

**IDENTIFIKASI KANDUNGAN SENYAWA KIMIA EKSTRAK ETANOL HERBA
ALFALFA (*Medicago sativa*, L)**

Sri Susilowati, Maulita Cut Nuria dan Agnes Budiarti
Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

ABSTRAK

Alfalfa merupakan tumbuhan yang berasal dari Iran (*Medicago sativa*, L), namun dapat tumbuh di daerah tropis seperti Indonesia. Herba alfalfa secara umum dimanfaatkan sebagai pakan ternak, karena kandungan gizinya yang tinggi antara lain : protein, lemak dan serat kasar. Selain itu, alfalfa juga berfungsi sebagai tanaman berkhasiat obat untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Tempat tumbuh dapat mempengaruhi kandungan senyawa kimia aktif dari suatu tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan identifikasi secara kualitatif dan kuantitatif dari kandungan senyawa kimia herba alfalfa dalam bentuk sediaan ekstrak etanol.

Sediaan ekstrak dibuat dengan metode perkolasi dengan pelarut etanol 96%. Identifikasi secara kualitatif dilakukan dengan pereaksi kimia yang dilanjutkan dengan Kromatografi Lapis Tipis terhadap senyawa yang diduga ada di dalam ekstrak yaitu flavonoid dan alkaloid serta kumarin. Identifikasi kuantitatif untuk senyawa flavonoid dilakukan secara spektrofotometri dengan panjang gelombang 505 nm, sedangkan alkaloid dilakukan dengan TLC densitometri dengan panjang gelombang 309 nm, dan kumarin secara TLC densitometri dengan panjang gelombang 304 nm.

Hasil penelitian diperoleh ekstrak etanol herba alfalfa dengan rendemen sebesar 13,04%, dan memiliki kandungan flavonoid dengan kadar total 8,13%, alkaloid dengan kadar 48,86 ppm dan kumarin dengan kadar 229,83 ppm.

Kata Kunci : Ekstrak etanol alfalfa, flavonoid, alkaloid, dan kumarin

PENDAHULUAN

Alfalfa merupakan tumbuhan yang berasal dari Iran. Masyarakat Arab

menyebut tanaman ini sebagai “Bapak dari makanan” (Astawan dan Kasih, 2008). Pertama kali tanaman alfalfa disebutkan

dalam buku yang ditulis Kaisar Cina pada tahun 2.939 SM. Alfalfa termasuk dalam family *Fabaceae* (suku polong-polongan). Nama latin dari Alfalfa adalah *Medicago sativa* L. Alfalfa memiliki banyak nama seperti Alfalfa, buffalo herb, lucerne, purple medic, jatt, kaba yonca, mielga, mu su, sai pi li ka dan yonja (Rahmayanti dan Sitanggang, 2006).

Herba alfalfa secara umum dimanfaatkan sebagai pakan ternak, karena kandungan gizinya yang tinggi antara lain : protein, lemak dan serat kasar. Selain itu, alfalfa juga berfungsi sebagai tanaman berkhasiat obat untuk menyembuhkan berbagai penyakit (Subantoro, 2009). Dengan melihat beberapa kandungan kimianya, alfalfa memiliki khasiat yang sangat baik untuk tubuh yakni sebagai antianemia, antiinflamasi, antiparasit, antioksidan, analgetika, detox, diuretika, pelancar ASI, pencahar, probiotik, mempercepat penyerapan gizi, regulator pH darah, dan tonikum (Rahmayanti dan Sitanggang, 2006). Alfalfa juga diketahui mengandung vitamin, mineral yang biasa digunakan pada keadaan *avitaminosis* dan *hypoprothrombinaenic purpura*, serta mempunyai efek antikanker, fungitosisik (Newall *et al.*, 1996).

Beberapa senyawa yang mampu meningkatkan antibodi dan berkhasiat sebagai antioksidan terkandung dalam alfalfa yaitu vitamin, mineral, asam amino, dan enzim. Alfalfa mengandung pigmen yaitu xanthofil (Rahmayanti dan Sitanggang, 2006). Alfalfa juga mengandung alkaloid, isoflavonoid, saponin, senyawa asam, kumarin, steroid dan kandungan karbohidrat lainnya seperti vitamin, protein, mineral, zat warna daun, dan pectin metilesterase (Newall *et al.*, 1996). Alfalfa dipercaya dapat menyembuhkan kanker (Astawan dan Kasih, 2008). Dalam *Journal of The Internasional Cancer Institutes* disebutkan bahwa alfalfa membantu menetralkan zat penyebab kanker di usus dengan mengikat zat karsinogen dalam usus besar dan membantu mempercepat eliminasi (Castleman, 2001). Menurut penelitian Hong *et al.* (2011), *Coumestrol* merupakan komponen fitoestrogen dari alfalfa.

Sekarang ini, telah ada sediaan yang terbuat dari klorofil alfalfa. Kandungan klorofil yang tinggi dalam alfalfa merupakan salah satu kehebatan alfalfa yang telah terbukti membantu memperbaiki sistem kekebalan tubuh, dan menangkap radikal bebas (Rahmayanti dan Sitanggang, 2006). Alfalfa yang tumbuh di Indonesia yang merupakan daerah tropis, kemungkinan

berbeda dengan alfalfa yang tumbuh di daerah sub tropis asalnya, terutama tentang kandungan senyawa kimianya baik secara kualitatif ataupun kuantitatif. Tempat tumbuh dapat mempengaruhi kandungan senyawa kimia aktif dari suatu tanaman. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian terhadap kandungan senyawa kimia baik secara kualitatif ataupun kuantitatif dari tanaman alfalfa yang tumbuh di daerah tropis dalam bentuk sediaan ekstrak etanol.

METODE PENELITIAN

Pembuatan ekstrak etanol herba alfalfa

Herba alfalfa dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40⁰C. Setelah kering simplisia diblender untuk mendapatkan serbuk yang halus. Pembuatan ekstrak pada penelitian ini dilakukan dengan menyari serbuk herba alfalfa menggunakan metode perkolasi. Pelarut yang digunakan etanol 96%. Serbuk herba alfalfa diletakkan dalam tabung perkolator dan mengalami penjuhan dengan etanol 96% kurang lebih selama 3 jam. Setelah simplisia jenuh kemudian dialiri dengan pelarut etanol 96% yang selalu baru, tetesan ekstrak cair (filtrat) ditampung dalam Erlenmeyer. Proses perkolasi dilakukan hingga 14 hari. Filtrat

yang diperoleh kemudian diuapkan dengan Rotary Evaporator hingga diperoleh ekstrak kental. Setelah diperoleh ekstrak kental kemudian dihitung rendemennya.

Identifikasi golongan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol herba alfalfa

Identifikasi kandungan senyawa aktif ekstrak etanol herba alfalfa dilakukan analisis kualitatif dan kuantitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis.

A. Pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif dengan KLT

Ekstrak etanol pekat ditimbang 25 mg dilarutkan dalam 10 ml etanol 80% ditotolkan pada fase diam yang sesuai untuk tiap kandungan yang akan diperiksa dan dielusi dengan fase gerak yang sesuai.

a. Uji flavonoid

Digunakan fase diam silica gel 60 F₂₅₄ dengan fase gerak BAW (*n*-butanol-acetic acid- water) (3:1:1) v/v (Wagner *et al*, 1984). Deteksi dilakukan dengan sinar UV 254, UV 366, dan uap ammonia. Sebagai pembanding digunakan quercetin (Harborne, 1987).

b. Uji Alkaloid

Digunakan fase diam silica gel 60 F₂₅₄, fase gerak Metanol-NH₄OH (100:1,5) v/v dengan deteksi UV 254 dan UV 366 serta

penyemprotan dengan Dragendorf (Harborne, 1987).

c. Uji Kumarin

Digunakan fase diam silica gel 60 F₂₅₄ dengan fase gerak toluene:eter (1:1, saturasi dengan asam asetat 10%) deteksi dengan UV 254 dan UV 366 dan deteksi dengan KOH metanolik 3% (Wagner, *et al*, 1984).

B. Pemeriksaan kandungan kimia secara kuantitatif dengan spektrofotometri untuk flavonoid dan KLT densitometry untuk alkaloid dan kumarin.

a. Uji total flavonoid

- Pembuatan kurva standar

Baku standar quercetin ditimbang 10,0 mg, ditambahkan 0,3 ml natrium nitrit 5%. Setelah 5 menit ditambahkan 0,6 ml aluminium chloride 10%, ditunggu 5 menit, ditambahkan 2 ml natrium hidroksida 1 M. di add-kan dengan aquades hingga 10 ml dengan labu takar. dipindahkan ke dalam kuvet, ditetapkan serapannya pada panjang gelombang 510 nm.

-Penetapan sampel uji total flavonoid 50 mg sampel uji ditimbang dengan seksama, dimasukkan dalam labu

didih, ditambahkan 10 ml asam klorida 2 N. Kemudian direfluks selama 30 menit dan didinginkan. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan 10 ml dietil eter, diambil fase dietil eter. Ekstraksi diulangi 2 kali. Fase dietil eter diuapkan dengan hembusan gas nitrogen hingga kering, lalu ditambahkan 0,3 ml natrium nitrit 5%. Setelah 5 menit ditambahkan 0,6 ml aluminium chloride 10%, ditunggu 5 menit, ditambahkan 2 ml natrium hidroksida 1 M. diadd-kan dengan aquades hingga 10 ml pada labu takar. Larutan tersebut dipindahkan ke dalam kuvet, ditetapkan serapan pada panjang gelombang 510 nm.

b. Penetapan kadar alkaloid equivalen

Sampel uji ditara, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml amoniak 10%, digojog. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan 1 ml kloroform, digojog, dituang ke dalam corong pisah, diambil fase kloroform, diulangi ekstraksi sebanyak 2x. Fase kloroform dicampurkan, kemudian dievaporasi, diadd-kan dengan 200 µl metanol. Dilakukan spotting sampel pada plate TLC dengan *micro syringe*,

dieluaskan hingga batas. disertakan kurva standar quinine. Dilakukan densito pada panjang gelombang 309 nm, dihitung kadar alkaloid equivalen dengan quinine.

c. Penetapan Kadar Coumarin

Sampel uji ditimbang dengan seksama, ditambahkan etanol 2 ml digojog dengan vortex, kemudian disentrifus. Fase etanol diambil, diulangi perlakuan ekstraksi pada residu sebanyak 2 kali. Kemudian fase etanol dievaporasikan diadddkan menjadi 200 μ l dengan etanol. Hasilnya ditotolkan pada plate silikagel 60 F₂₅₄, disertakan standar coumarin, dimasukkan ke dalam chamber yang telah berisi jenuh fase gerak, dieluaskan hingga batas, diangkat dan dikeringkan. Densito dilakukan pada panjang gelombang 304 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

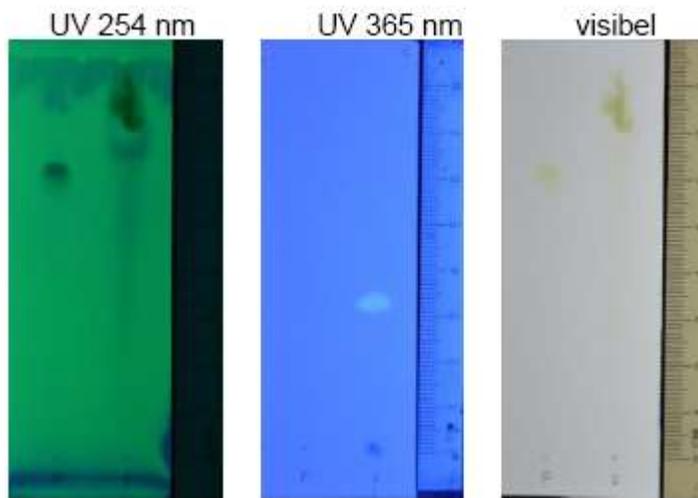
Serbuk kering herba alfalfa yang dipakai pada penelitian ini sebanyak 985 gram. Kadar air simplisia yang diperoleh 3,3 %. Ekstrak kental yang didapatkan sebanyak 124,8 gram, sehingga didapatkan rendemen ekstrak sebesar 13,04 %. Ekstrak kental yang diperoleh berwarna hijau kehitaman, memiliki bau seperti gula serta sukar untuk dituang.

Standarisasi ekstrak dilakukan melalui uji kandungan kimia dalam ekstrak etanol herba alfalfa yang dihasilkan. Uji kandungan kimia dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak kemudian dilanjutkan uji kuantitatif untuk mengetahui kadar dari kandungan senyawa aktif tersebut. Sebagai uji pendahuluan dilakukan pengujian dengan pereaksi kimia, dimana hasilnya tercantum dalam Tabel I.

Tabel I. Hasil pengujian kualitatif kandungan flavonoid dan alkaloid dalam ekstrak etanol herba alfalfa dengan pereaksi kimia

Golongan senyawa	Pengujian	Hasil
• Flavonoid	<ul style="list-style-type: none">• Ekstrak+FeCl₃• Ekstrak + Pb Asetat• Ekstrak + NaOH 0,2N	<ul style="list-style-type: none">• Ada endapan biru tua (Positif)• Ada endapan hijau (Positif)• Perubahan larutan menjadi kecoklatan (Positif)
• Alkaloid	<ul style="list-style-type: none">• Ekstrak + pereaksi Dragendorf• Ekstrak + pereaksi Mayer	<ul style="list-style-type: none">• Ada endapan coklat jingga (Positif)• Ada endapan berwarna kekuningan (Positif)

Berdasarkan hasil pengujian KLT diketahui bahwa ekstrak etanol herba alfalfa mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan kumarin (Gambar 1, 2, 3).



Gambar 1. Profil KLT hasil pengujian flavonoid dari ekstrak etanol herba alfalfa.

Keterangan :

S = Sampel: Ekstrak Etanolik Herba Alfalfa

P= Pembanding : Quercetin

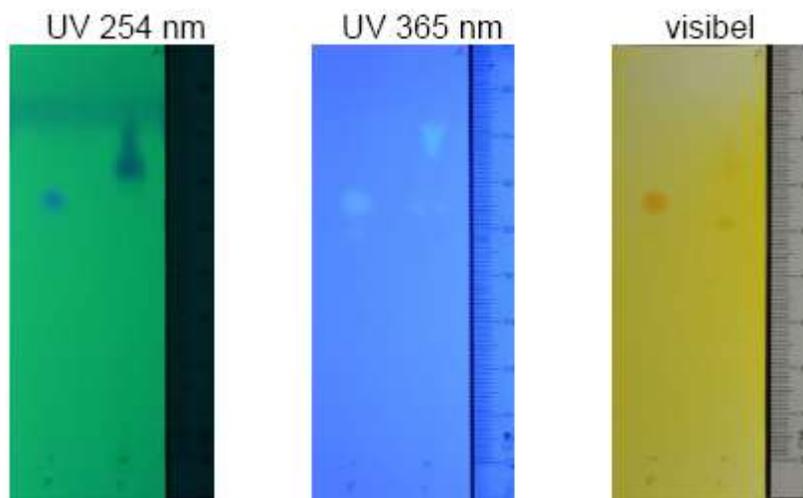
Fase diam : Silica gel 60 F₂₅₄ (Al - Sheet)

Fase gerak : Butanol : Asam Asetat : Air (3:1:1)

Deteksi : Amoniak

Warna spot flavonoid di visibel : kuning

Rf. flavonoid terdeteksi : 0,88



Gambar 2. Profil KLT hasil pengujian alkaloid dari ekstrak etanol herba alfalfa.

Keterangan:

S= Sampel : Ekstrak Etanolik Herba Alfalfa

P = Perbandingan: Quinine

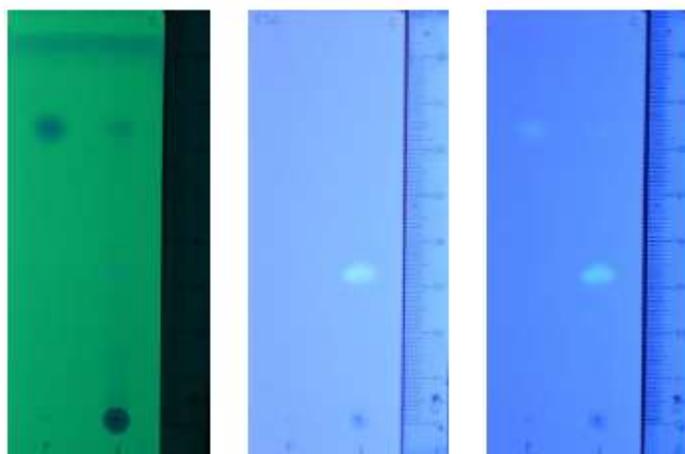
Fase diam: Silica gel 60 F₂₅₄ (Al - Sheet)

Fase gerak : Metanol – Amoniak (100:1,5)

Deteksi : Dragendorff

Warna spot alkaloid di visibel : kuning orange

Rf alkaloid terdeteksi : 0,61



Gambar 3. Profil KLT hasil pengujian kumarin dari ekstrak etanol herba alfalfa.

Keterangan :

S = Sampel : Ekstrak Etanolik Herba Alfalfa

P = Perbandingan: Coumarin

Fase Diam : Silicagel 60 F₂₅₄ (Al - Sheet)

Fase gerak : Toluena – Ether (1-1, saturated with 10% acetic acid)

Deteksi : KOH Metanolik 3%

Warna spot coumarin di UV 365 nm di visibel : biru muda

Rf. coumarin terdeteksi : 0,76

Gambar 1 memperlihatkan bercak sampel berwarna kuning setelah diuapi amonia ketika dilihat pada sinar tampak. Hal ini menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid. Gambar 2 menunjukkan kromatogram identifikasi senyawa alkaloid setelah disemprot dragendorff menunjukkan bercak berwarna kuning orange pada sinar tampak. Warna bercak ini identik dengan warna standar quinine, walaupun intensitas warnanya tidak seterang quinine. Hal tersebut menunjukkan bahwa sampel mengandung senyawa golongan alkaloid. Profil KLT untuk identifikasi kumarin (Gambar 3) menunjukkan warna bercak biru

muda pada sinar UV 365 setelah disemprot dengan KOH metanolik. Warna bercak sampel terlihat lebih terang dan sangat jelas dibandingkan standar coumarin, hal ini menunjukkan bahwa kandungan coumarin dalam ekstrak etanol herba alfalfa cukup banyak.

Hasil standarisasi ekstrak etanol herba alfalfa secara kuantitatif diperoleh kadar total flavonoid yang setara dengan kuersetin sebesar 8,13% (Tabel II), sedangkan kadar alkaloid yang setara dengan kinin sebesar 48,86 ppm (Tabel IV), dan kadar kumarin sebesar 229,83 ppm (Tabel VI).

Tabel II. Kadar Total Flavonoid dalam Ekstrak Etanol Herba Alfalfa yang Setara dengan Quersetin

Sampel	Berat sampel (g)	FP (x)	Conc. Sampel (ppm)	Flavonoid dalam sampel (ppm)	Total Flavonoid Equivalent Quercetin	Satuan
Ekstrak Etanolik Herba Alfalfa	0,05185	2	2592,5	210,757	8,13	%

Hasil penelitian secara kuantitatif menunjukkan bahwa kadar total flavonoid dalam ekstrak sebesar 8,13%. Jumlah

tersebut bisa dikatakan cukup banyak untuk suatu golongan senyawa aktif walaupun tidak dominan di dalam ekstrak tersebut.

Tabel III. Kurva baku standar Quinine

Standar (µg)	Area
1,01	22080.59
2,02	55314.01
4,04	139421.8
8,08	284680.1
16,16	497733.6

A= 2498.204
B=
31515.142
r = 0.995665

Tabel IV. Kadar Alkaloid dalam Ekstrak Etanol Herba Alfalfa yang Setara dengan Quinine metode TLC Densitometri

Sampel	Berat Sampel (g)	Vol spotting sampel (µl)	Area	Alkaloid dalam sampel (µg)	Jml Spotting Sampel (µg)	Kadar Alkaloid Equivalent Quinine (ppm)
Ekstrak Etanolik Herba Alfalfa	0,05087	20	80836,6	2,48574	5087	48,86

Kandungan alkaloid dan kumarin dalam ekstrak etanol herba alfalfa adalah 48,86 ppm dan 229,83 ppm. Bila dibandingkan dengan jumlah sampel yang sama (sekitar 0,05 gram), kadar kumarin dalam ekstrak lebih besar 4X lipat dari kandungan alkaloid. Hal ini menunjukkan bahwa alkaloid merupakan *minor compound*

dalam ekstrak karena dalam proses identifikasi ini memiliki kadar paling kecil. Kumarin merupakan golongan senyawa terbanyak kedua setelah flavonoid karena kadarnya lebih kecil dibandingkan total flavonoid. Namun, senyawa flavonoid maupun kumarin keduanya merupakan turunan senyawa fenolik di alam.

Tabel V. Kurva Baku Standar Kumarin

Standar (µg)	Area
0.808	25337.68
1.616	94610.6
3.232	283700.1
6.464	555506.9

r = 0.997486
A= -46721.899
B= 94557.99

Tabel VI. Kadar Kumarin dalam Ekstrak Etanol Herba Alfalfa dengan metode TLC Densitometri

Sampel	Berat sampel (g)	Jumlah spotting sampel (µg)	Area	Coumarin dalam sampel (µg)	Kadar Coumarin (ppm)
Ekstrak Etanolik Herba Alfalfa	0,05204	5240	67156,9	1,20433	229,83

Senyawa fenolik berupa flavonoid maupun kumarin yang ada di produk alam merupakan senyawa yang diketahui memiliki banyak aktivitas biologis seperti antibakteri, antivirus, anti kanker dan sebagainya. Maka hasil penelitian ini dapat dikembangkan lebih lanjut untuk melihat potensi herba alfalfa sebagai calon obat tradisional yang dapat bermanfaat bagi kehidupan manusia. Adanya beberapa golongan senyawa aktif seperti turunan alkaloid dan fenolik dapat digunakan sebagai dasar penelitian uji aktivitas obat di bidang farmakologi maupun bidang-bidang lainnya.

KESIMPULAN

Hasil penelitian diperoleh ekstrak etanol herba alfalfa memiliki rendemen sebesar 13,04%, dan memiliki kandungan flavonoid dengan kadar total 8,13%, alkaloid dengan kadar 48,86 ppm dan kumarin dengan kadar 229,83 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- 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*, 57, Rodale Inc, Amerika
- 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.
- Newall, A.P., 1996. *Herbal Medicines*, The Pharmaceutical Press, London, 23-24.

- Pitot, H. C., and Dragan, Y. P., 2001, Chemical Carcinogenesis, in Curtis D. Klaasen, Casarett & Doull's : *Toxicology, The Basic Science of Poisons*, 6th ed, Mc.Graw Hill. Medical Publishing Division, New York: 241-280
- Pusztai, L., Lewis, C.E., and Yap, E., 1996, *Cell Proliferation in Cancer: Regulatory Mechanisms of neoplastic Cell Growth*, Oxford University Press, New York
- Subantoro, R., 2009, Mengenal Karakter Alfalfa (*Medicago sativa L.*), *Mediagro Jurnal Ilmu Pertanian*, 5, 2, 50-62
- Winarsi, H., 2005, *Isoflavon*, Gadjah Mada University Press, Jogjakarta, 53, 58