

Analisis Kuantitatif Artemisinin dari Ekstrak Metanol Tanaman *Artemisia Annua L.* Menggunakan Densitometer

Ani Isnawati, Retno Gitawati

Puslitbang Biomedis dan Farmasi

Badan Litbangkes, Depkes RI

Email: isnawatiani@yahoo.com

Abstract

Artemisinin is the best antimalaria for chloroquine resistant P. falciparum recommended by WHO in a combination therapy. Artemisinin is isolated from Artemisia annua L (family: Asteraceae) that can grow as it should be in Indonesia and has cultivated by BPTO Tawangmangu in order to self-provide for raw material antimalarial. One of the important analysis is method for measuring artemisinin concentration in extract. The method should be more rapid, accurate, and suitable with the instruments available. Measuring analysis are used to determine cultivated result and to analyze cost benefit raw material malaria medicine. The method will also be validated for accuracy, precision, selectivity, sensitivity and linearity. It is found that maximum wave length of artemisinin is 366 nm with TLC-densitometry validated method, shown a good linearity, a coefficient of correlation of 0.99976, a detection limit of 0.028 mg/mL, and a quantitative limit of 0.094 mg/mL. Artemisinin concentration obtained from methanol extract is 0.221% with a recovery concentration of 101,08%.

Key words : *Artemisinin, Artemisia annua L, Thin Layer Chromatography, Densitometry*

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit menular dan menjadi masalah kesehatan serius yang mengancam daerah tropis dan sub tropis yang menyebabkan kematian lebih dari satu juta manusia setiap tahunnya. Indonesia mempunyai angka kesakitan malaria cukup tinggi sekitar 70 juta atau 35% penduduk tinggal di daerah yang berisiko tertular malaria¹.

Penyebaran parasit malaria yang resisten terhadap klorokuin begitu cepat dan luas hampir di seluruh daerah endemik malaria yaitu kawasan Asia Tenggara, Asia Tengah, Amerika Selatan, Afrika Selatan, Afrika Barat dan Afrika Tengah².

Artemisinin merupakan pengobatan malaria terbaik untuk malaria yang telah resisten terhadap klorokuin dan kina. Artemisinin diberikan dalam bentuk kombinasi

dengan obat anti malaria lain untuk mencegah terjadinya resistensi. Obat kombinasi ini disebut terapi ACT (*Artemisinin based Combination Therapy*) yang kini merupakan pengobatan terbaik untuk malaria dan dipromosikan oleh WHO. Obat-obatan yang mengandung artemisinin telah digunakan dengan sukses di beberapa negara Afrika dan negara Asia^{2,3}.

Artemisia annua L adalah tanaman yang termasuk familia *Asteraceae* yang mengandung artemisinin yaitu suatu zat yang berkhasiat sebagai anti malaria. Penggunaan artemisinin sebagai obat anti malaria telah dibuktikan dalam penelitian di beberapa negara. Artemisinin termasuk dalam kelompok senyawa seskuiterpen laktone dengan ikatan endoperoksida internal, senyawa yang aktif sebagai obat malaria yang efektif untuk melawan strain *Plasmodium* yang resisten terhadap klo-

rokuin. Adanya resistensi galur tersebut membuat para ilmuwan berpaling kembali kepada bahan alam untuk mencari obat malaria baru^{2,3,4,5}.

Selama ini Indonesia memperoleh obat malaria artemisinin dan kombinasinya dari luar negeri dan harganya sangat mahal, sedangkan artemisinin sangat dibutuhkan di Indonesia untuk mengatasi penyakit malaria yang prevalensinya masih tinggi, *Artemisia annua* L berasal dari Cina tetapi dapat tumbuh baik di Indonesia dan telah dibudidayakan oleh B2PTO2T (Balai Besar Penelitian Tanaman Obat dan Obat Tradisional) Tawamangu. Untuk itu perlu dilakukan serangkaian penelitian dimulai dari budidaya tanaman, isolasi dan penetapan kadar artemisinin dari tanaman *Artemisia* yang dibudidayakan oleh BPTO Tawamangu dalam rangka menuju kemandirian bahan baku obat malaria. Upaya untuk menghasilkan artemisinin yang maksimal dilakukan dengan beberapa cara diantaranya melalui rekayasa budidaya tanaman, optimalisasi proses budidaya, metode optimalisasi isolasi artemisinin dan penetapan kadar artemisinin.

Metode penetapan kadar artemisinin belum ada dalam buku resmi seperti Farmakope Indonesia, dan buku resmi lainnya, karena paten artemisinin dan turunannya masih dipegang oleh industri yang memproduksinya. Dari penelusuran pustaka, diketahui hasil penelitian sebelumnya tentang penetapan kadar artemisinin berupa garis besar, tidak ada prosedur yang terinci mengenai penetapan kadar artemisinin dan turunannya. Untuk itu perlu dicoba suatu metode penetapan kadar yang cepat, akurat, mudah dan murah sesuai dengan kondisi alat yang ada dan dapat diterapkan untuk skala besar. Penetapan kadar terhadap ekstrak tanaman perlu dilakukan dengan tujuan untuk memantau kadar artemisinin dalam tanaman hasil budidaya dan untuk menilai atau memprediksi kelayakan secara ekonomi dalam memproduksi artemisinin. Metode diharapkan dapat di-

tetapkan dengan cepat, dan akurat. Akurat yang dimaksud disini adalah menetapkan kadar artemisinin tunggal bukan sebagai total artemisinin (senyawa artemisinin dan senyawa lain mirip artemisinin)

Metode

Bahan

Herba *Artemisia annua* L, baku standar Artemisinin (Aldrich), Hexan p.a, Diklormetan p.a, Etil asetat p.a, Metanol p.a, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, anisaldehyd.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat destilasi, sokhlet beserta pendingin balik, alumunium foil, vial, plastik, kertas saring, pipa kapiler, pipet tetes, batang pengaduk, timbangan analitik (Sartorius), timbangan kasar, pinset, oven, beaker glass (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), corong, rotary evaporator (Buchi), klem buret, statip, penangas air, bejana kromatografi, lempeng KLT, lampu UV 254nm dan 366nm (Camag), Densitometer Shimadzu model CS -930.

Cara Kerja

Sampel

Sampel diambil dari Balai Besar Penelitian Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawangmangu dikumpulkan pada waktu tanaman sedang berbunga dan saat bunga belum mekar. Bahan simplisia yang telah bersih dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, jangan terkena sinar matahari langsung, setelah kering simplisia disebuk dengan menggunakan blender dan diayak^{6,7,8,9,10}.

Determinasi Tumbuhan

Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian Tanaman Obat dan Obat Tradisional Tawamangu, Jawa Tengah, dengan menggunakan herba *Artemisia annua* L.

Ekstraksi

Herba *Artemisia annua* L. yang sudah diserbukkan ditimbang seberat 1100 gram kemudian disokhletasi dengan metanol sampai diperoleh tetesan bening dengan suhu diatur sedemikian sehingga ekstraksi berkisar antara 10 sampai 20 menit tiap siklus. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Untuk mengantisipasi kesulitan penetapan kadar pada proses ekstraksi, maka dilakukan fraksinasi dan melakukan pemisahan dengan cara kromatografi kolom.

Fraksinasi

Ekstrak kental metanol yang diperoleh difraksinasi dengan *n*-heksan menggunakan corong pisah, dikocok lalu dipisahkan antara lapisan *n*-heksan dari lapisan air. Lapisan air kemudian difraksinasi dengan diklormetan menggunakan corong pisah, dikocok lalu dipisahkan antara lapisan diklormetan dari lapisan air sehingga terbentuk masing-masing fraksi ekstrak. Tiap fraksi dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dilakukan identifikasi KLT untuk mengetahui ada atau tidak senyawa artemisinin pada masing-masing ekstrak dengan menggunakan baku pembanding.

Pemisahan

Pemisahan dilakukan dengan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel dan fase geraknya yaitu *n*-heksan: etil asetat secara gradien pada fraksi ekstrak kental diklormetan. Ekstrak ditimbang sejumlah 22,69 g lalu digerus dan dimasukkan ke dalam kolom. Setelah itu dielusi dengan fase gerak *n*-heksan: etil asetat dengan 3 gradient perbandingan. Tiap-tiap eluat yang keluar ditampung dengan erlenmeyer 50 ml. Lalu biarkan eluat dalam erlenmeyer tersebut menguap sampai didapat warna eluat yang lebih pekat dari sebelumnya. Kemudian eluat tersebut diujikan

pada plat KLT silika gel 60 GF₂₅₄ E Merck dengan eluen yang sama dengan sebelumnya. Eluat yang sama *Rf*-nya kemudian digabung menjadi satu fraksi.

Identifikasi Fraksi Diklormetan

Identifikasi dilakukan dengan 2 cara yaitu dengan menggunakan alat LCMS (*Liquid Chromatography Mass Spectrum*) dan KLT.

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: etilasetat (4:1). Kemudian dikeringkan dan disemprot dengan anisaldehyd. Lempeng KLT tersebut kemudian dimasukkan ke dalam oven suhu 60°C selama 15 menit dan diamati spektrum serapannya pada densitometer dengan menggunakan panjang gelombang 200 nm hingga 700 nm.

Validasi Metode Analisis^{10,11}

Pembuatan Larutan Validasi

Ditimbang sejumlah standar Artemisinin kemudian dilarutkan dalam pelarut metanol dengan konsentrasi 2,08 mg/ml. Dari larutan ini kemudian dipipet ke dalam 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 dengan metanol sampai garis tanda hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi berbeda.

Akurasi (Ketepatan atau Kecermatan)

Dilakukan penetapan kadar terhadap 6 konsentrasi baku pembanding yaitu 0,208 mg/ml; 0,416 mg/ml; 0,624 mg/ml; 0,832 mg/ml; 1,04 mg/ml; 1,248 mg/ml dengan 3 kali pengulangan. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan

Presisi

Dilakukan penetapan kadar terhadap 1 konsentrasi baku pembanding yaitu 0,624 mg/ml dibuat 6 kali pengulangan. Presisi dinyatakan dalam persen recovery nilai terukur dengan nilai yang sebenarnya. Presisi biasanya dinyatakan dalam simpangan baku atau simpangan baku relatif (RSD) adalah ukuran dari derajat kinerja ulangan dari metode analisis. Makin kecil RSD dikatakan bahwa presisi suatu metode analisis semakin baik. Nilai RSD yang dapat diterima bermacam-macam. Mulai dari lebih kecil 1%, 3%, bahkan untuk analisis diperbolehkan sampai 10%.

Linieritas

Dilakukan penetapan kadar terhadap 6 konsentrasi baku pembanding yaitu 0,208 mg/ml; 0,416 mg/ml; 0,624 mg/ml; 0,832 mg/ml; 1,04 mg/ml; 1,248 mg/ml dibuat 3 kali pengulangan. Selanjutnya masing-masing larutan tersebut di atas ditotolkan pada plat KLT sebanyak 20 µl dengan jarak 3 cm. Setelah noda dieluasi dengan eluen hexan: etil asetat (4:1) kemudian dikeringkan dan disemprot dengan anisaldehyd. Lalu dimasukkan ke dalam oven suhu 60°C selama 15 menit, kemudian diukur luas kurva area pada panjang gelombang maksimum. Kurva linier dibuat dengan menggunakan perhitungan persamaan garis regresi. Parameter-parameter di atas dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

Persamaan garis regresi : $Y = a + bx$

$$\text{Slope } (b) = \frac{\sum(X - \bar{X})(y - \bar{y})}{\sum(X - \bar{X})^2}$$

$$\text{Intersep } (a) = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

$$\text{Koefisien regresi}(r) = \frac{\sum(X - \bar{X})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(X - \bar{X})^2 \sum(y - \bar{y})^2}}$$

Sedangkan deviasi dihitung dengan rumus:
Deviasi rata - rata dari garis regresi

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{N - 2}} \text{ Dimana: } \bar{y}_i = a + b \cdot x_i$$

Standart deviasi fungsi, $(S_{x0}) = S_y/b$
Koefisien variasi fungsi $(V_{x0}) = (S_{x0}/x)$
100%

Sensitivitas (*Limit of Detection & Limit of Quantitation*)

Menghitung simpangan baku dikerjakan seperti pembuatan larutan uji (σ) dan slope atau kemiringan kurva kalibrasi baku (S). *Limit of Detection* $3,3\sigma/S$ dan *Limit of Quantitation* $= 10\sigma/S$.

Penentuan Persen Perolehan Kembali (*Recovery*)

Dibuat sediaan simulasi dengan menggunakan ekstrak yang tidak mengandung senyawa artemisinin (ada/tidak adanya senyawa diuji dahulu pada KLT dengan menggunakan baku pembanding) ditimbang ekstrak sebanyak 5 kali dengan saksama sebanyak 50 mg, masukkan 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 pada masing-masing kadar ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 20µl kemudian dikeringkan dan disemprot dengan anisaldehyd. Lalu dimasukkan ke dalam oven suhu 60°C selama 15 menit setelah itu di densitometri. Hasil pembacaan luas dihitung kadarnya dengan menggunakan persamaan regresi kurva linier dari larutan standar yang berada dalam satu lempeng KLT. Persen pendapatan kembali diperoleh dengan membandingkan hasil perhitungan dengan jumlah zat yang ditotolkan.

Penetapan Kadar

Ekstrak yang diduga mengandung Artemisinin ditimbang sebanyak lebih kurang 0,2 gram dibuat dengan 3 kali penimbangan, kemudian masing-masing dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml secara kuantitatif dengan bantuan metanol sampai tanda batas lalu ditotolkan pada plat KLT sebanyak 20 µl dengan jarak 6 cm. Setelah noda dieluasi dengan eluen hexan: etil asetat (4:1) kemudian dikeringkan dan disemprot dengan anisaldehyd. Lalu dimasukkan ke dalam oven suhu 60°C selama 15 menit, lalu dilakukan densitometri kemudian diukur luas absorban pada panjang gelombang maksimum.

Hasil Determinasi

Hasil determinasi yang dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Obat Tawamangu Jawa Tengah, menunjukkan bahwa tumbuhan ini termasuk ke dalam suku Asteraceae, genus artemesia, spesies *Artemisia annua* L

Ekstraksi

Nilai rendamen ekstrak metanol adalah 19,62%. Dari 1100 gram simplisia herba *Artemisia annua* L yang sudah dihaluskan diperoleh 215,52 gram ekstrak kental metanol.

Ekstrak kental metanol yang diperoleh kemudian dilakukan uji KLT dengan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (4 : 1).

Rendamen ekstrak metanol

$$= \frac{\text{Berat hasil ekstraksi}}{\text{Berat awal simplisia}} \times 100\%$$

$$= \frac{215,52}{1100} \text{ gram} \times 100\% = 19,62 \%$$

Hasil Pemisahan

Pada pemisahan fraksi diklormetan dengan kromatografi kolom diperoleh beberapa fraksi yaitu fraksi A (1-14), B (15-42), C (43-50), D (51-57), E (58- 61), F (62-70), G (71-84), H (85-91), I (92-114), J (115-170), K (171-190), L (191-220), M (221-245), N (221-245), O (246-274), P (275-310), Q (311-339). Dari fraksi-fraksi tersebut diketahui pada perbandingan fase gerak *n*-heksan: etil asetat (4:1), yaitu fraksi B&C mempunyai Rf yang sama dengan baku pembanding. Fraksi B dan C dijadikan satu kemudian ditimbang menghasilkan 3 gram ekstrak.

Identifikasi kualitatif kromatogram

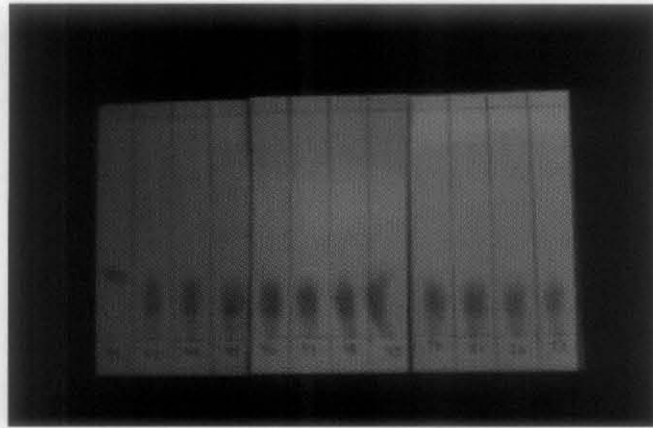
Noda kromatogram secara bersamaan dilakukan identifikasi baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Hasil identifikasi noda kromatogram dengan menggunakan KLT menghasilkan nilai Rf yang sama dengan baku pembanding seperti dapat dilihat pada Gambar 1. Cara identifikasi yang lain yaitu menggunakan LCMS (Liquid Chromatography Mass Spectrum) menghasilkan gambar spektrum sama seperti yang dihasilkan baku pembanding artemisinin dan dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3a.

Pemilihan Panjang Gelombang

Hasil pengamatan spektrum absorpsi larutan standar Artemisinin pada daerah sinar tampak (200-700 nm) ditunjukkan pada Gambar 3b. Dari hasil pengamatan spektra dengan menggunakan Densitometer tersebut diperoleh panjang gelombang maksimum Artemisinin adalah 366 nm.

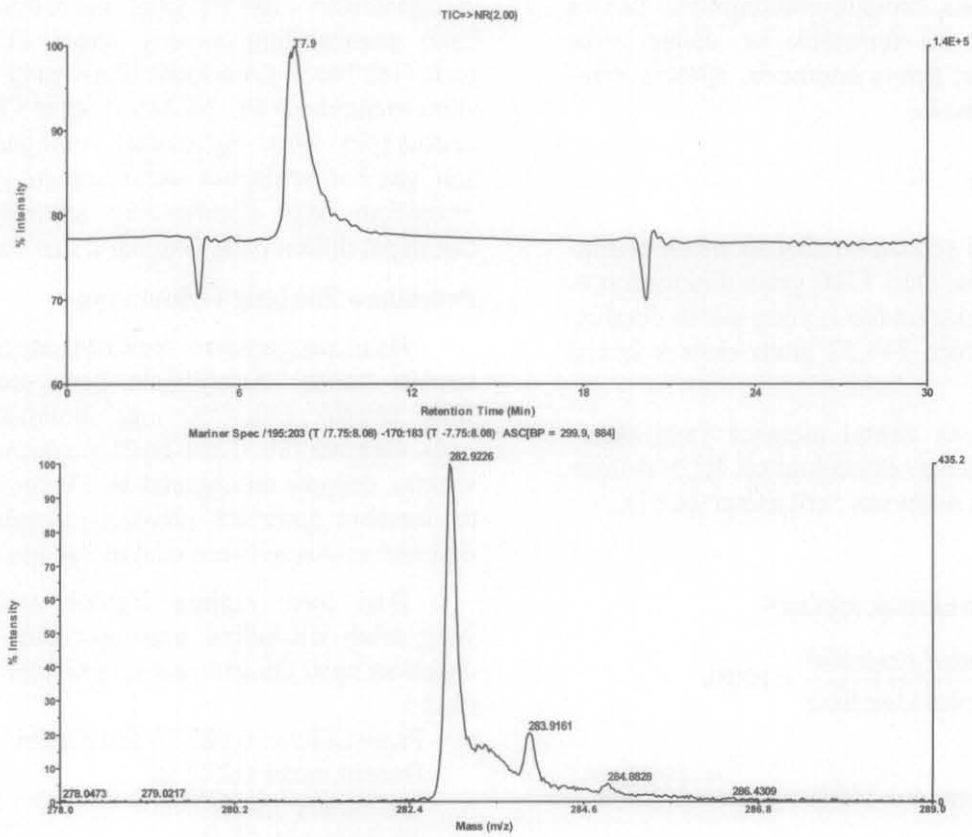
Dari hasil kelima metode analisis yang telah dilakukan masing-masing didapatkan hasil dengan rata-rata sebagai berikut :

- Presisi Eluasi 0,587 % dan presisi Densitometer 0,270 %
- Linieritas 0,9997
- Akurasi 101,08 %
- Recovery 101,08 %



Gambar 1. Hasil Uji KLT Setelah Disemprot dengan Penampak Noda Anisaldehyd-Asam Sulfat Pada Fraksi Diklormethan Setelah Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Std Artemisinin
 Vol injection 20 ul
 Flow 1 ml/min
 Eluent MeOH+Water = 80 +20
 LC MS –ESI pos ion



Gambar 2. Kromatogram Baku Standar Artemisinin

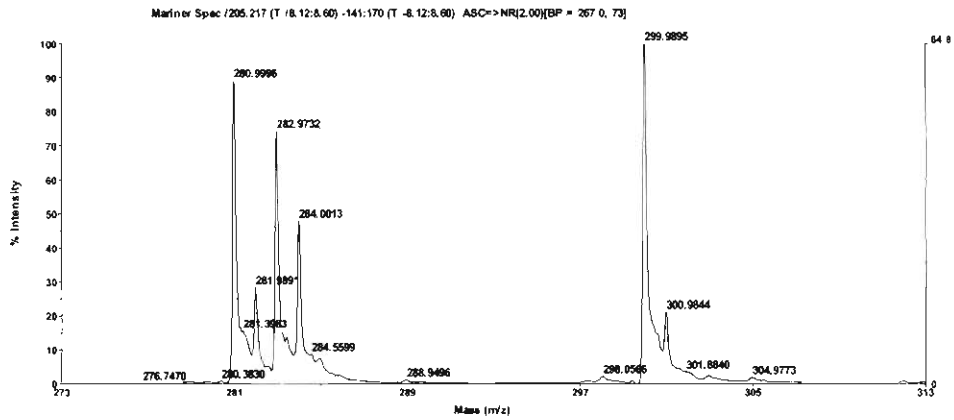
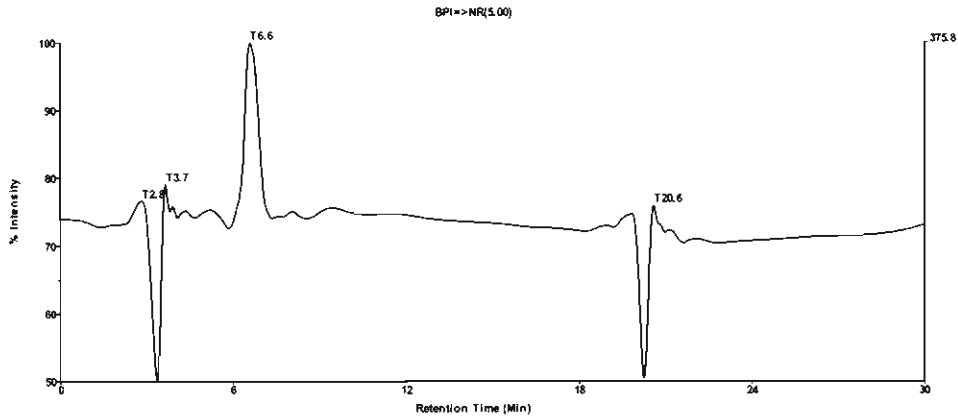
LC MS –ESI pos ion

Extract Diklormetan

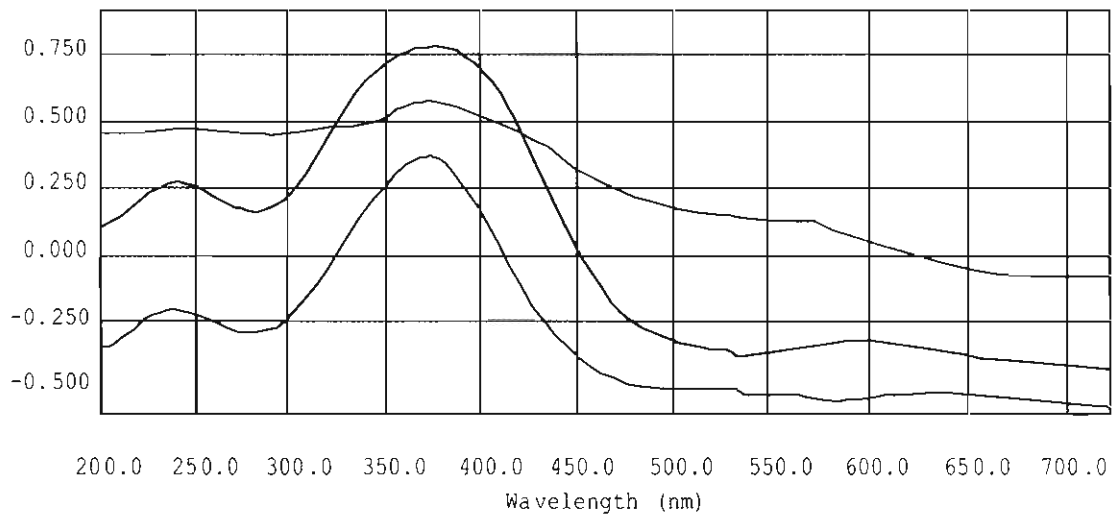
Vol injection 20 ul

Flow 1 ml/min

Eluent MeOH+Water = 80 +20

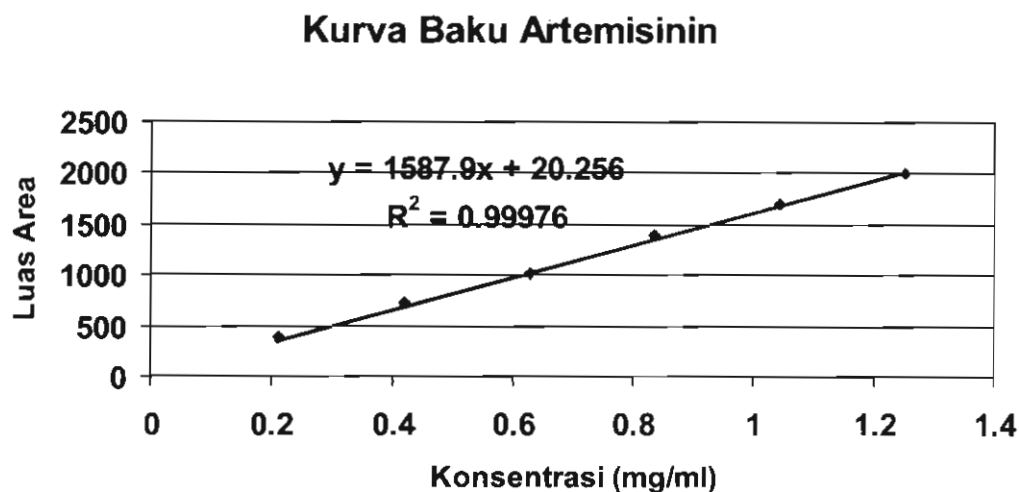


Gambar 3a. Kromatogram Fraksi Kolom Diklormethan



Gambar 3b. Spektrum Absorpsi Sinar Tampak pada Noda Standar Artemisinin.

Kurva Baku Artemisinin



Gambar 4. Kurva Baku Artemisinin

Tabel 1. Sensitivitas yang Ditunjukkan Alat Densitometer Terhadap Konsentrasi Terkecil Artemisinin (*Limit of Detection & Limit of Quantitation*)

| No | Sensitivitas | Hasil (mg/ml) |
|----|------------------------------|---------------|
| 1 | <i>Limit Of Detection</i> | 0,028 |
| 2 | <i>Limit Of Quantitation</i> | 0,0945 |

Tabel 2. Konsentrasi Artemisinin dari Fraksi B dan C Fraksi Diklormethan dari Ekstrak Metanol Herba *Artemisia annua L.*

| No | Berat Ekstrak (mg) | Konsentrasi Artemisinin dalam Ekstrak (%) |
|-------------|--------------------|---|
| 1 | 18,35 | 14,59 |
| 2 | 17,75 | 16,47 |
| 3 | 19,16 | 16,58 |
| Rata - rata | | 15,88 % |

Hasil Penetapan Kadar

Hasil 3 kali penimbangan fraksi B dan C diklormetan yang diduga mengandung senyawa Artemisinin sebesar 183,5 mg : 177,5mg : 191,6 mg kemudian masing-masing dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml secara kuantitatif dengan bantuan metanol sampai tanda batas memperoleh kadar sebagai berikut :

Perhitungan Kadar

- Berat ekstrak hasil kolom = 3 gram
- Berat Artemisinin dalam ekstrak hasil kolom = $15,88 \% \times 3$
gr
= 0,4764 gr
- Berat Artemisinin dalam 22,69 gram diklormetan = 0,4764 gr
= 2,099 %

- Berat Artemisinin dalam
1100 gram simplisia
dengan rendemen 19,52 %
= 0,4764 gram x 100/19,52
= 0,22 %

Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan herba *Artemisia annua L* yang termasuk suku *Asteraceae* yang diambil dari BBTOOT Tawangmangu dan telah dideterminasi. Tujuan determinasi agar tanaman yang akan diteliti adalah benar seperti yang dimaksud. Simplisia tersebut kemudian dibersihkan dan dilakukan pengeringan dengan cara diangin-anginkan agar tidak terkena cahaya matahari langsung, karena dikhawatirkan zat-zat berkhasiat yang terkandung di dalamnya akan rusak. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air guna mencegah tumbuhnya jamur yang dapat menyebabkan perubahan kimia pada bahan. Setelah pengeringan dilakukan penyerbukan dengan tujuan untuk memudahkan pelarut pengeksrak menembus ke dalam membran sel, sehingga ekstraksi lebih sempurna.

Penghalusan atau penyerbukan herba *Artemisia annua L* menggunakan blender atau dapat pula digunakan alat lain agar diperoleh hasil yang baik. Hal ini bertujuan untuk memudahkan pelarut pengeksrak menembus ke dalam membran sel, sehingga hasil ekstraksi lebih sempurna

Metode ekstraksi yang digunakan adalah cara panas yaitu metode sokhlet. Dipilih metode sokhlet agar dapat menarik zat-zat yang berkhasiat lebih sempurna karena terjadi ekstraksi secara kontinyu dengan pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi langsung dengan menggunakan pelarut metanol (polar). Pada waktu ekstraksi pelarut diganti tiap 1 jam, bertujuan agar senyawa yang di dapat tidak rusak. Pelarut metanol digunakan karena artemisinin dapat larut baik dalam metanol/etanol.

Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* supaya didapat ekstrak kental metanol yang kemudian difraksinasi dengan n-heksan, diklormetan, dan etil asetat. Dari ketiga fraksi hanya fraksi diklormetan yang ditemukan adanya artemisinin berdasarkan identifikasi KLT menggunakan pembanding artemisinin baku dengan bantuan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat.

Identifikasi terhadap bercak kromatogram dari hasil KLT dilakukan dengan bantuan sinar ultra violet (UV), zat yang diidentifikasi dengan metode kromatografi adalah dalam bentuk molekul sehingga hal-hal yang perlu diperhatikan adalah diupayakan menghasilkan spot yang bagus seperti: penotolan harus dilakukan sekecil mungkin, kadar yang ditotolkan harus sekecil mungkin. Syarat agar bercak/spot dapat dideteksi oleh densitometri adalah zat harus dapat berfluorosensi pada panjang gelombang yang digunakan. Berdasarkan literatur diketahui bahwa senyawa artemisinin tidak aktif terhadap 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 perlu ditambahkan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat.

Noda kromatogram ekstrak metanol dengan KLT tidak dapat memisahkan artemisinin dengan senyawa lain begitu pula dengan noda artemisinin yang didapat dari fraksinasi diklormetan masih juga bercampur dengan pengotor-pengotor/senyawa-senyawa lain, sehingga untuk melakukan pemisahan senyawa tersebut dilakukan kromatografi kolom dengan fase diam silica gel dan fase gerak n-Hexan: etil asetat dengan perbandingan gradient tertentu. Hasil pemisahan kromatografi kolom diperoleh 17 buah fraksi (A-Q) dengan fraksi B dan C digabung karena mengandung senyawa artemisinin.

Analisis kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan artemisinin baku dengan fraksi diklormetan yang telah dipisahkan dengan kromatografi kolom dari ekstrak metanol herba *artemisia annua* L menggunakan LCMS pada spektrum LCM dengan detektor massa dapat terlihat larutan belum murni, namun dengan menggunakan metode KLT maka jelas terlihat pemisahan antara artemisinin dengan senyawa lain. Adapun tujuan identifikasi ini adalah untuk menentukan bahwa noda kromatogram yang diukur benar sebagai senyawa artemisinin dan bukan senyawa lain yang tergolong. Sedangkan untuk analisis kuantitatif menggunakan metode densitometri karena mudah dilakukan, murah, dan cepat dan cara ini umum dilakukan pada penetapan kadar bahan alam. Untuk mengetahui apakah metode analisis yang digunakan memberikan hasil yang dapat dipercaya maka dilakukan validasi metode analisis sehingga hasil yang diperoleh dapat dipertanggungjawabkan untuk menyimpulkan suatu hasil analisis.

Dari hasil pengamatan spektrum absorpsi larutan standar artemisinin pada daerah sinar tampak (200-700 nm) diperoleh panjang gelombang maksimum artemisinin adalah 366nm. Linearitas untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi artemisinin dengan luas area di bawah kurva dihitung dengan persamaan $Y = a + bx$, dimana a (intersep) atau kepekaan analisis, b (slope) atau kemiringan (gambaran linearitas), dan linearitas dinyatakan dalam koefisien korelasi (r). Pada percobaan diperoleh hasil $Y = 20,256 + 1587,85903 x$, koefisien korelasi sebesar 0,9998. Syarat harga koefisien korelasi untuk bahan aktif obat adalah $\geq 0,997$ ¹¹, sehingga hasilnya dapat diterima.

Presisi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian ditetapkan secara berulang. Pada presisi densitometer dilakukan penetapan terhadap baku pembanding pada konsentrasi yang sama kemudian dilihat luas areanya pada densi-

tometer sebanyak 6 kali. Presisi dinyatakan dalam simpangan baku [Standard Deviasi (SD)] dan simpangan Baku Relatif [*Relative Standard Deviasi* (RSD)], hasil percobaan simpangan baku (SD) 9,555 dan simpangan baku relatif 0,587%. Syarat untuk presisi adalah lebih kecil dari 2%¹¹. Pada presisi penotolan dilakukan penetapan terhadap baku pembanding dengan konsentrasi yang sama kemudian dilakukan penotolan sebanyak 6 kali. Didapatkan nilai simpangan baku (SD) 1,856 dan simpangan baku relatif 0,270%. 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 6 sampel yang telah masing-masing ditambahkan artemisinin dengan konsentrasi 2,08 mg/ml, kemudian dihitung persen perolehan kembalinya, didapatkan kadar rata-rata 101,08%. Rentang kesalahan yang diizinkan adalah 98%-102%¹¹ maka persen perolehan kembali yang didapat masih memenuhi persyaratan.

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 nol¹¹.

Analisis ekstrak *Artemisia annua* L dilakukan secara triplo, masing-masing ekstrak yang telah ditimbang dan dilarutkan dengan metanol ditotolkan pada plat KLT kemudian dieluasi dengan heksan: etil asetat (4:1) kemudian disemprot dengan anisaldehyd dan dikeringkan di oven, lalu diukur luas areanya dengan densitometri. Perhitungan kadar dengan cara, luas area ekstrak dihitung dengan persamaan $Y = a + bx$ dari kurva baku artemisinin didapatkan hasil rata-rata 15,88 %, dan kadar yang terdapat pada simplisia herba *Artemisia annua* L dengan memperhitungkan rendemen sebesar 0,22%. Penetapan kadar dengan cara seperti tersebut di atas belum optimal karena pada proses fraksinasi dan pemisahan secara kolom dapat menyebabkan hilangnya artemisinin, namun jika ditetapkan kadarnya secara langsung dari ekstrak sulit untuk memisahkan antara artemisinin dengan berbagai senyawa lain yang sejenis. Dari seluruh bagian tanaman kadar artemisinin tertinggi di bagian daun (89%)⁴, sedangkan yang ditetapkan kadarnya adalah seluruh bagian tanaman (herba) dan tidak diketahui seberapa banyak bagian daun pada herba. Jika ekstraksi hanya pada daun kadar artemisinin tentunya akan lebih tinggi.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa panjang gelombang maksimum Artemisinin sebesar 366 nm. Hasil validasi metode analisis artemisinin secara KLT densitometri, menunjukkan linearitas yang baik dengan koefisien korelasi 0,99976. Batas deteksi untuk artemisinin 0,028mg/mL dan batas kuantitasi 0,094mg/mL. Nilai simpangan baku relatif artemisinin memenuhi persyaratan untuk presisi yaitu lebih kecil dari 2%. Hasil perolehan kembali untuk artemisinin adalah 101,08%. Berdasarkan hasil penelitian secara Densi-

tometri kadar artemisinin dalam ekstrak metanol herba *Art-misia annua* L sebesar 0,22 %.

Daftar Rujukan

1. Departemen Kesehatan RI, Dirjen P2MPLP, Direktorat Pemberantasan Penyakit Bersumber Binatang, *Pedoman Promosi Gebrak Malaria*, Jakarta, 2004
2. WHO, *The Use of Artemisinin & Its Derivates As Anti Malrial Drugs*, Report of a Joint CTD/DMP/TDR informal consultation, Division of Control of Tropical diseases Geneva, 1998, June 10-12.
3. University Medical Centre, Departement of Pharmacology, Laboratory of Drug Metabolism, Artemisinin and Derivatives: Recent Progress in Malaria Treatment, *Journal of Parasitic Diseases*, 1996, June, 20 (1) :65
4. Simon, James E., et al, *Artemisia annua L : A Promising Aromatic and Medicinal*, advances in new crops. Timber Press, 1990, p 522-526.
5. Webster H.K. and Lehnert E.K., 1994, *Chemistry of artemisinin: an overview*, Transaction of The Royal Society of Topical Medicine and Hygiene, Supplement I vol. 88, Australia, p 27-29.
6. Gupta, M.M., D.C. Jain, A.K. Mathur, A.K. Singh, R.K. Verma & S. Kumar, Isolation of high artemisinin acid containing plant of *Artemisia annua*. *Planta Medica* 1995, 62 : 280-281.
7. Klayman D. L., A. J. Lin, N. Acton, J.P. Scovill, J. M. Hoch, W. K. Milhous, & A. D. Theohsrides, , Isolation of artemisinin (Qinghaousu) from *artemesia annua* growing in United States. *Journal of Natural Products*, 1984, 47(4):715-717.
8. Sidik & H. Mudahar, *Ekstraksi Tumbuhan Obat*, Metode dan Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Mutu Produksinya. UNTAG 1945, Jakarta, 2000, 12-15
9. Harbone, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*, ITB. Bandung, 1987, 147-156.
10. Harmita, *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya*, Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok, 2004
11. Hermini, T., *Validasi dan Verifikasi Metode Analisis*, Badan Pengawas Obat dan Makanan, Jakarta, 1997

