

IDENTIFIKASI DAN PENETAPAN KADAR SENYAWA KUMARIN DALAM EKSTRAK METANOL *Artemisia Annu* L. SECARA KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS – DENSITOMETRI

Sukmayati Alegantina dan Ani Isnawati

Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi, Jakarta

IDENTIFICATION AND SETTING LEVEL COUMPOUNDS FOR KUMARIN IN THE METANOL EXTRACT *Artemisia Annu* L. BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY - DENSITOMETRY

Abstract. *Artemisia annua* L. contain the active compounds include: terpenoids, flavonoids, kumarin, artemisinin acid, artemisinin B, phenols, saponins, and fat. Kumarin and its derivatives have biological activity that can stimulate skin pigment, blood anticoagulation and can inhibit the effects of carcinogens. With this biological activity of kumarin, the research is done to ensure there is kumarin by identification and measure kumarin level which is contained in the *Artemisia annua* L. herb. The analysis methods include the extraction and fractionation. Identification and determination of level with Thin-Layer Chromatography (TLC) using a Densitometer CS-9301 PC. From the result of TLC identification of kumarin standard known that *Artemisia annua* L extract contain kumarin compound which marked by a blue spot fluorescence on standards and methanol extract of *artemisia annua* L. seeing under UV light at a wavelength of 366 nm with Rf value of standard and sample is 0.31, the measurement of kumarin spot with Densitometer known that kumarin concentration in the extract of *Artemisia annua* L. is 10.5 ul / ml with 105% Recovery

Keywords: *Artemisia annua* L, kumarin, TLC-Densitometry

PENDAHULUAN

Tanaman herbal mempunyai berbagai manfaat untuk penyembuhan dalam pengobatan secara tradisional karena kandungan senyawa aktif dan khasiat yang terkandung di dalamnya. Dimana setiap satu tanaman herbal memiliki banyak senyawa aktif dan berkhasiat di dalamnya seperti pada tanaman herbal *Artemisia annua* L yang memiliki kandungan senyawa terpenoid, flavonoid, kumarin, artemisinin acid, artemisinin B, fenol, saponin dan lemak. ^(1,2,3) Kumarin adalah senyawa fenol yang pada umumnya ber-

asal dari tumbuhan tinggi dan jarang sekali ditemukan pada mikroorganisme. Kumarin ditemukan hampir di setiap bagian tumbuh-tumbuhan mulai dari akar, batang, daun sampai bunga dan juga buah. ⁽⁴⁾ Kumarin banyak terdapat dalam bentuk glikosida dimana bau yang didapat dari pengeringan seperti bau jerami mencirikan terjadinya hidrolisis glikosida senyawa tersebut. Kumarin dapat dianggap suatu laktone dari suatu senyawa fenolik yaitu ortokumarin (asam orto hidroksi sinamat), apabila gugus fenoliknya terikat dengan molekul glukosa maka terbentuk glikosida yang merupakan kumarin terikat 6.

Kumarin sederhana merupakan fenilpropanoid yang mengandung cincin benzen C6 dengan rantai samping rantai alifatik C3.^(5,6) Senyawa kumarin dan turunannya banyak memiliki aktifitas biologis diantaranya sebagai antikoagulan darah, antibiotik dan ada juga yang menunjukkan aktifitas menghambat efek karsinogenik, selain itu kumarin juga digunakan sebagai bahan dasar pembuatan parfum dan sebagai bahan fluorisensi pada industri tekstil dan kertas.^(7, 8, 9)

Biosintesis kumarin (bentuk lakton) terutama konfigurasi sisinya (asam kumarinat) karena bentuk trans (asam kumarat) lebih stabil. Bentuk glikosida dapat terjadi dari trans ke cis karena adanya penyinaran matahari^(6, 5). Kumarin dan turunannya banyak memiliki aktifitas biologis diantaranya dapat menstimulasi pembentukan pigmen kulit, mempengaruhi kerja enzim, antikoagulasi darah, antimikroba dan menunjukkan aktifitas menghambat efek karsinogen.⁽⁷⁾ polisiklik sebagai senyawa turunan kumarin aktif sebagai antikarsinogen yang disebabkan hidrokarbon aromatik polisiklik karsinogen seperti 6-metil(α) piran.⁽¹⁰⁾ Kumarin dan turunannya seperti metilcoumarin dan etilcoumarin dapat digunakan dalam pengobatan dan parfum.

Kumarin terdapat dalam beberapa tanaman dengan nama yang berbeda tetapi mempunyai dasar sama (berbeda dalam gugus pengganti pada inti kumarin)^(8, 11). Kumarin berbentuk kristal keping (plat) runcing, berbau harum, dapat mencair pada suhu 68 – 70° C dan mendidih pada 297°C sampai 299° C. Kelarutan kumarin dalam 1 gram larut dalam 50 cc air mendidih, dapat juga larut dalam alkohol, kloroform, eter, larutan alkali hidroksida.^(6, 7, 12)

Dengan banyaknya manfaat dan kegunaan yang dimiliki kumarin beserta turunannya, maka dilakukan ekstraksi

untuk mengidentifikasi dan mengukur kadar dari kumarin tersebut di dalam herba *artemisia annua* L. yang mana nantinya dapat digunakan sebagai anti koagulasi darah, menghambat efek karsinogen dll.

BAHAN DAN CARA

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia herba *Artemisia annua* L. yang sudah siap untuk dipanen dan baku kumarin sebagai pembandingan. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah metanol teknis, diklorometan teknis dan diklormetan p.a. Untuk identifikasi dan penetapan kadar kumarin digunakan plat silica gel 60 GF254 E Merck dengan eluen n-hexana p.a, etil asetat p.a

Alat

Peralatan yang digunakan adalah soklet dengan pendingin balik, peralatan gelas yang biasa digunakan seperti corong pisah, erlenmeyer, labu takar, chamber sebagai wadah untuk elusidasi, penimbangan menggunakan timbangan merek Precisa XT 220 A. Untuk menarik pelarut digunakan Rotary evaporator Bu'CHI R-114 dan untuk mengeringkan ekstrak sehingga di dapat ekstrak kental digunakan Waterbath SBS, oven merk Heraeus digunakan untuk mengaktifkan plat KLT sebelum digunakan, sedangkan untuk mendeteksi hasil KLT digunakan pendeksi lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dan selanjutnya diukur kadar kumarin dengan menggunakan alat Densitometer Shimadzu CS-9301 PC.

CARA KERJA^(13, 14, 15, 16, 17)

1. Pengambilan sampel

Simplisia *Artemisia annua* L. berasal dari Balai Besar Penelitian dan

pengembangan Tanaman Obat (B2P2TO2T) Tawangmangu diambil pada waktu tanaman berbunga berumur 6 bulan, sampel dibersihkan dari kotoran, dirajang dan dikeringkan dengan cara menjemur tetapi tidak terkena sinar matahari langsung, setelah kering simplisia di-blender dan diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh sehingga diperoleh serbuk.

2. Determinasi tumbuhan

Simplisia *Artemisia annua* L. Di-determinasi di B2P2TO2T Tawangmangu Solo Jawa Tengah.

3. Preparasi sampel

a. Ekstraksi

- Sampel diekstraksi dengan menggunakan alat soklet pendingin balik menggunakan pelarut metanol dengan penggantian sehari sebanyak 2 kali sampai semua sari terekstrak, ini ditunjukkan dengan larutan yang sudah tidak berwarna lagi (bening).
- Ekstrak yang didapat kemudian dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator sampai ekstrak mengental.
- Ekstrak lalu dikeringkan dengan menggunakan waterbath pada suhu 40-45° C sampai didapat ekstrak dengan masa kental
- Ekstrak kental tersebut ditimbang dan dihitung rendemennya

b. Fraksinasi

- Ekstrak kental ditimbang lalu dilarutkan dengan menggunakan akuades hangat sampai semua ekstrak larut.
- Ekstrak yang telah larut di masukkan ke dalam corong pisah 500 ml kemudian ditambahkan

pelarut diklormetan sampai terbentuk 2 lapisan lalu dipisahkan antara fraksi diklormetan yang berwarna hijau pekat dengan fraksi metanol-air yang berwarna coklat muda. dilakukan KLT pada masing-masing fraksi.

4. Identifikasi kumarin

- Timbang dengan teliti ekstrak kental sebanyak 26.5 gram
- Ekstrak kental ditambahkan akuades hangat sampai larut, ekstrak dimasukkan kedalam corong pisah 500 ml
- Ekstrak difraksinasi dengan pelarut diklormetan kemudian dikocok sampai membentuk 2 fraksi yaitu fraksi atas metanol-air dan fraksi bawah diklormetan, endapan ekstrak.
- Larutan yang mengandung fraksi diklormetan dipekatkan menggunakan rotavapor dari fraksi sebanyak 500 ml menjadi 100 ml.
- Siapkan peralatan untuk kromatografi lapis tipis (KLT) yaitu chamber, fase diam plat silica gel GF254 dan fase gerak menggunakan campuran n-hexana dengan etil asetat secara gradien, sebelum digunakan fase diam plat silica gel GF254 di oven dahulu selama 30 menit dan fase gerak dijenuhkan kira-kira selama 1 jam sebelum dilakukan proses KLT
- Masing-masing fraksi dilakukan KLT dengan cara menginjeksikan sampel menggunakan syringe 5-50 µL pada fase diam plat silica gel GF254, lalu plat dimasukkan kedalam chamber yang telah diisi fase gerak n Hexana : etil asetat, kemudian ditutup rapat ditunggu sampai elusi selesai, proses elusidasi fase gerak dilakukan berkali-kali (1:1), (1:2), (2:1), (2:2), (3:1), (4:1), (7:2), (7:3), (8:2), (8:2)

sampai didapat hasil dimana kumarin terpisah baik, berfluorisensi dan nilai Rf sama dengan standar. Nilai Rf dapat didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal. Oleh karena itu bilangan Rf selalu lebih kecil dari 1,0.

- Identifikasi dilakukan dengan jalan membandingkan nilai Rf sampel dan bercak hasil KLT dengan Rf dan bercak dari standart.
- Fase diam hasil KLT dideteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 366 nm.

5. Recovery

- Sebanyak 10 ml larutan yang mengandung fraksi metanol-air dimasukkan kedalam corong pisah 500 ml
- Fraksi methanol-air ditambahkan 1 ml standar kumarin baku dengan konsentrasi 200 ppm difraksinasi dengan menggunakan 10 ml pelarut diklormethan p.a. kemudian dikocok sampai membentuk 2 fraksi yaitu fraksi methanol-air dan fraksi diklormethan-standar.
- Pada fraksi diklormethan dilakukan uji KLT dengan eluen hexan p.a dan etil asetat p.a. pada perbandingan 2:2
- Pada fase diam hasil KLT dideteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 366 nm.
- Lakukan pengukuran pada bercak hasil KLT dengan densitometer, hasil pengukuran dihitung dengan menggunakan rumus

C yang didapat

% perolehan kembali = ----- x 100%

C yang ditambahkan x 100%

Keterangan : C= Konsentrasi

6. Penetapan Kadar Kumarin

- Buat larutan standar dari baku kristal kumarin, ditimbang sebanyak 5 mg baku kumarin dilarutkan dengan 5 ml diklormethan p.a
- Pada fraksi diklormethan dan standar baku kumarin dilakukan uji KLT menggunakan fase diam silica gel GF 254 dan fase gerak campuran n-hexana : etil asetat dengan perbandingan 2:2.
- Sampel diinjeksikan pada plat silika gel GF254 sebanyak 50 μ L dan standar sebanyak 4 μ L, 8 μ L, 12 μ L, 16 μ L, 20 μ L, plat dimasukan kedalam chamber yang telah terisi larutan jenuh dengan posisi berdiri, ditunggu sampai proses elusi selesai, plat diangkat dan dikeringkan
- Hasil KLT dideteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 366 nm, Selanjutnya dilakukan penetapan kadar kumarin dalam sampel dengan alat densitometer.

HASIL

Determinasi

Determinasi tanaman pada penelitian ini dilakukan di B2P2T02T Tawangmangu Solo, diketahui bahwa tanaman ini termasuk ke dalam suku *Asteraceae* genus / marga *Artemisia* dan spesies *Artemisia annua*,

Ekstraksi

Ekstraksi menggunakan alat soklet dengan pendingin balik karena pada proses ini terjadi ekstraksi kontinyu dengan

jumlah pelarut yang relatif konstan dan selalu baru, ekstraksi menggunakan pelarut metanol karena metanol merupakan pelarut general sehingga senyawa aktif yang terkandung didalam tanaman herbal *artemisia annua* L. akan terekstrak semua. Hasil ekstraksi didapat sebanyak 13,7 liter ekstrak yang berasal dari 485 gram serbuk tanaman *artemisia annua* L.

Pemekatan / Penguapan

Dari proses pemekatan/penguapan di dapat ekstrak kental seberat 106,3206 gram dengan rendemen sebesar 21.92 % dari 485 gram serbuk simplisia *artemisia annua* L. (Tabel 1) .

Fraksinasi

Penarikan zat aktif kumarin dilakukan melalui proses fraksinasi dengan menggunakan diklormethan, dipilih pelarut diklormethan karena merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa kumarin dengan sempurna. Dari hasil fraksinasi di dapat 2 lapisan, lapisan atas terdapat fraksi metanol-air yang berwarna coklat dan pada lapisan bawah terdapat fraksi diklormetan yang berwarna hijau pekat. Pada fraksi diklormetan yang mengandung kumarin dilakukan analisis untuk penetapan kadar

kumarin. Sedangkan fraksi yang tidak mengandung kumarin disimpan untuk uji recovery

Identifikasi kumarin

Identifikasi kumarin dalam ekstrak *artemisia annua* L. dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar kumarin, larutan yang mengandung fraksi diklormetan, larutan yang mengandung fraksi metanol-air pada plat kromatografi lapis tipis (KLT) dengan elusidasi menggunakan fase gerak campuran n-hexana : etil asetat dengan perbandingan 2:2, sehingga didapat nilai Rf, bercak dan warna yang sama dari dari masing-masing larutan kemudian dibandingkan dengan nilai Rf bercak serta warna dari standar kumarin. Hasil deteksi dengan menggunakan lampu UV, pada KLT diketahui kumarin positif terdapat pada fraksi diklormethan karena memiliki nilai Rf, bentuk dan warna yang sama dengan larutan standar yaitu 0,31. Kumarin terdeteksi dengan flourisensi biru pada panjang gelombang 366 nm.

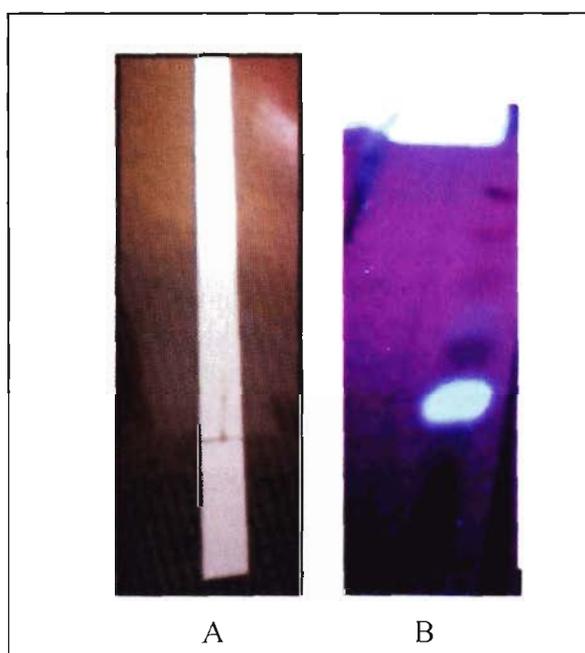
Data yang diperoleh dari hasil KLT adalah nilai Rf yang berguna untuk identifikasi senyawa (Tabel 2).

Tabel 1. Hasil Proses Pemekatan / penguapan ekstrak metanol *Artemisia annua* L.

| No | Proses | Alat yang Digunakan | Warna | Bentuk | Keterangan |
|----|-----------|---------------------|-----------------|----------------|---|
| 1 | Pemekatan | Rorary Evaporator | Hijau | Cair | sebelum dirotav ekstrak sebanyak 13,7 L |
| 2 | Pemekatan | Rotary evaporator | Hijau pekat | sedikit kental | setelah dirotav Ekstrak menjadi 1,500 L |
| 3 | Penguapan | Waterbath | Hijau pekat | Cair | sebelum di waterbath |
| 4 | Penguapan | Waterbath | Hijau kehitaman | kental | Setelah diwaterbath |

Tabel 2. Identifikasi kumarin secara Kromatografi lapis tipis dengan Pengembang n-heksan: etil asetat (2:2)

| No | Larutan | Hasil KLT pada panjang gelombang 366 nm | | Keterangan |
|----|----------------------|---|------------------|------------------------|
| | | Rf | Warna | |
| 1 | Standar baku kumarin | 0.31 | Biru flourisensi | Berbentuk bulat |
| 2 | Fraksi diklormethan | 0.31 | Biru flourisensi | Berbentuk bulat |
| 3 | Fraksi methanol-air | - | - | berbentuk bercak hitam |



Keterangan :

A = Plat kromatogram KLT tanpa disinari lampu

B = Plat kromatogram KLT dengan disinari lampu UV pada panjang gelombang 366 nm

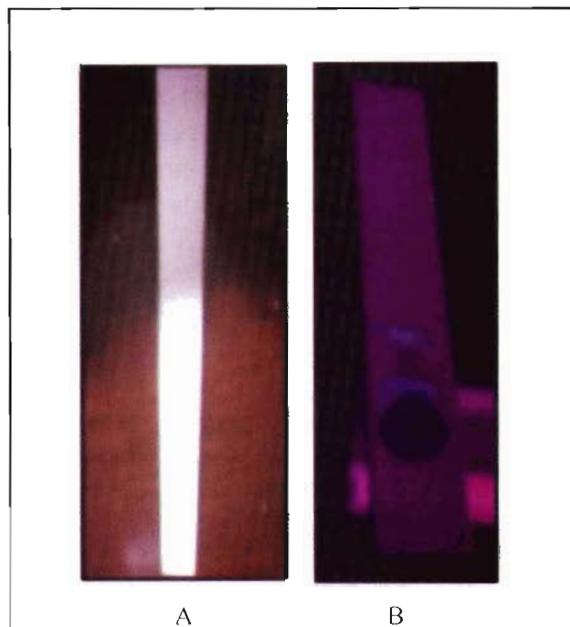
Gambar 1. Kromatogram KLT Hasil Pemisahan pada Fraksi Diklormetan

Hasil kromatogram pada fraksi diklormetan pada plat Kromatografi lapis tipis (KLT) dengan pengembang n-heksan : etil asetat pada perbandingan 2:2 tanpa penyinaran dan dengan penyinaran lampu UV pada panjang gelombang 366 nm (Gambar 1)

Hasil kromatogram pada fraksi metanol-air pada plat KLT dengan pe-

ngembang n-heksan : etil asetat pada perbandingan 2:2 tanpa penyinaran dan dengan penyinaran lampu uv pada panjang gelombang 366 nm (Gambar 2)

Hasil kromatogram standar kumarin pada plat hasil KLT dengan pengembang n-heksan : etil asetat pada perbandingan 2:2 tanpa penyinaran dan dengan penyinaran lampu uv pada panjang gelombang 366 nm (Gambar 3)

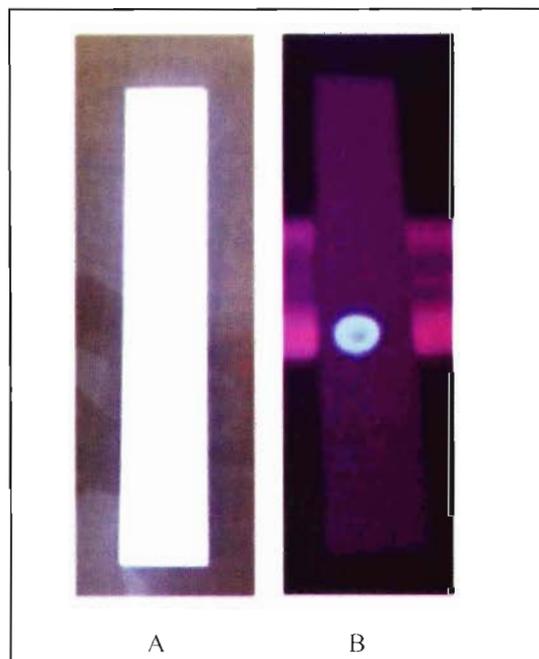


Keterangan :

A= Plat kromatogram KLT tanpa disinari lampu

B = Plat kromatogram KLT dengan disinari lampu UV pada panjang gelombang 366 nm

Gambar 2. Kromatogram KLT Hasil Pe misahan pada Fraksi metanol-air



Keterangan :

A = Plat kromatogram KLT tanpa disinari lampu

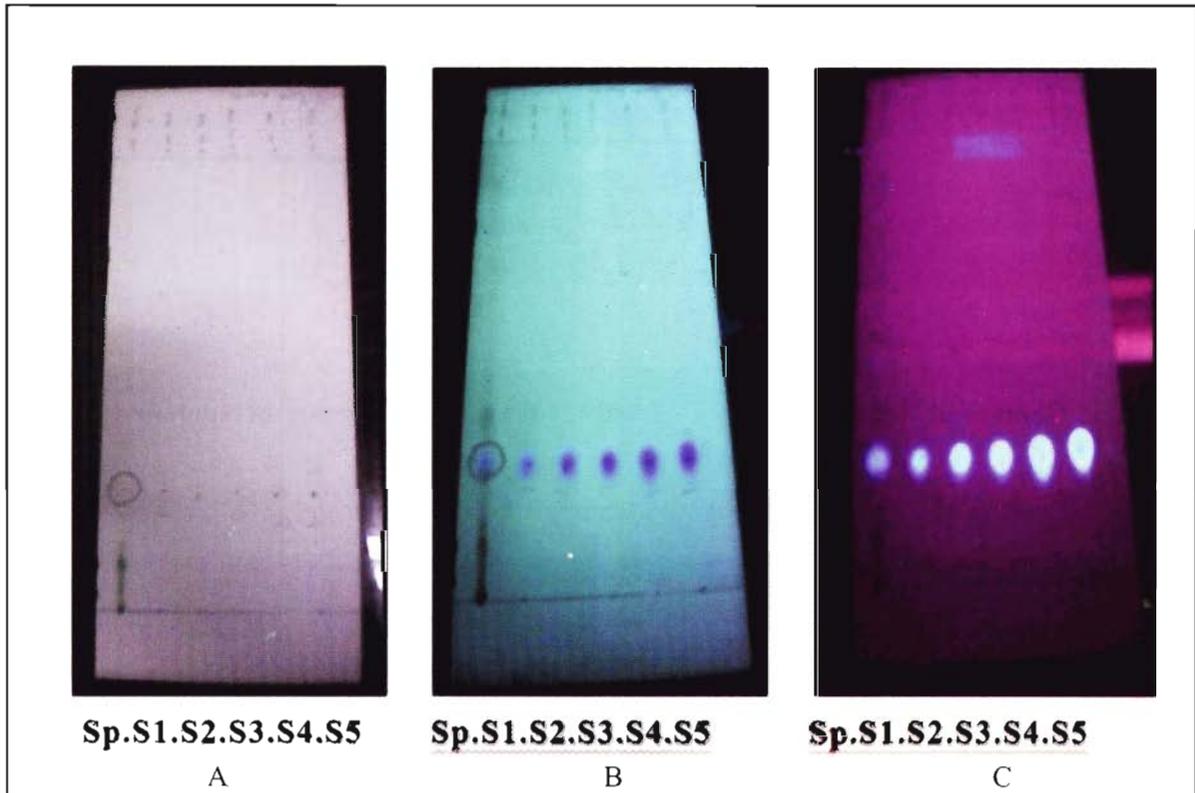
B = Plat kromatogram KLT dengan disinari lampu UV pada panjang gelombang 366 nm

Gambar 3 Kromatogram KLT pada standar baku kumarin

Jika dilihat pada Gambar 1, 2 dan 3 maka dapat diketahui bahwa senyawa kumarin terdapat pada fraksi diklormethan dengan hasil uji KLT yang dideteksi lampu UV pada panjang gelombang 366 nm dimana pada fraksi diklormethan terdapat Rf dan bercak bulat flourisensi biru yang sangat terang yang terlihat sama pada hasil uji KLT standar kumarin.

Kurva Kalibrasi

Untuk mengukur kadar kumarin dari sampel dilakukan dengan membuat kurva kalibrasi dengan cara melakukan pe-notolan sampel dan standar kumarin pada berbagai konsentrasi, hasil pada plat KLT dapat dilihat pada Gambar 4:



Gambar 4. Kromatogram KLT hasil pengukuran antara sampel (fraksi diklormethan) dengan standar baku kumarin

Keterangan :

A: Gambar pada plat kromatogram KLT tanpa disinari lampu

B: Gambar pada plat kromatogram KLT dengan disinari lampu pada panjang gelombang 245 nm

C: Gambar pada plat kromatogram KLT dengan disinari lampu

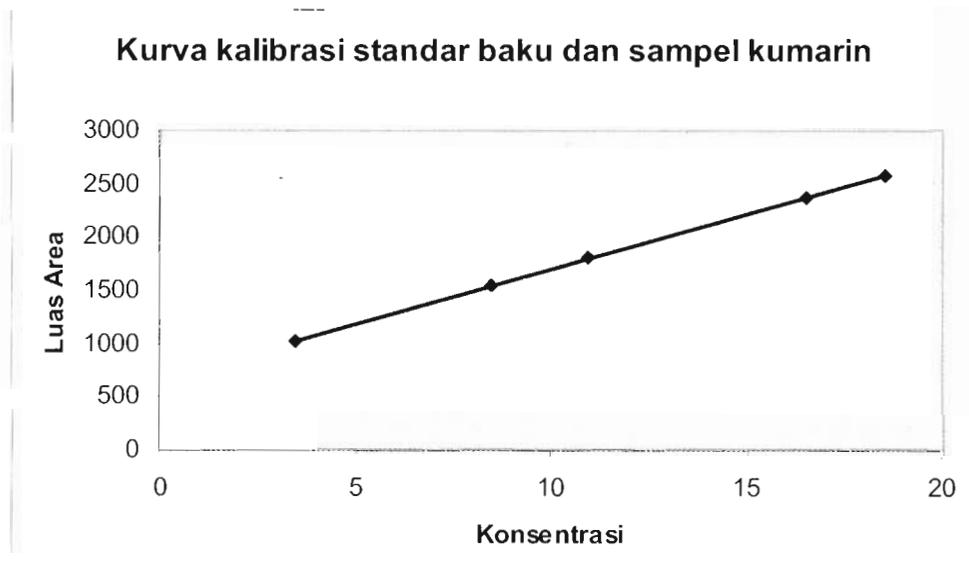
UV pada panjang gelombang 366 nm

Sp: Sampel kumarin dari ekstrak

S1,2,3,4,5: Standar 1,2,3,4,5

Tabel 3. Hasil pengukuran kadar kumarin pada plat KLT dengan pengembang n-heksan:etil asetat (2:2)

| No | Larutan | konsentrasi (ug/ml) | Luas Area | Bercak |
|----|-----------|---------------------|-----------|--------|
| 1 | Standar 1 | 4 | 1032.171 | Baik |
| 2 | Standar 2 | 8 | 1550.028 | Baik |
| 3 | Standar 3 | 12 | 1809.580 | Baik |
| 4 | Standar 4 | 16 | 2388.982 | Baik |
| 5 | Standar 5 | 20 | 2588.810 | Baik |
| 6 | Sampel | 10.5 | 1727.460 | Baik |



Gambar 5. Kurva Kalibrasi Hasil Pengukuran Kadar Kumarin pada Ekstrak Metanol *Artemisia annual*L

Dari pola kromatogram yang didapat kemudian dilakukan pengukuran dengan alat Densitometer Shimadzu CS-9301 PC di dapat luas area dari sampel dan standar kumarin yang ditunjukkan pada Tabel 3:

Dari luas area tersebut dapat dihitung konsentrasi dari sampel ekstrak artemiasia annua L. melalui ekstrapolasi kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi dapat dilihat pada Gambar 5

Dari Persamaan kurva kalibrasi didapat nilai persamaannya $A=668.2445$, $B=98.8058$, dan nilai R nya adalah 0.98

dari persamaan $y=668.2445 + 98.8058 X$ dapat diketahui kadar kumarin dari ekstrak metanol sebesar 10.5 ug/ml.

Recovery

Dari percobaan recovery yang dilakukan didapat luas Area bercak sebesar 2758.173 dari 50 ul sampel recovery yang diinjek pada plat KLT, dengan perhitungan $10.5 \times 100\%$ sehingga dapat diketahui perolehan nilai covery sebesar 105%, dapat dikatakan bahwa metode yang dipakai baik, sesuai teori metode analitik yang baik tingkat perolehan kembali 95 % - 105 %.

PEMBAHASAN

Langkah awal sebelum melakukan penelitian adalah melakukan determinasi pada setiap tanaman yang akan di teliti agar kita yakin bahwa benar tanaman tersebut sesuai dengan yang kita harapkan sehingga kesalahan pengambilan sample dapat dihindarkan, Dari hasil determinasi yang dilakukan di B2P2TOT Tawangmangu Solo, diketahui bahwa tanaman ini termasuk ke dalam suku *Asteraceae* genus / marga *Artemisia* dan spesies *Artemisia annua* L., Tanaman ini juga berasal dari BPTO Tawangmangu,

Sample herba *Artemisia annua* L. yang diambil untuk penelitian ini dipilih berdasarkan keseragaman umur, asal usul dan garis keturunan yang sama (galur tanaman terpantau) agar diperoleh hasil yang maksimal, Pengujian yang dilakukan pada tanaman herbal *Artemisia annua* L diketahui memiliki senyawa aktif kumarin yang terkandung di dalamnya. Pada *Artemisia annua* L kumarin paling banyak terdapat pada bagian bunga dan daun muda.

Sebelum digunakan simplisia dikeringkan dengan cara mengangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari langsung karena dengan pemanasan yang tinggi zat aktif di dalam simplisia akan rusak. Pengeringan dari herba *Artemisia annua* L. ini bertujuan agar kadar air dalam simplisia berkurang sehingga tidak mudah terkena jamur dan dapat bertahan lama. Setelah dilakukan pengeringan kemudian dilanjutkan dengan penyerbukan dan penghalusan dengan blender kemudian diayak dengan pengayak ukuran 40 mesh ini semua bertujuan agar ukurannya sama sehingga ketika diekstraksi semua pelarut dapat menembus/menyerap ke dalam simplisia sehingga diperoleh hasil ekstraksi yang sempurna karena pelarut dapat

menarik semua zat aktif yang ada di dalamnya.

Metode ekstraksi dilakukan dengan cara panas menggunakan alat soklet, ekstraksi dilakukan secara kontinyu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan pendingin balik, menggunakan pelarut metanol dimana pelarut tersebut merupakan pelarut general sehingga senyawa-senyawa yang terkandung di-dalamnya akan terekstraksi semua. Pada ekstraksi ini digunakan pendingin balik agar pelarut dan sample tetap terjaga temperaturnya sehingga pelarut dan senyawa yang terkandung di dalam sample tidak hilang/menguap.

Hasil ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatan dengan rotary evaporator dengan cara menarik pelarut. Dari hasil pemekatan dan penguapan dengan rotary evaporator dan water bath didapatkan rendemen ekstrak sebesar 21,92% ini artinya dalam dari 485 gram simplisia yang digunakan didapat 21,92% ekstrak metanol *artemisia annua* L.

Untuk mendapatkan larutan yang mengandung senyawa kumarin dilakukan pemisahan dengan cara fraksinasi, diperoleh 2 lapisan yaitu fraksi methanol-air yang berada pada lapisan atas dan berwarna coklat serta fraksi diklormetan yang berada pada lapisan bawah berwarna hijau pekat, penambahan diklormetan dilakukan berulang kali sampai larutan yang diperoleh dari fraksinasi terakhir bening ini menandakan semua senyawa kumarin sudah tertarik semua ke dalam fraksi diklormetan, Larutan yang mengandung fraksi diklormetan dikumpulkan dan dipekatan dengan rotary evaporator dan ekstrak diuapkan dengan water bath pada suhu 40-50⁰C agar senyawa kumarin yang ada tidak rusak dimana kumarin akan mencair bila dipanaskan pada suhu 68 – 70 ⁰C sampai didapat ekstrak kental dan

selanjutnya dilakukan identifikasi kumarin secara KLT dengan menggunakan pembanding baku kumarin.

Dari hasil identifikasi kumarin secara KLT dengan eluen n-heksan:etil asetat (2:2) didapat bercak dengan Rf dan warna baku kumarin yang sama dengan sample pada fraksi diklormetan (yang mengandung kumarin) dengan Rf sebesar 0,31 berwarna biru flourisensi yang dilihat pada lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm. Sedangkan sample pada fraksi metanol air (tidak ada kumarin) tidak terjadi pemisahan dan tidak terdapat bercak biru flourisensi hanya ada bercak hitam, ini meyakinkan kita bahwa pada fraksi methanol-air tersebut tidak mengandung senyawa kumarin dan semua senyawa kumarin telah tertarik ke dalam fraksi diklormetan

Sebelum melakukan penetapan kadar kumarin, dilakukan recovery yaitu untuk memastikan metoda yang kita gunakan baik atau tidaknya di dalam penelitian ini, Menurut literatur tingkat perolehan kembali harus berkisar 95%-105%, dari hasil recovery pada penetapan kadar kumarin didapat tingkat perolehan kembali 105% ini menandakan bahwa metoda yang digunakan sudah memenuhi standart yang ditetapkan.

Penetapan kadar kumarin menggunakan KLT menggunakan eluen n-heksan : etil asetat = 2:2 yang sebelumnya telah dilakukan pencarian eluen yang cocok sebagai pengembang agar didapat pemisahan yang baik. Dari hasil KLT kemudian dilakukan pengukuran dengan alat densitometer. Kegunaan dari pembuatan konsentrasi pembanding yang bervariasi adalah untuk mendapatkan kurva kalibrasi dari larutan pembanding tersebut kemudian dari perhitungan didapat garis regresi . Hasil pengukuran densitometer dikorelasikan

dengan garis regresi dari pembanding yang diperoleh sehingga di dapat konsentrasi kumarin dalam sample tersebut.

KESIMPULAN

1. Hasil determinasi tumbuhan diketahui bahwa tanaman tersebut termasuk dalam suku *Asteraccae*, genus/marga *Artemisia annua* L.
2. Dari hasil pemekatan dan penguapan didapatkan nilai rendemen ekstrak metanol sebesar : 21.92 %
3. Hasil pengujian identifikasi dengan KLT dengan lampu uv 366 nm didapatkan nilai Rf yang sama sebesar 0.31 dan bercak berwarna biru flourisensi yang sama antara sampel dan standar kumarin.
4. Pengukuran bercak KLT dengan densitometer didapat luas area kumarin dari sampel sebesar 1727.460 sehingga dari ekstrapolasi berdasarkan kurva kalibrasi dapat diketahui konsentrasi kumarin dari ekstrak methanol pada tanaman *Artemisia annua* L sebesar 10.5 $\mu\text{g/ml}$.
5. Nilai perolehan kembalinya (Recovery) yang didapat 105 %.

DAFTAR RUJUKAN

1. Simon, James E, et al, *Artemisia annua* L. : A Promising Aromatic and Medicinal Advances in New Corps. Timber Press, 1990, 522-526
2. 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
3. WHO, The use of Artemisinin & its Derivates as Anti Malaria Drugs, Report of a joint CTD/DMP/TDR informal Consultation, Division of Control of Tropical diseases Geneva, 1998, june 10-12

4. Murray, R.D.H., J. Mendez, and S.A. Brow.. The Natural Cumarins. Jhon Willey and Sons Ltd. New York 1982.
5. Surjadi, Harry. Artemisia Obat Malaria Terkini (on line) [http:// www.pustakatani.org /berita global Articlevie](http://www.pustakatani.org/berita_global/Articlevie)
6. Makfoeld,D. Polifenol. PAU Pangan dan Gizi, UGM, Yogyakarta 1992.
7. Harborne J.B., Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, penerbit : ITB, Bandung , 1987 ; Hal. 1 – 42. 184 – 196
8. Sutikno,A.I., dan Supriyati. Kumarin dalam daun Glicirida 1995.
9. Martindale. The Pharmacope 27. The Pharmaceutical Press 1972.
10. A nonim. Analisis Obat Tradisional, Jilid I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta , 1987.
11. A nonim, Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta 2000.
12. A nonim Farmakope Indonesia, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta 1995.
13. G ritter R.J., Bobbitt J.M., dan Schwarting A. E. Pengantar Kromatografi, penerbit : ITB, Bandung 1991.
14. R obinson T., Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi, penerbit : ITB, Bandung 1995,.
15. The universitas of Queensland. Air analyst traning manual Australia . The universitas of Queensland 1996.
16. Jo seph C.touchstone & Joseph sherma. Densitometry In thin layer chromatography practice & applications 1978.
17. Ru sman Syanti. Identifikasi pendahuluan fitokimia dan uji efek antidiare infuse herbal patikan cina (*Euphobia prostrate ait*) terhadap tikus putih jantan. Skripsi universitas pancasila 1999.