

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA KUMARIN DARI TANAMAN *ARTEMISIA ANNUA* (L).

Ani Isnawati,\* Harfia Mudahar,\* Kamilatunisah\*\*

### Abstract

The invention of new entity from plant was the basic step for chemistry and another sciences development, such as: pharmacy, biology, and medical. Besides that, it is needed to fulfill people needs on food, medicine, cosmetics, etc. Coumarine is fenilpropanoid that has biological activity to stimulate skin pigmentation, influence enzyme activity, anti coagulant, anti microbial and inhibition of carcinogenic effect. One of the plants that contain coumarine is *Artemisia annua* L, because of that we interested in isolating coumarine and it's derivate in *Artemisia annua* L with expectation that study resulted in discovering anti cancer agent. The method that we use is extraction and soxhletation using methanol and fractionation using dichloromethane. The separation was done by column Chromatography with silica gel and eluent *n*-hexane:etil acetate. Purification was done by recrystalization. Isolate is identified using KLT, GC-MS, Spectrophotometer UV, IR and NMR. This study shows that isolate was coumarine named 2H-1-Benzopyran-2-one, 7-hydroxy-6-methoxy or Scopoletin with molecular weight 192

**Keywords:** Coumarine, *Artemisia annua* L, TLC, FTIR, GC-MS, NMR

### Pendahuluan

Tumbuhan merupakan penghasil puluhan jenis senyawa organik yang digunakan sebagai sumber penghasil senyawa-senyawa berkhasiat. Penemuan senyawa-senyawa aktif baru dari tumbuhan di samping merupakan dasar untuk perkembangan ilmu kimia, juga telah memacu berkembangnya disiplin ilmu yang terkait, seperti: farmasi, biologi, kedokteran, dan ilmu yang lainnya. Kecuali itu juga dapat menghasilkan senyawa-senyawa kimia yang dapat dimanfaatkan oleh masyarakat untuk memenuhi kebutuhannya seperti bahan makanan, obat-obatan, zat pewangi, dsb.<sup>1</sup>

Pemanfaatan tumbuhan sebagai penghasil senyawa-senyawa kimia aktif baru yang unik dan potensial secara ekonomi selalu menarik perhatian ahli kimia organik dan alam, mengingat jumlah dan varietasnya yang demikian banyak. Dari

semua itu sebagian belum diketahui kandungan senyawa aktifnya. Oleh karena itu penelitian senyawa aktif yang sistematis terhadap tumbuhan perlu dilakukan dalam rangka memanfaatkan dan mengembangkan lebih lanjut senyawa tersebut.<sup>1</sup>

Kumarin merupakan golongan senyawa fenilpropanoid yang memiliki cincin lakton lingkaran enam dan memiliki inti 2H-1-benzopiran-2-on dengan rumus molekul C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>.<sup>2</sup> Kumarin dan turunannya banyak memiliki aktifitas biologis diantaranya dapat menstimulasi pembentukan pigmen kulit, mempengaruhi kerja enzim, anti-koagulan darah, antimikroba dan menunjukkan aktifitas menghambat efek karsinogen.<sup>3</sup> Di sisi lain senyawa turunan kumarin polisiklik aktif sebagai antikarsinogen yang disebabkan hidrokarbon aromatik polisiklik karsinogen seperti 6-metil ( $\alpha$ ) piran.<sup>4</sup>

\* Puslitbang Biomedis dan Farmasi

\*\* Universitas Tujuh Belas Agustus

Salah satu tanaman yang mengandung kumarin adalah *Artemisia annua* L. *Artemisia annua* L yang dikenal sebagai *sweet annie* atau *annual wormwood*. Tanaman herba asli Cina yang dikenal sebagai qinghao<sup>5</sup> ini sudah dibudidayakan di banyak negara seperti Argentina, Bulgaria, Prancis, Hongaria, Rumania, Italia, bekas Yugoslavia, Spanyol dan USA.<sup>6</sup> Tanaman ini kini herba *Artemisia annua* L telah dibudidayakan di Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu.

Dari data literatur herba *Artemisia annua* L berkhasiat sebagai antimalaria, antibakteri, anti-inflamasi, antitumor dan antipiretik, dan dinyatakan mengandung senyawa terpenoid, flavonoid, kumarin, artemisinic acid, artemisinin B, fenol, saponin dan lemak.<sup>5</sup>

Tertarik akan kandungan kimia dan aktivitas farmakologi senyawa kumarin dan turunannya, maka dilaksanakan isolasi senyawa kumarin yang terdapat pada herba *Artemisia annua* L. yang berasal dari BPTO Tawangmangu dengan harapan kedepan, kumarin hasil isolasi ini dapat diteliti untuk mengetahui efek farmakologisebagai anti-kanker.

## Bahan dan Cara

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia herba *Artemisia annua* L. yang sudah siap panen. Pelarut untuk ekstraksi digunakan metanol, *n*-heksan dan diklormetan. Selain itu, digunakan pula aqua destilata, asam sulfat pekat, asam asetat anhidrat, ammonium hidroksida, asam asetat 10%, asam klorida 2 N, alkohol, besi (III) klorida, asam klorida pekat, kalium hidroksida, logam magnesium, kalium bromida, etil asetat (didestilasi ulang), kloroform (p.a), metanol (p.a), pereaksi *mayer*, *dragendorf*, plat silica gel 60 GF<sub>254</sub> E Merck, silica gel 60.

### Alat

Peralatan yang digunakan adalah alat soxhlet beserta pendingin balik, alat destilasi, dan *rotary evaporator*, serta peralatan gelas yang lazim digunakan dalam laboratorium. Untuk keperluan identifikasi digunakan : GC-MS, Spektrofotometer UV, FT-IR, <sup>13</sup>C NMR dan <sup>1</sup>H NMR.

## Cara Kerja

### 1. Pengambilan sampel

Sampel diambil dari perkebunan BPTO Tawangmangu Solo, dikumpulkan sewaktu

tanaman berbunga umur sekitar 6 bulan. Bahan simplisia yang telah dibersihkan dari kotoran, diiris, kemudian dikeringkan dengan cara menjemur terlindung dari sinar matahari langsung dan setelah kering simplisia di serbuk dengan menggunakan blender dan diayak melalui ukuran 40 mesh.

### 2. Determinasi tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan di BPTO Tawangmangu Solo Jawa tengah.

### 3. Pemeriksaan skrining fitokimia

Pemeriksaan pendahuluan ini meliputi pemeriksaan golongan alkaloid, fenol, flavonoid, minyak atsiri, lemak/lipid, saponin, dan steroid/triterpenoid dan kumarin. Berikut ini cara kerjanya.<sup>7,8,9</sup>

#### a. Pemeriksaan Alkaloid

Alkaloid terdiri dari 2 bentuk, yaitu dalam bentuk basa larut dalam pelarut semi polar, sedangkan dalam bentuk garam larut dalam pelarut air. Ekstrak kental yang telah diencerkan dengan metanol ditambahkan HCl 2N. Jika tidak bening maka ditambahkan NH<sub>4</sub>OH + CHCl<sub>3</sub> lalu dikocok, diambil lapisan kloroform. Kedua larutan baik yang jernih maupun yang tidak jernih ditambahkan HCl 2N lalu dikocok dan diambil lapisan air kemudian dibagi dalam 3 tabung dan diuji, dengan pereaksi *mayer* terbentuk endapan putih, dengan *dragendorf* terbentuk endapan coklat/jingga, dan dengan pereaksi *bouchardad* terbentuk endapan coklat.

#### b. Pemeriksaan Fenol

Ekstrak kental yang telah diencerkan dengan metanol ditambahkan larutan Besi (III) klorida lalu amati perubahan warna. Jika terbentuk warna ungu tua menunjukkan adanya fenol.

#### c. Pemeriksaan Flavonoid

Ekstrak kental yang telah diencerkan dengan metanol ditambahkan HCl pekat dan logam Mg. Jika terbentuk busa berwarna merah atau jingga berarti positif tanin. Kemudian dinginkan dan ditambah amil alkohol, lalu dikocok. Jika warna merah dan naik keatas berarti positif flavonoid dan jika warnanya tetap di bawah positif tanin dan flavonoid.

#### d. Pemeriksaan Minyak Atsiri

Ekstrak kental yang telah diencerkan dengan metanol ditambah alkohol, sebagian larutan alkohol diuapkan dan sebagian lagi untuk identifikasi lemak. Jika larutan alkohol yang diuapkan berbau aromatis maka positif mengandung minyak atsiri.

e. Pemeriksaan Lemak/asam lemak

Larutan alkohol sisa pada identifikasi minyak atsiri diuapkan hingga kering dan dilanjutkan penyabunan dengan 10 ml kalium hidroksida 0,5 N kemudian diuapkan, jika terdapat tetesan-tetesan minyak berarti positif mengandung minyak/lemak/asam lemak.

f. Pemeriksaan Saponin

Ekstrak kental yang diencerkan dengan metanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan air panas, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 – 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang.

g. Pemeriksaan Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak kental yang telah diencerkan dengan metanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan asam asetat anhidrat, ditambah kloroform dan asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi. Jika terbentuk cincin yang berwarna hijau atau merah berarti positif terpenoid dan jika terbentuk cincin yang berwarna hijau atau biru positif steroid. Ekstrak dalam plat tetes ditambahkan asam sulfat pekat ditambah asam asetat anhidrat. Jika warna ungu merah atau coklat berarti positif terpenoid dan jika warna hijau atau biru positif steroid.

h. Pemeriksaan kumarin

Ekstrak diuapkan sampai kering tambahkan air panas dan dinginkan. Setelah dingin bagi menjadi dua tabung. Tabung I diberi ammonia 10% dan tabung II sebagai pembanding. Dilihat di bawah lampu UV, jika terdapat fluoresensi kuning kehijauan atau kebiruan berarti positif mengandung kumarin.

#### 4. Ekstraksi

Simplisia *Artemisia annua* L. yang sudah dihaluskan diekstraksi secara soxhletasi dengan metanol, tiap satu jam pelarut metanol diganti agar senyawa yang didapat tidak rusak. Semua sari terekstraksi keluar dapat dilihat pada warna ekstrak terakhir metanol tidak lagi berwarna. Ekstrak metanol yang didapatkan selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Kemudian ekstrak metanol yang didapat dihitung rendemennya.

#### 5. Pemisahan

a. Fraksinasi

Ekstrak kental metanol ditambahkan air panas kemudian difraksinasi dengan *n*-heksan menggunakan corong pisah, kocok lalu dipisahkan

antara lapisan *n*-heksan dari lapisan air. Lapisan air kemudian difraksinasi dengan diklor metan menggunakan corong pisah, dikocok lalu dipisahkan antara lapisan air dengan diklor metan. Fraksinasi dilakukan berulang kali sampai tiap-tiap fraksi terakhir yang didapat jernih. Masing-masing fraksi dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Kemudian masing-masing fraksi dilakukan KLT dengan menggunakan eluen *n*-Heksan: etil asetat dengan perbandingan (4:1), (2:1) dan (1:1).

b. Kromatografi kolom

Pemisahan kromatografi kolom dilakukan dengan fase diam silika gel dan fase geraknya yaitu *n*-heksan: etil asetat secara gradien pada ekstrak kental diklor metan.

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 penjerap (fase diam/silika).<sup>10,11,12,13,14,15</sup>

Ekstrak kental kemudian ditimbang sebanyak 22,69 g digerus bersama fase diam, dimasukkan ke dalam kolom. Setelah itu dielusi dengan fase gerak *n*-heksan : etil asetat dengan perbandingan ( 4 : 1 ), ( 2 : 1 ), dan ( 1 : 1 ). Tiap-tiap fraksi yang keluar ditampung dengan erlenmeyer 20 ml dan 50 ml. Lalu fraksi dalam erlenmeyer tersebut dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sampai didapat fraksi yang lebih pekat dari sebelumnya. Kemudian fraksi tersebut diujikan pada plat KLT silika gel 60 GF<sub>254</sub> E Merck dengan eluen yang sama dengan sebelumnya. Fraksi yang sama R<sub>f</sub>-nya kemudian digabung menjadi satu fraksi.

#### 6. Pemurnian

Kristal yang terbentuk direkristalisasi dengan menggunakan pelarut metanol - kloroform. Hal ini dilakukan berulang-ulang dengan pelarut yang dapat melarutkan senyawa tersebut sehingga diperoleh senyawa murni.

#### 7. Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

a. Secara organoleptis

Pemeriksaan ini meliputi pemeriksaan bentuk kristal, warna kekuningan, rasa pahit, dan bau agak harum.

#### b. Metode kimia

Tambahkan air panas suhu  $\pm 80^{\circ}\text{C}$ , kemudian didinginkan. Setelah dingin dibagi menjadi dua tabung. Tabung I diberi ammonia 10% dan tabung II sebagai pembanding. Dilihat dibawah lampu UV, jika terdapat fluoresensi kuning kehijauan atau kebiruan berarti positif kumarin

#### c. Metode kromatografi

Pemeriksaan ini menggunakan fase diam plat silica gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (1:1). Sebagai pendeteksi digunakan lampu UV akan terbentuk 1 noda fluoresensi biru dibawah lampu UV 366 nm

### 8. Elusidasi struktur

#### a. GC-MS

Setelah pengkondisian alat kromatografi gas dan spektrometri massa, cuplikan diinjeksikan melalui lubang masuk cuplikan. Pada suhu tinggi cuplikan tersebut akan berubah menjadi gas; bersama gas pembawa pada kenaikan suhu komponen yang mempunyai titik lebur yang sama, secara otomatis data terekam di dalam komputer. Bandingkan dengan data spektrum yang terdapat pada bank data NIST (National Institute of Standard and Technology).

#### b. Spektrofotometri Ultra Violet (UV)

Pemeriksaan spektrofotometri UV menggunakan  $\pm 1$  mg sampel yang dilarutkan dengan metanol (p.a) sampai larut, dan dideteksi menggunakan spektrofotometri UV sehingga terlihat puncak panjang gelombang yang merupakan karakteristik suatu senyawa, kemudian grafik yang terbentuk direkam. Grafik yang terbentuk

menampilkan serapan dan panjang gelombang dari sampel tersebut.

#### c. Spektrofotometri infra merah (IM)

Senyawa yang didapat kemudian dilanjutkan identifikasi dengan spektrofotometri infra merah (FT-IR) dengan tujuan untuk mengetahui gugus fungsi apa saja yang terdapat dalam senyawa. Caranya, cuplikan/sampel dilarutkan dengan pelarut kloroform atau karbon tetraklorida atau karbon disulfida, dan dicatat spektrum dari larutan ini. Larutan biasanya (1 - 5%) ditempatkan dalam sel larutan yang terdiri dari bahan transparan. Sel yang kedua berisi pelarut murni ditempatkan pada berkas sinar.

#### d. Spektroskopi <sup>1</sup>H NMR dan <sup>13</sup>C NMR

Senyawa dilarutkan dalam deuterochloroform (CDCl<sub>3</sub>), kemudian dimasukkan ke dalam tabung dengan sejumlah pelarut dicukupkan sampai setinggi  $\pm 5$  cm. Setelah itu, dideteksi dengan alat spektrofotometri NMR (Varian Unity INOVA 500 MHz NMR).<sup>16</sup>

### Hasil Penelitian Determinasi

Hasil determinasi yang dilakukan di BPTO Tawangmangu Solo Jawa Tengah, menunjukkan bahwa tumbuhan ini termasuk ke dalam suku/famili Asteraceae, genus/marga *Artemisia* dan spesies *Artemisia annua*.

### Skrining Fitokimia

Hasil pemeriksaan fitokimia herba *Artemisia annua* L., dalam tumbuhan terdapat golongan fenol, flavonoid, minyak atsiri, lemak, saponin, dan triterpenoid dan kumarin.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Skrining Fitokimia Pada Ekstrak Metanol Herba *Artemisia annua* L.

No	Pemeriksaan golongan	Pereaksi	Hasil	Keterangan
1	Alkaloid	Mayer	-	≠ endapan
		Dragendorf	-	≠ endapan
		Bouchardad	-	≠ endapan
2	Fenol	FeCl <sub>3</sub>	+	Ungu tua
3	Flavonoid	HClp + logam Mg, dinginkan + amil alkohol, dikocok.	+	Merah tetap di bawah
4	Minyak atsiri	Alkohol, diuapkan	+	Bau minyak atsiri-
5	Lemak/asam lemak	Alkohol	+	Terdapat tetesan-tetesan minyak
6	Saponin	Air panas 10 ml, dikocok vertikal	+	Busa stabil
7	Steroid/triterpenoid	Asam asetat anhidrat + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + CHCl <sub>3</sub>	+	Cincin merah
8	Kumarin	+NH <sub>4</sub> OH 10% pada lampu UV	+	Fluoresensi biru

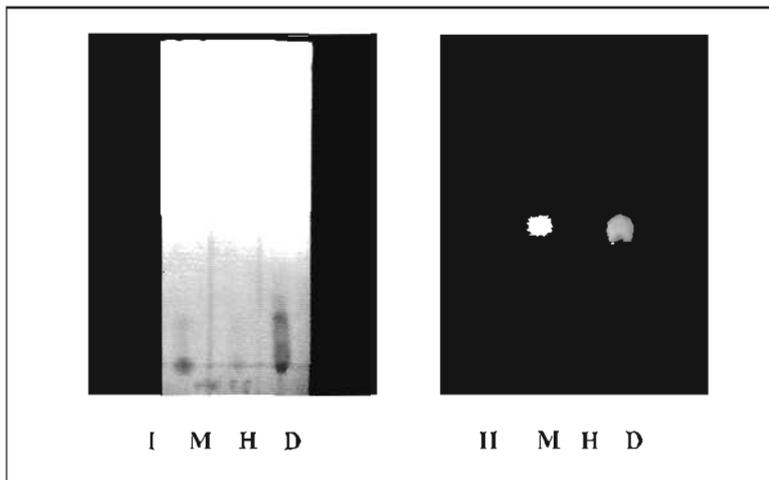
### Ekstraksi dan Fraksinasi

Nilai rendemen ekstrak metanol adalah 19,62%. Dari 1100 gram simplisia *Artemisia annua* L. yang sudah dihaluskan diperoleh 215,52 gram ekstrak kental metanol, sedangkan nilai rendemen pada fraksi diklormetan adalah 2,06%.

Ekstrak kental metanol, fraksi *n*-heksan dan fraksi diklormetan yang diperoleh kemudian dilakukan uji KLT dengan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (1 : 1). Gambar dapat dilihat pada gambar 1.

### Hasil Pemisahan

Pada pemisahan fraksi diklor metan dengan kromatografi kolom diperoleh beberapa fraksi yaitu fraksi 1(1 – 14), 2(16 – 42), 3(43 – 50), 4(51 – 57), 5(58-61), 6(62-70), 7(71-84), 8(885-91), 9(92-114), 10(115-170), 11 (171-190), 12(191-220), 13(221-245), 14(246-274), 15(275 – 310), 16 (311-339), 17(340-366), 18(367-378), 19(379-390). Dari fraksi-fraksi tersebut diketahui pada perbandingan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (1 : 1), yaitu fraksi yang ke-19 diperoleh kristal yang belum murni. (Gambar 2)



**Gambar 1. Kromatogram KLT ekstrak metanol, fraksi *n*-heksan dan fraksi diklor metan**

Keterangan :

Fase diam = plat silika gel GF<sub>254</sub>

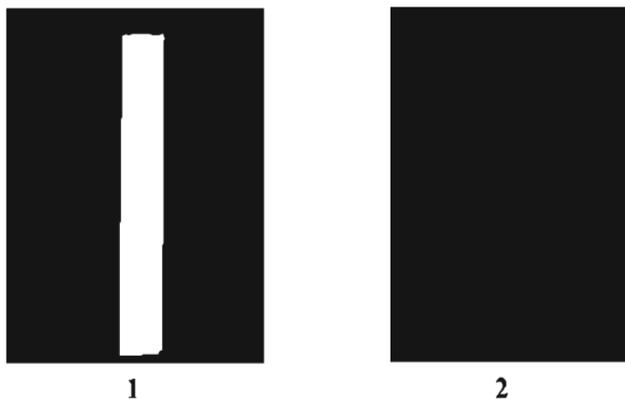
Fase gerak = *n*-heksan : etil asetat ( 1 : 1 )

M = ekstrak metanol, H = fraksi *n*-heksan, D = fraksi diklor metan

I. Dengan mata langsung : warna kuning kecoklatan

II. Dengan sinar UV 366 nm : Berfluoresensi biru

Dari basil KLT diketahui fraksi yang mengandung kumarin terdapat pada fraksi diklor metan.



**Gambar 2. Kromatogram KLT Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom pada Fraksi 19 Sebelum direkristalisasi.**

Keterangan

1 Secara visual : Warna kuning kecoklatan

2. Dengan UV 366 nm : Berfluoresensi biru

### Hasil Pemurnian

Pemurnian dilakukan dengan cara rekristalisasi pada fraksi ke-19 menggunakan pelarut campuran metanol dan kloroform. Didapat kristal yang berwarna putih kekuningan yang mengkilat. Hasil KLT dua arah dengan eluen yang berbeda *n*-hexan : etil asetat ( 1 : 1 ) dan kloroform : metanol ( 1 : 1 ) memberikan satu noda yang berwarna kuning kecoklatan dan jika dilihat di bawah lampu UV 366 nm berfluoresensi warna biru.

### Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi<sup>16,17,18,19,20</sup>

#### a. Organoleptis

Hasil pemeriksaan secara organoleptis menunjukkan bentuk kristal berwarna putih kekuningan yang mengkilat berbau aromatis, rasa pahit.

#### b. Metode Kimia

Senyawa kumarin ditambah air panas dengan suhu  $\pm 80^{\circ}\text{C}$  dan didinginkan. Setelah dingin dibagi menjadi dua tabung. Tabung I diberi amonia 10% dan tabung II sebagai pembanding.

Setelah dilihat di bawah lampu UV terdapat fluoresensi biru.

#### c. Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

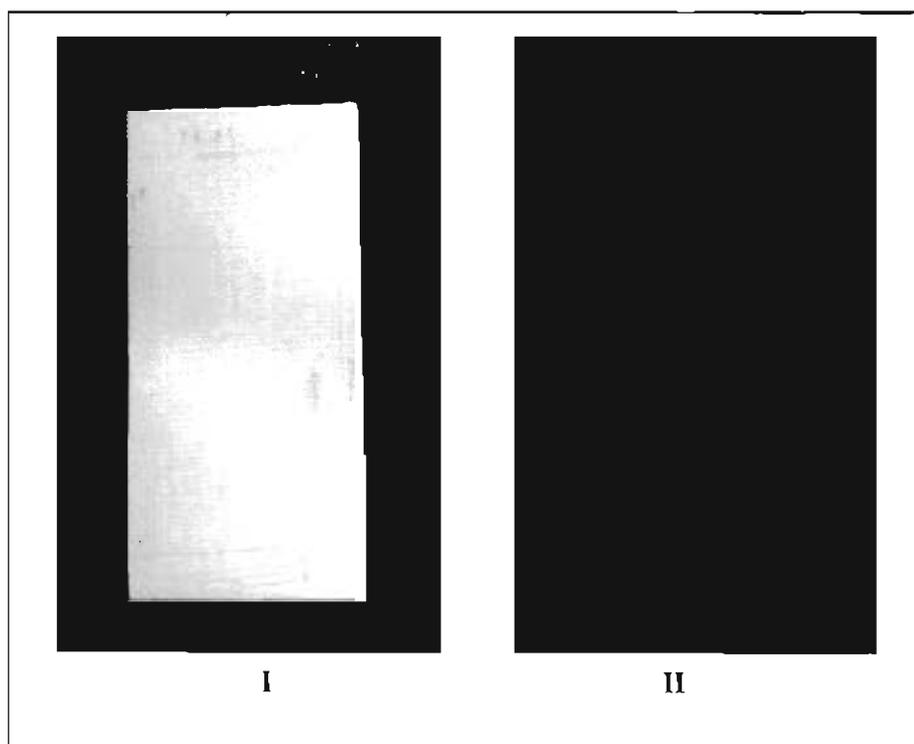
KLT menggunakan eluen *n*-heksan : etil asetat ( 1 : 1 ) timbul satu bercak berwarna kuning kecoklatan, dengan bantuan sinar UV 366 nm akan berfluoresensi warna biru dan mempunyai harga  $R_f = 0,523$ .

#### d. Elusidasi Struktur

##### 1. GC- MS

Hasil analisis kromatografi gas spektrometri massa pada RT 29,23 menit Gambar memberikan puncak-puncak molekul  $m/e = 192$ , yang menandakan berat molekul dari senyawa tersebut adalah 192. Puncak-puncak fragmentasinya adalah  $m/e = 192, 177, 164, 149, 121, 79, 69$ , dan 51.

Setelah dibandingkan dengan data *Library Searched* menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi adalah 2H-1-Benzopyran-2-one,7-hydroxy-6-methoxy (skopoletin) memiliki formula molekul  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$  dan berat molekul 192 dengan kesamaan 96%.



**Gambar 3.** Kromatogram KLT Dua Arah Hasil Rekristalisasi

Keterangan:

1. Secara visual
2. Secara UV 366 nm

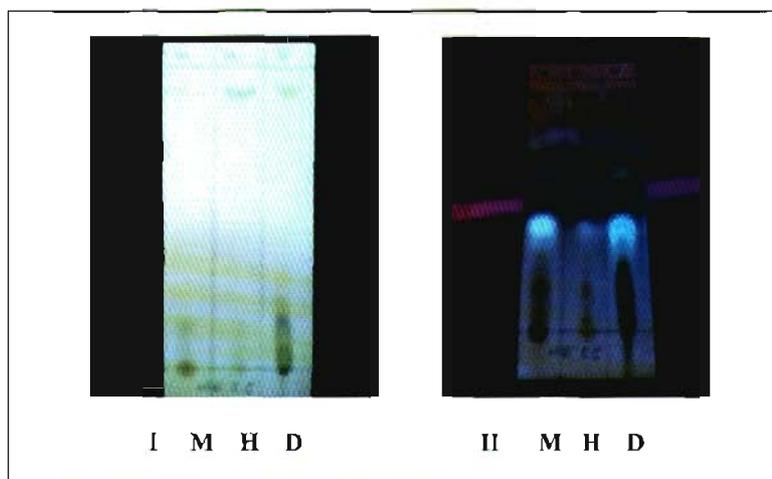
## Ekstraksi dan Fraksinasi

Nilai rendemen ekstrak metanol adalah 19,62%. Dari 1100 gram simplisia *Artemisia annua* L. yang sudah dihaluskan diperoleh 215,52 gram ekstrak kental metanol, sedangkan nilai rendemen pada fraksi diklormetan adalah 2,06%.

Ekstrak kental metanol, fraksi *n*-heksan dan fraksi diklormetan yang diperoleh kemudian dilakukan uji KLT dengan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (1 : 1). Gambar dapat dilihat pada gambar 1.

## Hasil Pemisahan

Pada pemisahan fraksi diklor metan dengan kromatografi kolom diperoleh beberapa fraksi yaitu fraksi 1(1 – 14), 2(16 – 42), 3(43 – 50), 4(51 – 57), 5(58-61), 6(62-70), 7(71-84), 8(885-91), 9(92-114), 10(115-170), 11 (171-190), 12(191-220), 13(221-245), 14(246-274), 15(275 – 310), 16 (311-339), 17(340-366), 18(367-378), 19(379-390). Dari fraksi-fraksi tersebut diketahui pada perbandingan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (1 : 1), yaitu fraksi yang ke-19 diperoleh kristal yang belum murni. (Gambar 2)



**Gambar 1. Kromatogram KLT ekstrak metanol, fraksi *n*-heksan dan fraksi diklor metan**

Keterangan :

Fase diam = plat silika gel GF<sub>254</sub>

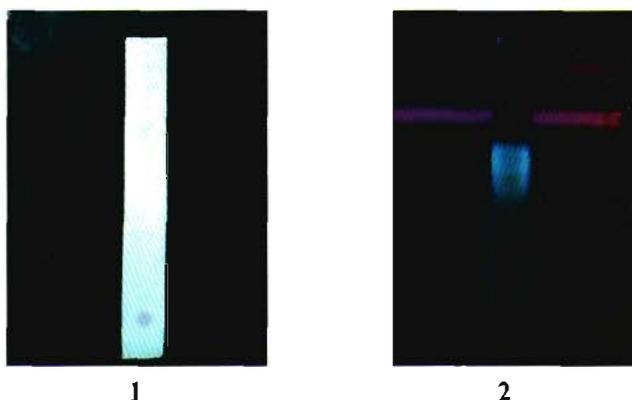
Fase gerak = *n*-heksan : etil asetat ( 1 : 1 )

M = ekstrak metanol, H = fraksi *n*-heksan, D = fraksi diklor metan

I. Dengan mata langsung : warna kuning kecoklatan

II. Dengan sinar UV 366 nm : Berfluoresensi biru

Dari hasil KLT diketahui fraksi yang mengandung kumarin terdapat pada fraksi diklor metan.



**Gambar 2. Kromatogram KLT Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom pada Fraksi 19 Sebelum direkristalisasi.**

Keterangan:

1. Secara visual : Warna kuning kecoklatan

2. Dengan UV 366 nm : Berfluoresensi biru

### Hasil Pemurnian

Pemurnian dilakukan dengan cara rekristalisasi pada fraksi ke-19 menggunakan pelarut campuran metanol dan kloroform. Didapat kristal yang berwarna putih kekuningan yang mengkilat. Hasil KLT dua arah dengan eluen yang berbeda *n*-hexan : etil asetat ( 1 : 1 ) dan kloroform : metanol ( 1 : 1 ) memberikan satu noda yang berwarna kuning kecoklatan dan jika dilihat di bawah lampu UV 366 nm berfluoresensi warna biru.

### Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi<sup>16,17,18,19,20</sup>

#### a. Organoleptis

Hasil pemeriksaan secara organoleptis menunjukkan bentuk kristal berwarna putih kekuningan yang mengkilat berbau aromatis, rasa pahit.

#### b. Metode Kimia

Senyawa kumarin ditambah air panas dengan suhu  $\pm 80^{\circ}\text{C}$  dan didinginkan. Setelah dingin dibagi menjadi dua tabung. Tabung I diberi amonia 10% dan tabung II sebagai pembanding.

Setelah dilihat di bawah lampu UV terdapat fluoresensi biru.

#### c. Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

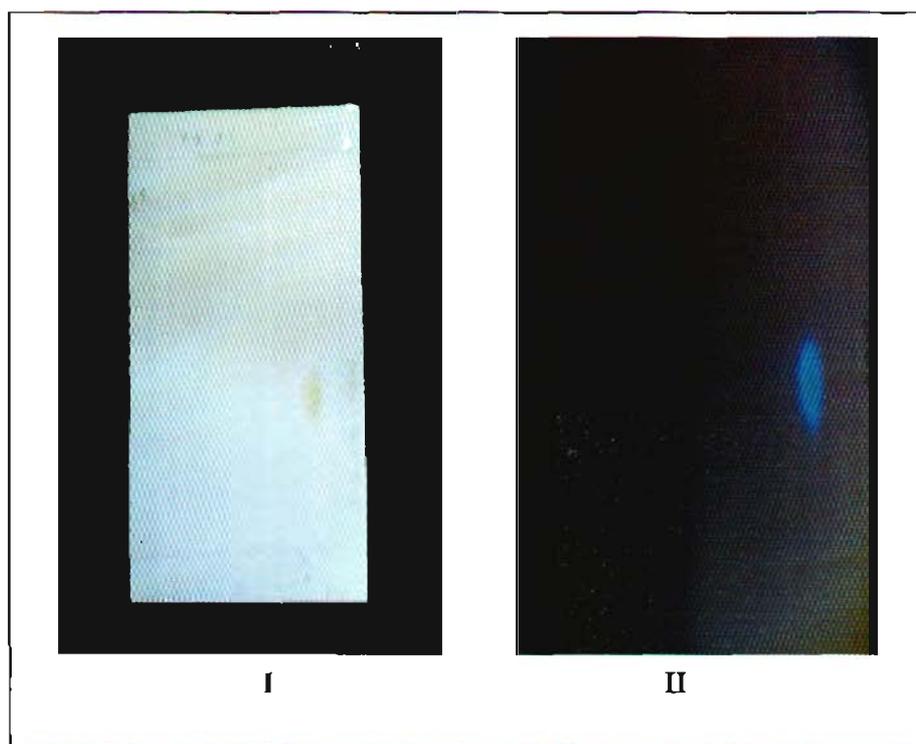
KLT menggunakan eluen *n*-heksan : etil asetat ( 1 : 1 ) timbul satu bercak berwarna kuning kecoklatan, dengan bantuan sinar UV 366 nm akan berfluoresensi warna biru dan mempunyai harga  $R_f = 0,523$ .

#### d. Elusidasi Struktur

##### 1. GC- MS

Hasil analisis kromatografi gas spektrometri massa pada RT 29,23 menit Gambar memberikan puncak-puncak molekul  $m/e = 192$ , yang menandakan berat molekul dari senyawa tersebut adalah 192. Puncak-puncak fragmentasinya adalah  $m/e = 192, 177, 164, 149, 121, 79, 69$ , dan 51.

Setelah dibandingkan dengan data *Library Searched* menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi adalah 2H-1-Benzopyran-2-one,7-hydroxy-6-methoxy (skopoletin) memiliki formula molekul  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$  dan berat molekul 192 dengan kesamaan 96%.

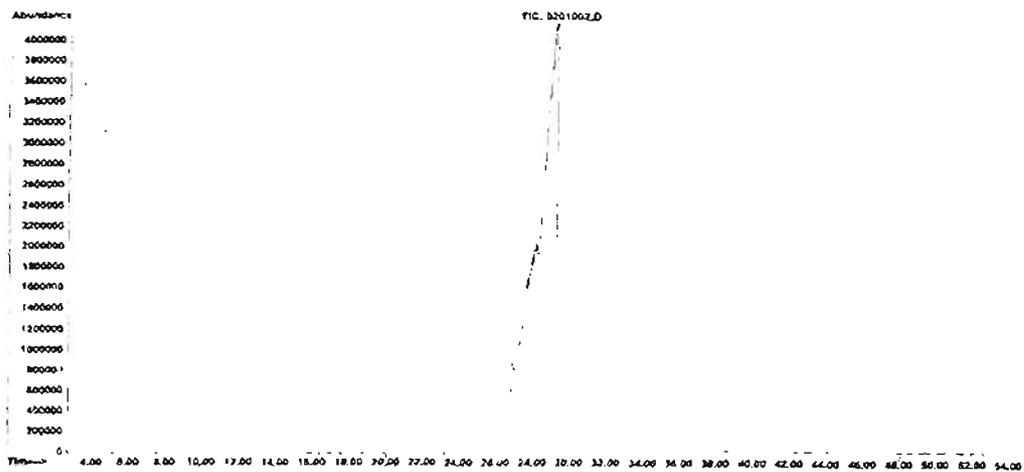


**Gambar 3.** Kromatogram KLT Dua Arah Hasil Rekristalisasi

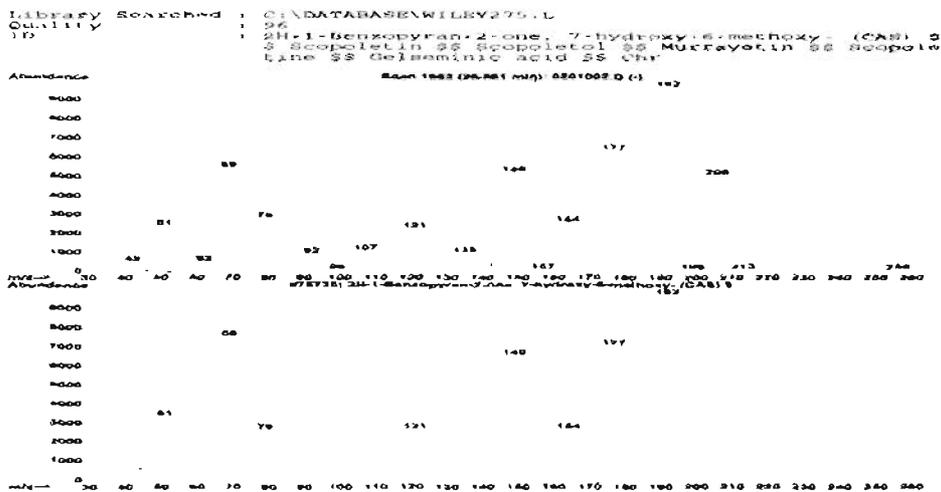
Keterangan:

1. Secara visual
2. Secara UV 366 nm

File : C:\NCPHEM\1\DATA\070424-A\0201002.D  
 Operator : TAZ  
 Acquired : 24 Apr 07 10:53 using AcqMethod BAHALAM  
 Instrument : GC/MS\_B  
 Sample Name : Sampel Ramilatan  
 Misc Info :  
 Vial Number : 2



Gambar 4. Spektrum GC-MS



Gambar 5. Spektrum MS

Tabel 2. Hasil Spektrofotometri UV Senyawa Isolat

Panjang gelombang (nm)	Serapan
346,0	1,5560
298,0	0,6567
230,0	1,7278
210,0	2,4362

### Spektrofotometri UV

Hasil pengukuran spektrum senyawa isolat dengan pelarut metanol (p.a) dapat dilihat pada Tabel 2.

### Spektrofotometri FT IR

Berdasarkan hasil FT IR dapat diketahui adanya regang -OH, regang C - O oksiaril, regang C = O terkonjugasi, dan regang C = C benzena. Lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 3 dan Gambar 6:

### Spektrofotometri <sup>1</sup>H dan <sup>13</sup>C NMR

Dari hasil spektrofotometri <sup>1</sup>H NMR diketahui bahwa pada pergeseran kimia 6,20 ppm muncul satu sinyal doublet dengan konstanta kopling  $J = 1,047$  menunjukkan adanya atom H pada posisi 3, pada pergeseran kimia 7,85 ppm muncul satu sinyal doublet dengan konstanta kopling  $J = 1,076$  menunjukkan atom H pada posisi 4, pada pergeseran 7,09 ppm muncul satu sinyal singlet dengan konstanta kopling  $J = 1,088$  menunjukkan atom H pada posisi 5, pada pergeseran kimia 4,90 ppm muncul satu sinyal singlet dengan konstanta kopling  $J = 1,74$  menunjukkan atom H pada posisi 7, pada pergeseran kimia 6,76 ppm muncul satu sinyal

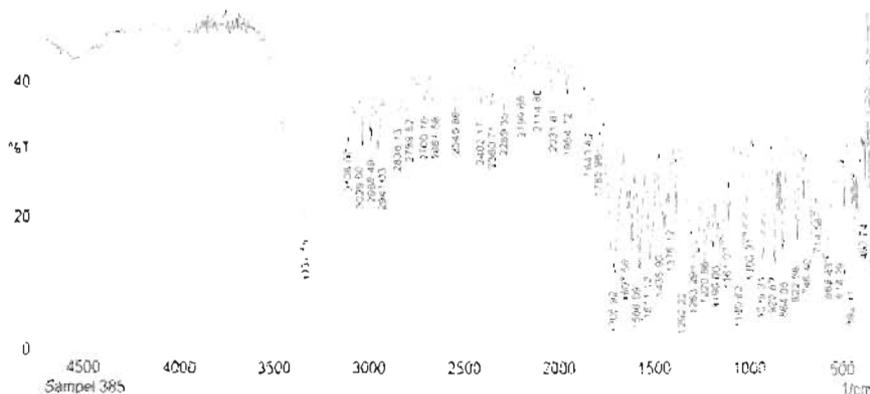
singlet dengan konstanta kopling  $J = 1$  menunjukkan atom H pada posisi 8, pada pergeseran kimia 3,90 ppm muncul satu sinyal multiplet dengan konstanta kopling  $J = 3,293$  menunjukkan adanya atom H pada posisi 11.

Sedangkan pada <sup>13</sup>C NMR diketahui pada pergeseran kimia 164,14 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 2, pada pergeseran kimia 112,62 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 3, pada pergeseran kimia 151,49 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 4, pada pergeseran kimia 109,96 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 5, pada pergeseran kimia 153,06 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 6, pada pergeseran kimia 146,21 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 7, pada pergeseran kimia 104,03 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 8, pada pergeseran kimia 147,15 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 9, pada pergeseran kimia 112,68 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 10, pada pergeseran kimia 56,87 ppm muncul satu sinyal karbon pada posisi 11.

Jika dibandingkan dengan data literatur maka hasil spektrum <sup>13</sup>C NMR dan <sup>1</sup>H NMR senyawa isolat memiliki kemiripan (tabel 4) dan Gambar 7 dan 8.

Tabel 3. Hasil Spektrofotometri FT -IR Senyawa Isolat

Bilangan gelombang senyawa isolat (cm <sup>-1</sup> )	Ikatan yang menyebabkan absorpsi
3337	Regang - OH
1292, 1140	Regang C - O
1705	Regang C = O
1607, 1566, 1435	Regang C = C



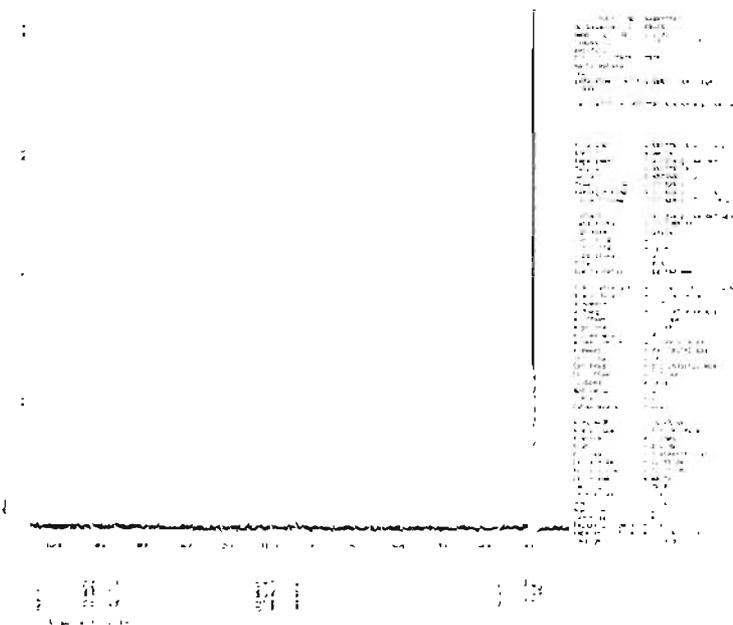
Gambar 6. Spektrum FT-IR

**Tabel 4. Perbandingan  $^{13}\text{C}$  NMR dan  $^1\text{H}$  NMR senyawa isolat dengan literatur**

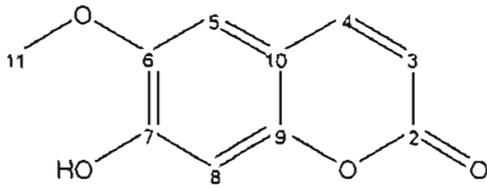
No. atom C	$\delta\text{C}$ senyawa isolat (ppm)	$\delta\text{C}$ literatur (ppm)	$\delta\text{H}$ senyawa isolat (ppm)	$\delta\text{H}$ literatur (ppm)
2	164,14	162	-	-
3	112,62	116,9	6,20 ( <i>d</i> , $J = 1,047$ )	6,45
4	151,49	145,6	7,85 ( <i>d</i> , $J = 1,076$ )	7,80
5	109,96	113,6	7,09 ( <i>s</i> , $j = 1,088$ )	6,97
6	153,06	145,9	-	-
7	146,21	142,5	4,90 ( <i>s</i> , $j = 4,74$ )	5,0
8	104,03	109,5	6,76 ( <i>s</i> , $J = 1$ )	6,56
9	147,15	144,5	-	-
10	112,68	121,4	-	-
11	56,87	56,3	3,90 ( <i>m</i> , $J = 3,293$ )	3,73



**Gambar 7. Spektrum  $^1\text{H}$  NMR**



**Gambar 8. Spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR**



2H-1-Benzopyran-2-one, 7-hydroxy-6-methoxy

Gambar 9. Struktur Senyawa Isolat

### Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan herba *Artemisia annua* L. yang termasuk *Asteraceae*. Bahan baku simplisia diperoleh dari tanaman budidaya BPTO Tawangmangu Solo Jawa Tengah. Keceragaman umur, masa panen, dan galur (asal-usul, garis keturunan) tanaman dapat dipantau. Hasil determinasi yang dilakukan di BPTO Tawangmangu Solo Jawa Tengah menunjukkan bahwa tumbuhan ini termasuk ke dalam suku/famili *Asteraceae*, genus/marga *Artemisia annua* L. Determinasi dilakukan untuk menghindari kesalahan dalam pengambilan sampel.

Sebelum digunakan untuk penelitian, terlebih dahulu herba *Artemisia annua* L. dilakukan pengeringan dengan cara diangin-anginkan dan tidak terkena cahaya matahari langsung, karena dikhawatirkan zat-zat berkhasiat yang terkandung didalamnya akan rusak. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air guna mencegah perubahan kimia pada bahan. Setelah pengeringan dilakukan penyerbukan untuk memudahkan pelarut pengeksrak menembus ke dalam sel, sehingga ekstraksi lebih sempurna. Penghalusan atau penyerbukan herba *Artemisia annua* L. menggunakan blender dan diayak dengan ukuran 40 mesh agar diperoleh hasil yang baik.

Metode ekstraksi yang dilakukan adalah cara panas yaitu sokhlet, karena pada ekstraksi ini terjadi ekstraksi yang kontinyu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik, menggunakan pelarut yang selalu baru. Ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi langsung menggunakan pelarut metanol karena metanol merupakan pelarut yang general sehingga senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya akan terekstraksi semua.

Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai didapat ekstrak kental, setelah itu ekstrak kental dilakukan skrining fitokimia. Pemeriksaan ini merupakan pemeriksaan pendahuluan dimaksudkan untuk memberikan gambaran atau mengetahui kelompok senyawa yang terkandung dalam herba *Artemisia annua* L., kemudian dilakukan uji KLT dan dihitung rendemennya.

Pemisahan ekstrak metanol dilakukan dengan dua cara yaitu fraksinasi dan kromatografi kolom. Ekstrak kental metanol difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan dan selanjutnya menggunakan diklormetan. Fraksinasi dengan berbagai pelarut dengan kepolaran berbeda bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan kelarutannya, sehingga senyawa yang terdapat pada ekstrak dapat larut pada pelarut yang sesuai dengan kelarutannya.

Masing-masing fraksi dilakukan uji KLT menggunakan eluen *n*-heksan : etil asetat ( 1:1 ), dari hasil uji KLT diketahui bahwa fraksi diklormetan positif mengandung kumarin dengan adanya noda yang dilihat di bawah lampu UV akan berfluoresensi warna biru. Berdasarkan literatur diketahui bahwa kebanyakan senyawa kumarin ternyata aktif terhadap sinar UV, hal ini disebabkan karena kumarin memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, dan diketahui sinar serapan UV mampu menyerap suatu ikatan yang terkonjugasi atau memiliki gugus khromofor. Fraksi yang mengandung kumarin dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom, dengan menggunakan fase diam silika gel 60 dan fase gerak *n*-heksan : etil asetat dengan perbandingan gradien ( 4:1, 2:1, 1:1 ) berdasarkan hasil orientasi KLT.

Hasil pemisahan pada fraksi diklormetan didapat 19 fraksi pada eluen *n*-heksan: etil asetat dengan perbandingan ( 1 : 1 ), di mana fraksi 19

membentuk kristal yang belum murni, untuk itu dilakukan pemurnian dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut campuran metanol – kloroform. Hasil rekristalisasi tersebut diperoleh kristal yang berwarna putih kekuningan yang mengkilat dan memiliki satu noda pada uji KLT. Kemudian senyawa tersebut dilakukan identifikasi.

Hasil identifikasi terhadap senyawa isolat menggunakan kromatografi gas spektrometri massa pada RT 29,23 menit memberikan puncak-puncak molekul  $m/e = 192$ , yang menandakan berat molekul dari senyawa tersebut adalah 192. Puncak-puncak fragmentasinya adalah  $m/e = 192$ , 177, 164, 149, 121, 79, 69, dan 51. Setelah dibandingkan dengan data *Library Searched* menunjukkan bahwa senyawa isolat yang terdapat pada herba *Artemisia annua* L. adalah 2H-1-Benzopyran-2-one,7-hydroxy-6-methoxy (skopoletin) memiliki formula molekul  $C_{10}H_8O_3$  dan berat molekul 192, merupakan golongan senyawa kumarin, yang memiliki kesamaan 96 %, untuk itu perlu dilakukan identifikasi lagi secara UV, IR dan NMR.

Karakterisasi senyawa hasil isolasi dengan spektrum UV memberikan serapan pada panjang gelombang 346 nm dan 298 nm yang karesteritik untuk senyawa golongan kumarin.

Elusidasi struktur spektrofotometer infra merah (FT IR) sangat berguna untuk mengetahui gugus fungsi suatu senyawa. Gugus fungsi yang diperoleh pada FT - IR ini meliputi gugus -OH pada bilangan gelombang  $3337\text{ cm}^{-1}$ , C - O oksil pada bilangan gelombang  $1292\text{ cm}^{-1}$ , C=O terkonjugasi pada bilangan gelombang  $1705\text{ cm}^{-1}$ , dan C=C benzene pada bilangan gelombang  $1607\text{ cm}^{-1}$ ,  $1566\text{ cm}^{-1}$  dan  $1435\text{ cm}^{-1}$ . Dimana gugus-gugus fungsi tersebut merupakan gugus-gugus fungsi pada senyawa kumarin.

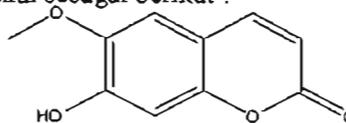
Untuk dapat memastikan struktur senyawa tersebut diperlukan elusidasi struktur dengan spektrofotometri  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR. Dari hasil spektrofotometri  $^1\text{H}$  NMR diketahui bahwa pada pergeseran kimia 6,20 ppm muncul satu sinyal doublet dengan konstanta kopling  $J = 14,07$  menunjukkan adanya atom H pada posisi 3, pada pergeseran kimia 7,85 ppm muncul satu sinyal doublet dengan konstanta kopling  $J = 1,076$  menunjukkan atom H pada posisi 4, pada pergeseran 7,09 ppm muncul satu sinyal singlet dengan konstanta kopling  $J = 1,088$  menunjukkan atom H pada posisi 5, pada pergeseran kimia 4,90 ppm muncul satu sinyal singlet dengan konstanta

kopling  $J = 1,74$  menunjukkan atom H pada posisi 7, pada pergeseran kimia 6,76 ppm muncul satu sinyal singlet dengan konstanta kopling  $J = 1$  menunjukkan atom H pada posisi 8, pada pergeseran kimia 3,90 ppm muncul satu sinyal multiplet dengan konstanta kopling  $J = 3,293$  menunjukkan adanya atom H pada posisi 11.

Sedangkan pada  $^{13}\text{C}$  NMR diketahui pada pergeseran kimia 164,14 ppm muncul satu sinyal karbon yang spesifik untuk ( C = O ), pada pergeseran kimia 153,06 ppm dan 56,87 ppm adanya gugus ( C - O - C ), pada pergeseran kimia 112,62 ppm, 151,49 ppm, 109,96 ppm dan 104,03 ppm muncul sinyal karbon ( - C = ), pada pergeseran kimia 146,21 ppm muncul sinyal karbon untuk gugus ( C - OH ), pada pergeseran kimia 112,68 ppm dan 147 ppm adanya gugus C. Dari data spektrum  $^1\text{H}$  NMR dan  $^{13}\text{C}$  NMR senyawa isolat dengan literatur skopoletin maka senyawa tersebut memiliki inti cincin yang sama .

### Kesimpulan

Berdasarkan data yang diperoleh melalui hasil identifikasi secara organoleptis, uji KLT, GC-MS, spektrofotometri UV, FT IR dan spektrofotometri  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR serta dibandingkan dengan literatur 2H-1-Benzopyran-2-one,7-hydroxy-6-methoxy maka senyawa hasil isolasi yang terkandung di dalam herba *Artemisia annua* L merupakan senyawa golongan kumarin dengan nama 2H-1-Benzopyran-2-one,7-hydroxy-6-methoxy atau dengan nama lain skopoletin dengan bobot molekul 192 dengan struktur molekul sebagai berikut :



2H-1-Benzopyran-2-one, 7-hydroxy-6-methoxy

### Saran

Perlu dilakukan uji farmakologi senyawa tunggal kumarin sebagai antikanker dari herba *Artemisia annua* L

### Daftar Pustaka

1. Ahmad, S.A., E.H. Hakim dan I. Makmur, 1991, Beberapa Upaya Pencarian Bahan Kimia untuk Senyawa-senyawa Bioaktif dari Tumbuhan Lauraceae Indonesia. Makalah Ilmiah, UNESCO Workshop on

- 
- Isolation and Bioactivity Studies in Natural Product Research, Padang: 3-5
2. Murray, R.D.H., J. Mendes, and S.A. Brow, 1982, *The Natural Coumarin*, John Willey and Son Ltd, New York
  3. Syarif, Amir, *Farmakologi dan Terapi*, edisi IV, Penerbit: Bagian Farmakologi FKUI, Jakarta.
  4. Kusuma, T.S., 1997, Mempelajari Sifat Antikarsinogen Alamiah Turunan Fenol, Kumin, Kromon, Flavon dan Isokumarin, *Jurnal Andalas* No.15, Januari Tahun VI
  5. Juliarni Muji dan Ermayanti Muji, 2004, Studi Karakter Anatomi Daun dari Kultur Tunas *Artemisia Annu L* Penghasil Obat Antimalaria *Artemisin*, Tesis, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB.
  6. Bhakuni R.S, P.C.Jain, R.P.Sharma and S.Kumar, *Secondary Metabolites of Artemisia annua and Their Biological Activity*. *Current science*, vol.80 No.1
  7. Banarti, S, 1993, *Skrining Aktivitas Antibakteri dari Beberapa Tanaman Suku Guttiferae dan Isolasi Senyawa Aktifnya*, Tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya
  8. Anonim, 1987, *Analisis Obat Tradisional*, Jilid I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. Hal. 43 – 53
  9. Anonim, 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. Hal. 9 – 12
  10. Gritter R.J., Bobbitt J.M., dan Schwarting A.E., 1991, *Pengantar Kromatografi*, penerbit : ITB, Bandung.
  11. Harborne J.B., 1987, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, penerbit : ITB, Bandung. Hal. 1 – 42, 184 – 196
  12. Kartasubrata, 1991, *Dasar-dasar Kromatografi Lapisan Tipis*, Seminar Aplikasi TLC Dalam Bidang Obat dan Makanan, Puslitbang Kimia Terapan dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia : 1-4
  13. Johnson, E.L dan R.Stevenson, 1991, *Dasar-dasar Kromatografi Cair*, Terjemahan Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung:365.
  14. Sidik dan Mudahar, 2000, *Ekstraksi Tumbuhan Obat, Metode dan Faktor-faktor yang mempengaruhi Mutu Produksinya*, Prosiding Seminar PERHIBA Komisariat Jakarta dan Fakultas Farmasi UNTAG 1945 Jakarta, Jakarta: 12-15.
  15. Banarti, S, 1993, *Skrining Aktivitas Antibakteri dari Beberapa Tanaman Suku Guttiferae dan Isolasi Senyawa Aktifnya*, Tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
  16. Cresswel C.J., Rungquist O.A., dan Campbell M.M., 1982, *alibahasa Padmawinata, Sudiro,I, Analisis Spektrum Senyawa Organik*, penerbit : ITB, Bandung. Hal.60 – 181
  17. Silverstein, Basseler and Morrill, 1984, *alibahasa Hartomo, A.J, Purba, A.V, Penyidikan Spektrometri Senyawa Organik*, Edisi 4, Penerbit Erlangga, Surabaya.
  18. Ewing, G.W., 1985, *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, Fifth edition, Mc Graw-Hill Book Company, Singapore: 171-172
  19. Tuschone, J.C., 1983, *Practice of Thin Layer Chromatography*, 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley and Sons Inc, Canada : 122-123
  20. Pine.S.H.J.B.Hendrikson, dan D.J. Cram. 1988, *Spektroskopi, Kimia Organik*, Edisi I, ITB, Bandung, 147-194
-