal ini berlaku sama terhadap pengujian pada sel T47D.

Tabel III. Hasil Uji Sitotoksitas Fraksi *n*-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa pada Sel HeLa

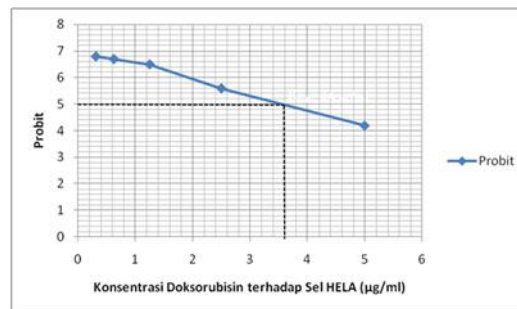
Konsentrasi Senyawa Uji (µg/ml)	Persentase Kehidupan Sel HeLa (%)	Probit	IC_{50}
1000	3	0,6	503,5 µg/ml
500	62,5	5,0	
250	72,4	7,9	
125	79,5	8,9	
62,5	101,6	9,2	

Tabel IV. Hasil Uji Sitotoksitas Doksorubisin pada Sel HeLa

Konsentrasi Senyawa Uji ($\mu\text{g/ml}$)	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	6,5	
0,625	66,4	6,7	
0,3125	79,8	6,8	



Gambar 5. Grafik Konsentrasi Fraksi *n*-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa Sel HeLa vs Probit



Gambar 6. Grafik Konsentrasi Doksorubisin Ekstrak Etanol Herba Alfalfa Sel HeLa vs Probit

Dari hasil uji sitotoksitas pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fraksi uji mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dan sel HeLa, meskipun kurang poten untuk dapat dikembangkan sebagai senyawa antikanker. Hal ini disebabkan nilai potensi sitotoksitas fraksi uji yang dinyatakan dengan IC_{50} terhadap sel T47D dan sel HeLa masing-masing sebesar 523,9 $\mu\text{g/ml}$ dan 503,5 $\mu\text{g/ml}$, masih lebih dari 20 $\mu\text{g/ml}$. Menurut Skehan *et al* (1990) suatu senyawa dikatakan poten jika memiliki nilai IC_{50} kurang dari 20 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} tersebut juga memperlihatkan bahwa aktivitas sitotoksik fraksi uji lebih tinggi pada sel HeLa daripada sel T47D, meskipun tidak menunjukkan perbedaan selisih yang cukup bermakna. Namun demikian dapat dipastikan fraksi uji memiliki nilai IC_{50} yang hampir sama sehingga kemungkinan mekanisme sitotoksiknya juga hampir sama. Mekanisme sitotoksik ini dapat *n*-heksana adalah aglikon yang kurang polar seperti flavonoid yang termetoksilasi Dalam

melalui reseptor estrogen yang terdapat pada sel T47D dan sel HeLa, kemungkinan fraksi uji bersifat antagonis reseptor estrogen. Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian Hong *et al* (2011) yang menunjukkan bahwa alfalfa mengandung *coumestrol*, suatu fitoestrogen. Fitoestrogen bisa bersifat estrogenik atau antiestrogenik pada reseptor estrogen, tergantung dari lokasi sel atau jaringan. Akan tetapi ini semua perlu dibuktikan lebih lanjut lewat penelitian.

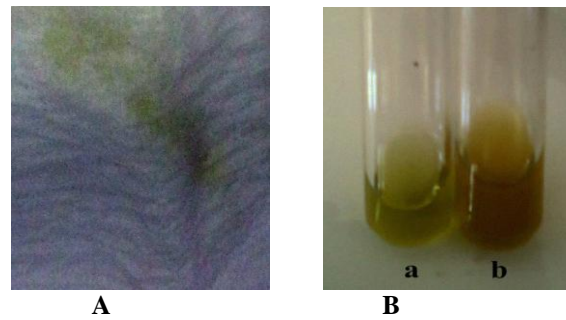
B. Identifikasi Senyawa Kimia dalam Fraksi *n*-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa

Identifikasi terhadap golongan senyawa yang terdapat pada fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa dilakukan secara kualitatif terhadap senyawa yang diduga dapat tersari dalam *n*-heksana. Senyawa yang dapat tersari dalam pelarut beberapa penelitian pelarut *n*-heksana mampu menyari senyawa kumarin (Djamil, *et al*, 2006).

Hasil identifikasi dengan pereaksi kimia menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa positif mengandung kumarin (Gambar 7) dan flavonoid (Gambar 8).

Hasil positif adanya kumarin ditandai dengan adanya fluoresensi kuning kehijauan (Gambar 7). Fluoresensi yang terjadi disebabkan oleh adanya proses fototransformasi dari bentuk asam *cis*-hidroksinamat (III) yang tidak

berfluoresensi ke bentuk asam *trans*-hidroksinamat yang berfluoresensi (Erniwati, 2005). Hasil positif adanya flavonoid ditandai dengan intensitas warna kuning kecoklatan yang lebih pekat dari warna kuning semula dengan penambahan FeCl_3 (Gambar 8). Terbentuknya intensitas warna tersebut disebabkan oleh adanya gugus hidroksi pada inti aromatis yang berikatan dengan Fe.



Gambar 7. Pemeriksaan Kumarin (A) dan Flavonoid (B)

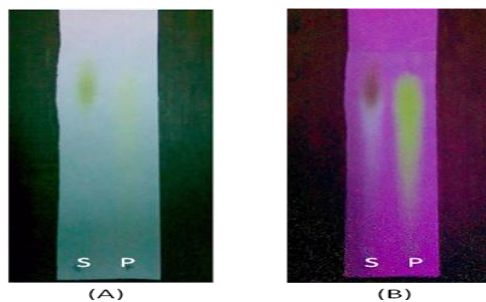
Keterangan gambar :
berfluoresensi kuning kehijauan, (a). Sampel (Kuning kehijauan)
(b). Sampel + FeCl_3 (Orange)

Identifikasi flavonoid dengan kromatografi kertas menunjukkan adanya bercak yang berwarna kuning kehijauan pada sampel fraksi uji, pengamatan dilakukan secara visibel (Gambar 9(A)). Warna kuning yang terbentuk pada kromatogram ini menunjukkan adanya flavonoid. Pengamatan di bawah sinar UV λ_{366} nm menunjukkan bercak berfluoresensi merah (Gambar 9(B)). Flavonoid dapat berfluoresensi dengan menampilkan bercak warna merah, jingga, kuning, hijau, atau biru (Markham, 1988).

Nilai *retardation factor* (Rf) dari bercak sampel fraksi uji sebesar 0,78. Jarak bercak sampel lebih tinggi dibandingkan jarak pembeding

quersetin. Hal ini menunjukkan bahwa flavonoid yang terkandung dalam fraksi uji lebih bersifat non-polar daripada quersetin. Flavonoid yang terkandung dalam fraksi uji mungkin merupakan aglikon atau isoflavon yang tidak terlalu polar, namun bila dilihat dari warna bercak, flavonoid yang terkandung dalam fraksi uji mungkin juga merupakan khalkon atau auron (Markham, 1988).

Menurut Winarsi (2005), flavonoid memiliki beberapa mekanisme sebagai antikanker yaitu menekan proliferasi sel, angiogenesis, ataupun sebagai antioksidan, yang belum dapat dibuktikan melalui penelitian ini.



Gambar 9. Kromatogram Fraksi *n*-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa dan Pembeding Quersetin

Keterangan :
(A) Pengamatan secara visibel
(B) Pengamatan di bawah sinar UV λ_{366} nm
Fase Diam : Kertas kromatografi (Kertas Whatman)
Fase Gerak : Kloroform : metanol (1:10)
S: Fraksi *n*-Heksana Ekstrak Etanol Herba Alfalfa
P: Pembeding Quersetin

KESIMPULAN

1. Fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa memiliki aktivitas sitotoksik pada sel T47D dan sel HeLa.
2. Potensi sitotoksitas fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa yang dinyatakan dengan nilai IC₅₀ pada sel T47D sebesar 523,9 µg/ml dan pada sel HeLa sebesar 503,5 µg/ml.
3. Fraksi *n*-heksana ekstrak etanol herba alfalfa mengandung kumarin dan flavonoid.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2007, *Breast Cancer, Treatment Guidelines for Patient, Version IX*, NCCN, 25.
- Anonim, 2011, *Breast Cancer Statistics*, <http://www.breastcancer.org/symptoms/understand/bc/statisticsfsp>, diakses 21 Januari 2011.
- 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.
- Castleman, M., 2001, *The New Healing Herb ; the classic guide to nature's best medicines featuring the top 100 time-tested herb*, Rodale Inc, Amerika, 57.
- CCRC, 2010, *Standard Operating Procedure*, Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., and Rosey, I. M., 2005, *Pharmacotherapy ; A Pathophysiologic Approach*, Sixth Edition, School of Pharmacy, University of Pittsburgh, 2347-2356, 2471.
- Djamil, R., Karina, D., dan Winarti, W., 2006, Studi Farmakognosi, Penapisan Fitokimia dan Uji Hayati serta BSLT dari Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.), *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 4(2): 55-59.
- Erniwati, 2005, Isolasi Kumarin Dari Daun Kayu Racun (*Rhinacantus nasutus*), *Tesis*, Prodi Kimia Program Pascasarjana Universitas Andalas, Padang.
- Harbone, J.B., 1987, *Metode Fitokimia*, diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Institut Teknologi Bandung Press, Bandung, 69-94, 142-158, 234-238.
- Hong, Y.H., Wang, S.C., Hsu, C., Lin, B.F., Kuo, Y.H., and Huang, C.J., 2011, Phytoestrogenic Compounds in Alfalfa Sprout (*Medicago sativa*) beyond Coumesterol, *J. Agric. Food. Chem.*, 59 : 131-137.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, terjemahan Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung, 1-103.
- Nafrialdi, dan Ganiswara, S., 2007, Antikanker, dalam Ganiswara, S., Setiabudy R., Suyatna, F.D., Purwastyastuti, Nafrialdi, (Eds), *Farmakologi dan Terapi*, edisi ke-5, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran UI, Jakarta, 732.
- Pradipta, I.S., Nikodemus, T.W., Susilawati, Y., 2007, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Golongan Xanton dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana*, L), *Tesis*, Fakultas MIPA, Jurusan Farmasi, Universitas Indonesia, Yogyakarta.
- Ridwan, Y., Darusman, L.K., Satrija, F., dan Andaryani, E., 2006, Kandungan Kimia Berbagai Ekstrak Daun Miana (*Coleus blumei* benth) dan Efek Anthelmintiknya Terhadap Cacing Pita Pada Ayam, *J.II.Pert.Indon*, Vol.II(2), 1-6.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R., 1990, New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening, *Journal of The National Cancer Institute*, 82(13):1107-1112.
- Tjay, T. H., dan Rahardja, K., 2007, *Obat-Obat Penting ; Kasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya*, Edisi Keenam, Cetakan Pertama, PT. Elex Media Komputindo, Jakarta, 225.
- Tjindarbumi, D., dan Mangunkusuma, R., 2002, Cancer in Indonesia, *Jpn J. Clin. Oncol.*, 32(1), S17-S21.
- Winarsi, H., 2005, *Isoflavon*, Cetakan Pertama, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 53.

Zampieri, L., Bianchi, P., Ruff, P., and Arbuthnot, P., 2002, Differential modulation by estradiol of P-glycoprotein drug resistance protein - expression in cultured MCF7 and T47D breast cancer cells, *Anticancer Res.* 22(4) : 2253-9.