

PENETAPAN KADAR ARTEMISININ DALAM EKSTRAK HEKSAN TANAMAN *Artemisia annua* L. MENGGUNAKAN METODE DENSITOMETRI

QUANTITATIVE ANALYSIS OF ARTEMISININ FROM HEXANE EXTRACT *Artemisia annua* L. PLANT USING DENSITOMETRY METHOD

Ani Isnawati, Indri Rooslamati

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI; Jl. Percetakan Negara, Jakarta, Indonesia

*Korespondensi Penulis: isnawatiani@yahoo.com

Submitted : 06-03-2012; Revised : 11-03-2013; Accepted : 14-03-2013

Abstrak

Penyakit malaria masih merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia karena angka kesakitan penyakit ini masih cukup tinggi. Kinin dan klorokuin masih merupakan obat malaria yang banyak digunakan masyarakat di dunia, namun telah mengalami resisten. Artemisinin dan derivatnya merupakan obat yang digunakan terhadap plasmodium yang resisten terhadap klorokuin. Artemisinin diperoleh dari ekstrak tanaman *Artemisia Annua* L. Tanaman ini berasal dari daratan China namun dapat dibudidayakan di BPTO Tawangmangu. Penetapan kadar artemisinin menggunakan metode densitometri yang telah divalidasi. Ekstraksi heksan *Artemisia annua* L dilakukan fraksinasi dengan menggunakan acetonitril. Fraksi acetonitril di uji dengan menggunakan KLT dengan fasa diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan eluen hexan: etil asetat (4:1) guna mengidentifikasi artemisinin. Pemisahan lebih lanjut dilakukan dengan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dan fase geraknya yaitu n-heksan: etil asetat (4:1). Eluat yang diperoleh diujikan pada plat KLT silika gel 60 GF₂₅₄ menggunakan eluen yang sama dengan sebelumnya. Eluat yang mempunyai Rf sama digabung menjadi satu fraksi dan ditetapkan kadar artemisinin menggunakan densitometri beserta validasi metodenya. Hasil validasi metode menunjukkan bahwa linearitas dengan koefisien korelasi 0,998, batas deteksi 0,028mg/mL dan batas kuantitasi 0,094mg/mL dan nilai simpangan baku relatif artemisinin memenuhi persyaratan untuk presisi yaitu lebih kecil dari 2%. Hasil perolehan kembali untuk artemisinin adalah 100,08%. Kadar artemisinin dalam ekstrak heksan herba *Artemisia annua* L dengan metode densitometri sebesar 0,46% dan kadar artemisinin dalam herba *Artemisia annua* L 0,02%

Kata Kunci: Artemisinin, *Artemisia annua* L, ekstrak heksan daun *Artemisia annua* L, Densitometri.

Abstract

Malaria disease is still problem health people in Indonesia, because morbidity rate is high. Kinin and Klorokuin are used by most of people in the world, but it were resistance. Artemisinin and it's derivate are used against resistance's plasmodium. Artemisinin is isolation from *Artemisia Annua* L. plant. This is Chinese original plan but is cultivated in BPTO Tawangmangu. Artemisinin content determination in heksane extract from *Artemisia annua* using validated densitometry method. Artemisinin extract can be obtained by soxletasi using hexane and then fractionation was done by using acetonitril. This acetonitril extract is concentrated by rotary evaporator and artemisinin detection use thin layer chromatography with silica gel 60 GF 254 and eluen hexan :etil acetate (4:1). Separation was done by colloumm chromatography with silica gel and eluen hexane : etil acetate (4:1). Eluat which is content artemisinin determined with the same way. Eluat with same Rf is fused and determination content using validated densitometry method. The validation result showed that linieritas with correlation coefficient is 0,9998, detection limit is 0,028 mg/ml, detection quantitation limit is 0,094 mg/ml, and deviation relative at least 2%. Recovery result artemisinin is 100,08%. Artemisinin content in heksane extract from *Artemisia annua* L with denisitometry method is 0,0850 grm and Artemisinin content in *Artemisia annua* L plant is 0,02%

Key words: Artemisinin, *Artemisia annua* L, hexane extract *Artemisia annua* L, Densitometry method

Pendahuluan

Di Indonesia sampai saat ini penyakit malaria masih merupakan masalah kesehatan masyarakat karena angka kesakitan penyakit ini masih cukup tinggi sehingga menjadi salah satu target MDGs (*Millenium Development Goals*).¹ Kasus baru malaria di Indonesia yang dikonfirmasi dengan pemeriksaan darah tahun 2009-2010 adalah 22,9%.²

Kinin adalah suatu alkaloid yang diisolasi dari kulit batang kina, merupakan obat malaria tertua dan banyak digunakan oleh sebagian besar masyarakat di dunia. Namun setelah ditemukan obat sintetik yang mempunyai struktur kimia mirip dengan kina yaitu 4-aminokinolin yaitu klorokuin, maka pemakai obat malaria mulai beralih ke obat sintetik tersebut.²

Klorokuin adalah satu dari beberapa obat yang digunakan untuk malaria sejak tahun 1934. Tetapi selama 70 tahun digunakan telah banyak mengalami resisten. WHO (*World Health Organization*) merekomendasikan ACTs (*Artemisinin Based Combination therapy*) sebagai obat malaria pengganti klorokuin.³

Artemisinin adalah metabolit sekunder yang mempunyai potensi sebagai antimalaria. Artemisinin yang terkandung di dalam tanaman *Artemisia annua* adalah suatu senyawa yang aktif sebagai obat malaria yang efektif untuk melawan strain *Plasmodium* yang resisten terhadap klorokuin. Artemisinin diekstrak dari *Artemisia annua* L. famili dari *Asteraceae* yang berasal dari Cina. Struktur artemisinin ditemukan pada tahun 1972 sebagai sesquiterpen lakton dengan ikatan endoperoksid. Berdasarkan penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa sintesa kimia artemisinin tidak efisien dan tidak ekonomis maka hingga saat ini produksi artemisinin dan derivatnya masih berasal dari tanaman yang dikultivasi.^{4,5}

Selama ini Indonesia memperoleh bahan baku artemisinin dari luar negeri dan harganya mahal, sedangkan artemisinin sangat dibutuhkan di Indonesia untuk mengatasi penyakit malaria yang masih tinggi. *Artemisia annua* berasal dari Cina tapi dapat tumbuh baik di Indonesia dan telah dibudidayakan di BPTO Tawangmangu.

Metode penetapan kadar artemisinin dapat dilakukan dengan cara TLC dan Densitometri, HPLC dengan menggunakan detektor UV, elektrokimia, *radioimmunoassay* dan *enzyme-immunosorbant assay*.

Metode KLT merupakan metode yang lebih sederhana dibanding HPLC untuk penetapan kadar senyawa aktif dari suatu ekstrak. Metode ini dihitung lebih cepat dalam preparasi dan biaya operasi yang dibutuhkan juga relatif lebih kecil walaupun sensitifitasnya kurang apabila dibandingkan dengan HPLC. Dengan penggunaan KLT penyaringan dan pemurnian ekstrak sampel lebih lanjut tidak diperlukan, ekstrak sampel langsung dapat diterapkan pada lempeng. Penetapan kadar ekstrak tanaman dengan metode densitometri perlu dilakukan dengan validasi karena penting untuk menentukan apakah suatu metode dapat memenuhi syarat penetapan kadar. Oleh karena itu maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk menentukan kadar artemisinin dalam ekstrak herba *Artemisia annua* L. yang telah dibudidayakan di BPTO Tawangmangu menggunakan metode densitometri beserta validasi metode analisisnya.

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian potong lintang dengan jenis penelitian eksperimental laboratorium terhadap ekstrak heksan herba *Artemisia annua* L. Penelitian berlangsung di laboratorium Kimia Farmasi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, pada tahun 2008.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari herba *Artemisia annua* L. dari Tawangmangu, n-hexan teknis yang didestilasi ulang, etil asetat p.a, anisaldehyd, H₂SO₄ p, asam asetat anhidrat, acetone nitril dan metanol p.a, kloroform, lempeng KLT silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck), silica gel 60

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat destilasi, soxhlet, kompor, kolom kromatografi, bejana kromatografi, beaker glass (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), corong, rotary evaporator (Buchi), klem buret, statif, penangas air, timbangan analitik, alat penotol, densitometer (Shimadzu).

Cara Kerja^{6,7,8,9}

Determinasi tumbuhan

Determinasi dilakukan di Badan Penelitian

Tanaman Obat Tawamangu Solo, Indonesia P.O. BOX 2008 Jawa Tengah, dengan menggunakan herba *Artemisia annua* L.

Sampel

Sampel adalah simplisia herba *Artemisia annua* L. diambil dari Perkebunan Tawangmangu BPTO dikumpulkan pada waktu sebelum tanaman berbunga. Umur tanaman 6 bulan ketika dipanen. Bahan simplisia yang telah bersih dikeringkan, dengan cara diangin-anginkan jangan terkena sinar matahari langsung, setelah kering simplisia disebuk dengan menggunakan blender dan diayak.

Ekstraksi

Herba *Artemisia annua* L. yang sudah di serbukkan di timbang seberat 410,80 gram kemudian di soxhlet dengan pelarut *n*-hexan sampai bening, setelah itu hasil soxhlet di pekatkan dengan menggunakan rotary evaporator.

Fraksinasi

Ekstrak heksan yang diperoleh di fraksinasi dengan acetonitril kemudian di pekatkan dengan rotary evaporator. Fraksi acetonitril yang didapat dan sisa hasil fraksinasi di uji pada plat KLT silica gel 60 GF₂₅₄ dengan eluen hexan : etil asetat (4:1) untuk mengetahui ada atau tidak senyawa senyawa artemisinin dengan menggunakan baku pembanding artemisinin.

Kromatografi kolom

Pemisahan dilakukan dengan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dan fase geraknya yaitu *n*-heksan: etil asetat (4:1). Mula-mula masukkan kapas pada dasar kolom untuk menyangga fase diamnya. Lalu fase diam (silika) disuspensikan dengan menggunakan eluen (fase gerak) sampai terbentuk bubuk silika kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Selama proses pengendapan, kolom kromatografi tersebut dapat diketuk-ketuk pada semua sisi secara perlahan-lahan agar diperoleh lapisan yang seragam. Keran dapat dibuka atau ditutup selama penambahan asal permukaan pelarut tetap diatas permukaan penyerap (fase diam/silika)

Ekstrak kental lalu ditimbang sebanyak 10,23 g dan ditimbang 10,20 gram silika gel lalu dimasukkan dalam cawan, diaduk-aduk dikeringkan diatas *water bath* sampai kering lalu digerus dan dimasukkan ke dalam kolom. Setelah itu dielusi dengan fase gerak *n*-heksan: etil asetat dengan perbandingan (4 : 1). Tiap-tiap eluat yang keluar

ditampung dengan vial 10 ml. Lalu biarkan eluat dalam vial tersebut menguap sampai didapat warna eluat yang lebih pekat dari sebelumnya. Kemudian eluat tersebut diujikan pada plat KLT silica gel 60 GF₂₅₄ E Merck dengan eluen yang sama dengan sebelumnya. Eluat yang sama *Rf*-nya kemudian digabung menjadi satu fraksi.

Validasi Metode^{10,11}

a. Pembuatan larutan validasi metode

Ditimbang 104,0 mg standar Artemisinin kemudian dilarutkan dalam metanol sampai volume 50,0 ml . Larutan ini mempunyai konsentrasi 2,08 mg/ml. Dari larutan ini kemudian pada labu ukur 10,0 ml masing-masing dipipet 6,0 ml; 5,0 ml; 4,0 ml; 3,0 ml; 2,0 ml; 1,0 ml dan diencerkan sampai garis tanda hingga didapatkan larutan dengan konsentrasi berbeda.

b. Pemilihan panjang gelombang maksimum

Larutan baku artemisinin dengan kadar 1,04 mg/ml ditotolkan sebanyak 20 µl pada lempeng KLT kemudian dielusi sepanjang 15 cm dengan menggunakan larutan pengembang heksan: etil asetat (4 : 1). Kemudian dikeringkan dan disemprot dengan anisaldehyd. Lalu dimasukkan kedalam oven suhu 60°C selama 15 menit. Diamati spektrum serapannya pada densitometer dengan menggunakan panjang gelombang 200 nm hingga 370 nm.

c. Pengujian linearitas

Larutan baku induk artemisinin dibuat dengan cara melarutkan 104 mg artemisinin baku dengan pelarut methanol pada labu ukur 50 ml sehingga diperoleh kadar 2,08 mg/mL. Dari larutan ini kemudian dipipet 6,0 ml, 5,0ml, 4,0 ml, 3,0 ml, 2,0 ml, 1,0 ml masing-masing dimasukkan padam labu ukur 10 ml lalu di encerkan dengan metanol sampai 10 ml. Sehingga masing-masing larutan memiliki kadar 1,248 mg/mL, 1,04 mg/mL, 0,832 mg/mL, 0,624 mg/mL, 0,416 mg/mL, dan 0,208 mg/mL. Masing-masing larutan ini ditotolkan 20 µl pada lempeng KLT dengan jarak titik penotolan 2,5 cm. Masing-masing kadar dilakukan penotolan sebanyak 3 kali. Lalu dilakukan eluasi dengan eluen heksan: etil asetat (4 : 1) sepanjang 15 cm. Kemudian dikeringkan dan disemprot dengan anisaldehyd lalu dipanaskan di oven pada suhu 60°C selama 15 menit. Kemudian diukur luas areanya pada panjang gelombang maksimum. Dibuat kurva kalibrasi dari persamaan garis regresi linear.

d. Presisi

• Presisi densitometer

Larutan artemisinin baku dengan kadar 1,04 mg/mL sebanyak 20 μ l ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 1 kali. Kemudian dieluasi dengan eluen heksan: etil asetat (4:1) sepanjang 15 cm. Lalu dikeringkan dan disemprot dengan anisaldehyd kemudian dipanaskan di oven pada suhu 60⁰C selama 15 menit. Diukur luas areanya sebanyak 6 kali pada panjang gelombang maksimum.

• Presisi Penotolan

Laruran artemisinin baku dengan kadar 0,416 mg/ml sebanyak 20 μ l ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 6 kali. Kemudian dieluasi dengan eluen heksan : etil asetat (4:1) sepanjang 15 cm. lalu dikeringkan dan disemprot dengan anisaldehyd kemudian dipanaskan di oven 60⁰C selama 15 menit. Diukur luas areanya 1 kali pada panjang gelombang maksimum.

e. Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi dan kuantitasi artemisinin ditentukan dengan metode perhitungan statistik berdasarkan kurva kalibrasi yang telah dibuat⁷

f. Uji perolehan kembali

Dibuat sediaan simulasi dengan menggunakan ekstrak yang tidak mengandung senyawa artemisinin (ada/tidak adanya senyawa diuji dahulu pada KLT dengan menggunakan pembanding) ditimbang ekstrak dengan seksama 50 mg sebanyak 5 kali, masing-masing dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml secara kuantitatif dengan bantuan metanol dan tambahkan 3 ml larutan baku artemisinin 2,08 mg/ml, larutan tersebut ditambah dengan metanol hingga garis tanda. Kemudian masing-masing larutan ditotolkan 20 μ l pada lempeng KLT dan dieluasi dengan heksan: etil asetat (4:1) lalu dikeringkan, disemprot anisaldehyd dan dipanaskan di oven pada suhu 60⁰C selama 15 menit. Diukur luas areanya, hasil pembacaan luas dihitung kadarnya dengan menggunakan persamaan regresi kurva linier dari larutan standar yang berada dalam satu lempeng KLT. Prosen pendapatan kembali diperoleh dengan membandingkan hasil perhitungan dengan jumlah zat yang ditotolkan.

Penentuan kadar ekstrak

Ditimbang 100mg ekstrak hasil kolom yang mengandung artemisinin sebanyak 3 kali. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml secara kuantitatif dengan bantuan metanol lalu ditotolkan 20 μ l pada lempeng KLT dan dieluasi

dengan heksan : etil asetat (4:1) sepanjang 15 cm. dikeringkan pada suhu kamar dan disemprot dengan anisaldehyd. Lalu dipanaskan didalam oven pada suhu 60⁰C selama 15 menit. Diukur luas areanya pada panjang gelombang maksimum dan dihitung kadarnya dengan menggunakan persamaan regresi kurva linier dari larutan standar.

Hasil

Hasil determinasi

Hasil determinasi yang dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO), menunjukkan bahwa tumbuhan ini termasuk ke dalam suku *Asteraceae*, marga *artemesia* spesies *Artemisia annua* L

Hasil Ekstraksi

Hasil ekstraksi herba *Artemisia annua* L. secara soxhlet dengan menggunakan pelarut n-Hexan diperoleh nilai rendamen ekstrak kental n-Hexan sebesar 4,53%. Nilai rendamen fraksi kental asetonitril sebesar 2,49%.

Hasil Pemisahan

Pada pemisahan dengan kromatografi kolom diperoleh beberapa fraksi yaitu fraksi A (1 – 12), B (13 – 24), C (25 – 56), D (57 – 62), E (63 – 83) dan F (84 – 110). Dari fraksi-fraksi tersebut diketahui pada perbandingan fase gerak n-heksan: etil asetat (4 : 1), yaitu fraksi C mengandung artemisinin



Gambar 1. Hasil uji KLT setelah disemprot dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat pada fraksi asetonitril sesudah pemisahan dengan kromatografi kolom.

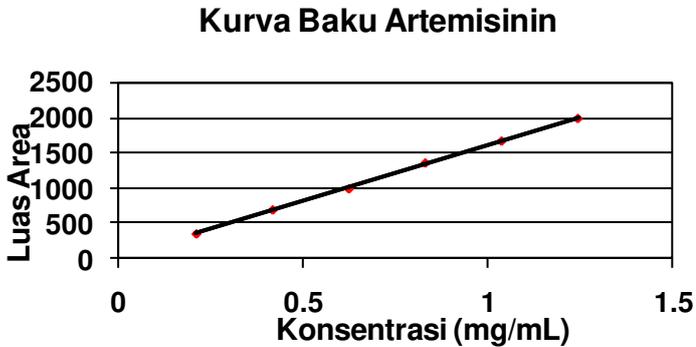
Pemilihan panjang gelombang

Hasil pengamatan spektrum absorpsi larutan standar Artemisinin pada daerah sinar tampak (200-

370 nm) Dari hasil pengamatan spektra dengan menggunakan Densitometer tersebut diperoleh panjang gelombang maksimum Artemisinin adalah 366 nm.

Validasi Metode

Pengujian Linearitas



Gambar 2. Kurva Kalibrasi Baku Artemisinin

Pengujian dilakukan pada panjang gelombang 366nm. Diperoleh persamaan kurva

kalibrasi $y = 20,26 + 1587,86x$ dengan koefisien korelasi $r = 0,998$.

Presisi

Presisi pengukuran dengan metode densitometri dan dilakukan pada panjang gelombang 366nm dengan 6 kali pengamatan diperoleh nilai RSD 0,587%.

Presisi penotolan yang dilakukan pada panjang gelombang 366nm dengan 6 kali penotolan diperoleh nilai RSD 0,268%.

Penentuan batas deteksi dan kuantitasi

Dari hasil perhitungan berdasarkan data yang diperoleh dari pengujian linearitas, diketahui batas deteksi artemisinin 0,028 mg/ml dan batas kuantitasi artemisinin 0,094 mg/mL. Data yang diperoleh untuk perhitungan LOD dan LOQ dapat diketahui pada Tabel 1

Tabel 1 Data Hasil Untuk Perhitungan LOD & LOQ

konsentrasi (mg/mL)	Luas rata-rata \bar{Y}_i	\bar{Y}_i	$(\bar{y} - y_i)^2$
0,208	347,662	350,531	8,231
0,416	689,720	680,805	79,477
0,624	990,824	1011,080	410,306
0,832	1360,380	1341,355	361,951
1,04	1673,033	1671,630	1,9684
1,248	1995,686	2001,904	38,664
			$\Sigma = 900,5974$

$$Y = a + bx$$

$$= 20,256 + 1587,85303 x$$

$$r = 0,99976$$

$$S\left(\frac{y}{x}\right)^2 = \frac{\Sigma(y_i - \bar{y}_i)^2}{N - 2}$$

$$= \frac{900,597}{6 - 2}$$

$$= 225,149$$

$$\frac{Sy}{x} = \sqrt{225,149}$$

$$= 15,005$$

$$LOD = 3 \times \frac{SD}{b}$$

$$= 3 \times \frac{15,005}{1587,859}$$

$$= 0,0208 \text{ mg / mL}$$

$$LOQ = 10 \times \frac{SD}{b}$$

$$= 10 \times \frac{15,005}{1587,859}$$

$$= 0,0944 \text{ mg / mL}$$

Perolehan Kembali

Persen perolehan kembali ditentukan dengan menggunakan ekstrak yang tidak mengandung artemisinin yang ditambahkan dengan artemisinin baku yang kemudian dihitung persen perolehan kembalinya dengan menggunakan persamaan kurva linier memperoleh hasil rata-rata perolehan kembali 101,08% dan nilai RSD= 0,15%.

Adapun data hasil validasi semua parameter dapat diketahui pada Tabel 2.

Tabel 2. Data Hasil Validasi Metode Analisis

Parameter	Syarat	Hasil
Presisi Eluasi	RSD ≤ 2 %	0,270 %
Presisi Densitometer	RSD ≤ 2 %	0,587 %
Linieritas	≥ 0,997	0,9997
Akurasi	80-110 %	101,08 %
Recovery	80-110 %	101,08 %

Penetapan Kadar

Penetapan kadar pada ekstrak dilakukan secara triplo dihitung berdasarkan persamaan kurva linearitas.

Tabel 3. Data Penetapan Kadar Artemisinin dalam Fraksi Acetonitril

No	Konsentrasi fraksi (mg/mL)	Luas area	Berat Artemisinin (mg/mL)	Konsentrasi artemisinin dalam fraksi (%)
1	10,59	3462,232	2,1678	20,47
2	12,21	3984,643	2,4967	20,45
3	12,75	4168,177	2,6123	20,49
Rata-rata				20,47

Berat fraksi hasil kolom = 414,97 mg

Berat artemisinin dalam fraksi hasil kolom

$$= 20,47\% \times 414,97$$

$$= 84,9444 \text{ mg}$$

$$= 0,0850 \text{ gram}$$

Berat artemisinin dalam 410,80 gr simplisia = 0,0850 gr

$$\begin{aligned} \text{Prosentase artemisinin didalam simplisia} &= \frac{0,0850}{410,80} \times 100\% \\ &= 0,02\% \end{aligned}$$

Pembahasan

Herba *Artemisia annua* L. yang digunakan untuk penelitian ini diambil dari tanaman hasil Budidaya BPTO Tawangmangu dan telah dideterminasi. Penanganan pasca panen, herba *Artemisia annua* L. dimulai dengan membersihkan simplisia kemudian dilakukan pengeringan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terkena cahaya matahari langsung, dengan tujuan agar zat-zat berkhasiat yang terkandung didalamnya tidak rusak. Pengeringan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air simplisia guna mencegah tumbuhnya jamur yang akan menyebabkan perubahan kimia pada bahan. Setelah pengeringan dilakukan penyerbukan untuk memudahkan pelarut pengestrak menembus ke dalam membran sel, sehingga ekstraksi akan berlangsung lebih sempurna.

Metode ekstraksi yang dilakukan adalah dengan cara panas yaitu metode soxhlet. Dipilih metode soxhlet agar dapat menarik zat-zat yang berkhasiat yang ada dalam herba *Artemisia annua* L dengan lebih sempurna karena terjadi ekstraksi secara kontinyu dengan pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi bertingkat dengan dimulai dari pelarut non polar yaitu n-Hexan. Dipilih pelarut n-Hexan agar dapat menarik artemisinin, karena dalam artemisinin larut dalam n-Hexan dan etanol. Pada waktu ekstraksi pelarut diganti tiap 1 jam, bertujuan agar senyawa yang di dapat tidak rusak.

Hasil uji KLT pada ekstrak n-Hexan dan fraksi asetonitril yang dibandingkan dengan artemisinin baku diketahui mengandung senyawa artemisinin dengan bantuan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat. Syarat agar bercak / spot dapat dideteksi oleh densitometri adalah zat harus berwarna pada panjang gelombang uv yang digunakan. Namun, artemisinin tidak menunjukkan adanya warna. Untuk mengatasi hal itu, maka zat yang sudah dieluasi disemprot dengan anisaldehyd, agar dapat berwarna/dapat dideteksi pada sinar UV. Hal ini disebabkan artemisinin memiliki ikatan rangkap tak terkonjugasi, sedangkan diketahui sinar serapan UV hanya mampu menyerap suatu ikatan yang terkonjugasi atau memiliki gugus kromofor.

Oleh karena itu, pada setiap uji KLT ditambahkan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat.

Noda artemisinin yang didapat masih bercampur dengan pengotor-pengotor. Untuk melakukan pemisahan senyawa tersebut dilakukan kromatografi kolom dengan fase diam menggunakan silica gel dan menggunakan fase gerak n-Hexan:etil asetat dengan perbandingan isokratik, dipilih perbandingan isokratik karena noda yang didapat sudah jelas berdasarkan uji KLT.

Hasil pemisahan kromatografi kolom diperoleh 6 buah fraksi (A - F) dimana fraksi C mengandung senyawa artemisinin yang belum murni. Analisis kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan artemisinin baku dengan ekstrak herba *Artemisia annua* L dengan cara KLT, sedangkan untuk analisa kuantitatif dengan cara membandingkan luas area baku artemisinin dengan luas area ekstrak herba *Artemisia annua* L, sedangkan untuk mengetahui apakah metode analisa yang digunakan memberikan hasil yang dapat dipercaya maka dilakukan validasi metode analisis sehingga hasil yang diperoleh dapat dipertanggung jawabkan untuk menyimpulkan suatu hasil analisa.

Optimasi kondisi analisis secara KLT densitometri juga perlu dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum KLT densitometri yang untuk menganalisa artemisinin. Pemilihan panjang gelombang adalah salah satu pengujian yang dilakukan untuk optimasi kondisi analisis secara KLT densitometri. Dari hasil pengamatan spektrum absorpsi larutan standar artemisinin pada daerah sinar tampak (200-370 nm) diperoleh panjang gelombang maksimum artemisinin 366nm.

Linearitas untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi artemisinin dengan luas area dibawah kurva dihitung dan hasil percobaan diperoleh hasil $Y = 20,256 + 1587859x$, koefisien korelasi sebesar 0,9998. syarat harga koefisien korelasi untuk bahan aktif obat adalah $\geq 0,997$ sehingga hasilnya dapat diterima.^{10,11}

Presisi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian ditetapkan secara berulang. Presisi dinyatakan dalam simpangan baku [Standard Deviasi (SD)] dan simpangan Baku Relatif [Relative Standard Deviasi (RSD)], hasil percobaan simpangan baku (SD) 9,556 dan simpangan baku relatif 0,587%. Syarat untuk presisi adalah lebih kecil dari 2% (Hermi, 1997). Pada presisi penotolan dilakukan penetapan terhadap baku pembanding dan didapatkan nilai simpangan baku

(SD) 1,856 dan simpangan baku relatif 0,268%. Jadi, nilai presisi densitometer dan presisi penotolan memenuhi syarat.

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya, dilakukan penetapan terhadap 5 sampel yang telah masing-masing ditambahkan artemisinin dengan sehingga konsentrasinya 0,624mg/mL. Kemudian dihitung persen perolehan kembalinya, didapatkan kadar rata-rata 1001,08%. Rentang kesalahan yang diijinkan adalah 98%-102% sehingga persen perolehan kembali yang didapat masih memenuhi persyaratan.¹⁰

Penentuan batas deteksi dan kuantitasi dilakukan berdasarkan data yang diperoleh dari pengujian linearitas. Batas deteksi adalah batas konsentrasi terendah yang masih terdeteksi oleh alat densitometri. Sehingga dapat diketahui berapa kadar terendah yang masih dapat terdeteksi oleh densitometri, batas kuantitasi adalah konsentrasi terendah yang dapat dihitung secara kuantitatif yang masih dapat memenuhi kriteria akurasi dan presisi. Pada percobaan batas terendah yang masih dapat terdeteksi adalah 0,028mg/mL apabila kadar artemisinin lebih kecil dari 0,028mg/mL dianggap nol karena tidak dapat terdeteksi dan batas kuantitatif yang masih dapat dihitung adalah 0,094mg/mL, jadi batas yang dapat dihitung untuk analisa secara kuantitatif terhadap artemisinin adalah 0,094 mg/mL, jika kadar lebih kecil dari 0,094 mg/mL dianggap nol.¹¹

Analisa ekstrak *Artemisia* dilakukan secara triplo, masing-masing ekstrak yang telah ditimbang dan dilarutkan dengan methanol ditotolkan pada lempeng silica GF₂₅₄ kemudian dieluasi dengan heksan : etil asetat (4:1) kemudian disemprot dengan anisaldehyd dan dikeringkan dioven, lalu diukur luas areanya dengan densitometri. Perhitungan kadar dengan cara, luas area ekstrak dihitung dengan persamaan $Y = a + bx$ dari kurva baku artemisinin.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode analisa yang dapat digunakan untuk dua kepentingan, dapat digunakan untuk analisa kualitatif dengan cara membandingkan nilai R_f sampel dengan standar. Dapat pula digunakan untuk analisa kuantitatif dengan mengukur dan menghitung luas area. Pengamatan bercak untuk melakukan perhitungan luas area yang dihasilkan oleh spot dapat dilakukan dengan densitometri. Prinsip kerja alat ini adalah dengan proses pemantulan dari fotometri

resapan (*reflection-absorbtion photometry*), pemantulan dari fluorometri (*reflection fluorometri*) dan tranmisi dari fotometri resapan (*transmitan-absorbtion photometry*). Panjang gelombang yang biasa digunakan 200-700 nm.

Identifikasi bercak dilakukan dengan bantuan sinar UV, zat yang diidentifikasi dengan metode kromatografi adalah dalam bentuk molekul. hal-hal yang perlu diperhatikan agar menghasilkan spot yang bagus adalah: penotolan harus dilakukan sekecil mungkin, kadar yang ditotolkan harus sekecil mungkin, wadah untuk eluasi harus dijenuhkan dahulu agar elusi berlangsung sempurna, jarak penotolan tidak boleh terlalu dekat. Bercak hasil eluasi diusahakan harus bulat, agar diperoleh peak yang bagus, karena prinsip terekamnya peak adalah karena pemantulan energi/sinar UV oleh adanya spot.

Kadar artemisinin yang diperoleh tidak optimal karena simplisia yang digunakan adalah herba bukan hanya daun. Seperti diketahui kadar tertinggi tanaman ada dalam bagian daun dan pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom menyebabkan kadar tidak optimal karena pada proses pemurnian kemungkinan ada bagian yang hilang.

Kesimpulan

Validasi metode analisis menunjukkan linearitas yang baik dengan koefisien korelasi 0,9998, batas deteksi untuk artemisinin 0,028mg/mL dan batas kuantitasi 0,094mg/mL dan nilai simpangan baku relatif artemisinin memenuhi persyaratan untuk presisi yaitu lebih kecil dari 2%. Hasil perolehan kembali untuk artemisinin adalah 100,08 %. Berdasarkan hasil tersebut di atas maka penetapan kadar dengan metode densitometri dapat digunakan. Adapun hasil penetapan kadar artemisinin dalam ekstrak heksan herba *Artemisia annua* L adalah 0,0850 grm dan kadar artemisinin dalam herba *Artemisia annua* L. 0,02%

Daftar Pustaka

1. Potensial Contributions To The MDG Agenda From The Prespective of ICPD, Brasilia; UnFA,Ipea; 2007 (Cited 2011 May 28), Available from; <http://www.unfpa.org.br/lacodm/publicacionesa.htm>.
2. Kementerian Kesehatan RI, Riset Kesehatan Dasar, Jakarta, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2010, 292.

3. WHO, Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance, 2000-2010, 2010 (Cited 2011 may 30) Available from http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500470_eng.pdf.
4. Simon, James E, et al, *Artemisia annua L : A Promising Aromatic and Medicinal*, advances in new corps. Timber Press,1990, p 522-526
5. R.S. Bhakuni, D.C. Jain, R.P.Sharma and S. Kumar, Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current science*, vol.80 No.1,2001
6. Ewing, G.W., *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, Fifth Edition, Mc Grow – Hill Book Company, Singapore : 171 – 172,1985
7. Harbone, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*, ITB, Bandung : 1987, 147–156.
8. Jhonson, E. L. & R. Stevenson, *Dasar-Dasar Kromatografi Cair*, Terjemahan Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung :1991, 365
9. Sidik & H. Mudahar, 2000, *Ekstraksi Tumbuhan Obat. Metode dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Mutu Produksinya*. UNTAG 1945, Jakarta: 12-15.
10. Harmita, *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya*, Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok, 2004
11. Hermeni,T,*Validasi dan Verifikasi Metode Analisis*, Badan Pengawas Obat dan Makanan, Jakarta,1997