

ISOLASI DAN KARAKTERISASI PIGMEN BIXIN DARI TANAMAN KESUMBA (*Bixa orellana* L.)

Uray Amira Naselia¹, Septiani¹, Imelda H. Silalahi¹, Winda Rahmalia^{1*}

¹Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura

Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Pontianak

*email : winda.rahmalia@chemistry.untan.ac.id

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi dan karakterisasi pigmen bixin dari biji tanaman kesumba (*Bixa orellana* L.). Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi dan purifikasi bixin dengan menggunakan metode flash chromatography. Bixin yang diperoleh dari hasil isolasi memiliki massa 125,5 mg (dengan rendemen hasil sebesar 0,17% terhadap berat kering biji kesumba dan 6,28% terhadap berat ekstrak kasar yang digunakan pada proses isolasi). Karakterisasi bixin menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan tiga puncak serapan pada panjang gelombang 430, 458 dan 487 nm. Hasil yang diperoleh ini sesuai dengan panjang gelombang maksimum yang dihasilkan untuk puncak karakteristik bixin dibandingkan dengan bixin standar. Hasil analisis menggunakan FTIR juga menunjukkan gugus fungsi yang sesuai dengan struktur bixin, yaitu pita pada 3183 cm^{-1} menunjukkan vibrasi stretching -OH , 1689 cm^{-1} menunjukkan vibrasi stretching untuk C=O karboksilat, 1716 cm^{-1} menunjukkan vibrasi untuk C=O ester, dan 1161 cm^{-1} dan 1255 cm^{-1} menunjukkan vibrasi simetrik dan asimetrik gugus ester C-O-C . Hasil analisis menggunakan KLT menunjukkan penampakan noda tunggal dengan nilai R_f yang sama dengan bixin standar.

Kata Kunci : *Bixa orellana* L., bixin, flash chromatography, spektrofotometri UV-Vis, FTIR

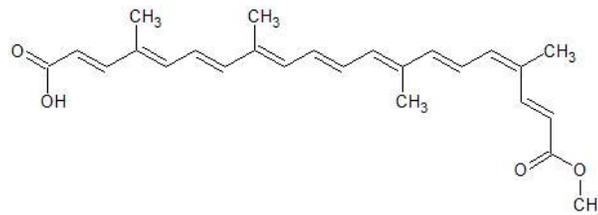
PENDAHULUAN

Pigmen menghasilkan warna yang dapat kita amati sehari-hari dan tanaman merupakan salah satu produsen utama dari pigmen tersebut. Pigmen alami terdapat pada bagian tumbuhan seperti daun, buah, biji, dan bunga. Pigmen adalah senyawa kimia yang dapat menyerap cahaya pada rentang panjang gelombang sinar tampak. Warna pada pigmen terbentuk karena adanya struktur molekul spesifik yang disebut kromofor. Berdasarkan sumbernya, pigmen dibagi menjadi pigmen alami dan pigmen sintetis. Pigmen alami dihasilkan oleh organisme hidup seperti tumbuhan, jamur ataupun hewan sedangkan pigmen sintetis, disintesis dalam laboratorium. Pigmen alami maupun sintetis telah digunakan secara luas dalam industri obat-obatan, makanan, pakaian, dan produk lainnya (Paliwal *et al.* 2016).

Salah satu tanaman yang menghasilkan pigmen alami tersebut adalah tanaman kesumba (*Bixa orellana* L.). Kesumba adalah tanaman belukar tropis yang berasal dari Benua Amerika yang menghasilkan buah berwarna merah dan satu buahnya mengandung sekitar 50 biji merah. Biji Kesumba terdiri dari bagian *inner seed* yang mengandung minyak, lilin, mineral dan senyawa alkaloid. Lapisan terluar dari biji kesumba (pericarp) mengandung pigmen dan sedikit minyak (Ribeiro *et al.*, 2005). Pigmen tersebut terdiri dari 80% *cis*-bixin (metil hidrogen (9'Z) -6,6'-apocarotene-6, 6'-dioate atau 9'-*cis*-bixin) yang merupakan pigmen karotenoid utama dari biji kesumba; dan 20% sisanya termasuk *trans*- dan *cis*-norbixin (Gómez-Ortiz *et al.*, 2010).

Bixin ($\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$) merupakan pigmen berbasis karotenoid (apokarotenoid) yang memiliki sifat tidak larut dalam air tetapi larut dalam sebagian besar pelarut organik polar. Bixin terdiri dari sembilan ikatan rangkap terkonjugasi pada strukturnya yang berperan sebagai gugus kromofor dengan gugus asam karboksilat di salah satu ujung rantai dan gugus metil ester di ujung rantai yang lain (Montenegro *et al.*, 2004). Bixin memiliki warna jingga kemerahan dan dapat menyerap cahaya pada

daerah sinar tampak yaitu pada kisaran panjang gelombang 400 – 500 nm. Sifat bixin yang mampu menyerap pada daerah sinar tampak membuat bixin dapat dimanfaatkan sebagai sensitizer dalam sel surya DSSC (*Dye Sensitized Solar Cell*) (Gómez-Ortíz *et al.*, 2010). Selain itu, bixin juga telah dimanfaatkan secara luas dalam bidang industri sebagai pewarna tekstil, pewarna makanan dan kosmetik (Rao *et al.*, 2014). Bixin juga telah dimanfaatkan dalam bidang medis sebagai antioksidan dan sensitizer dalam terapi fotodinamik (Olson and Allen, 2010).



Gambar 1. Struktur *cis*-bixin

Pigmen bixin dapat diperoleh dari pericarp biji kesumba dengan beberapa metode ekstraksi seperti maserasi menggunakan campuran pelarut organik yang dapat disesuaikan dengan kepolaran dari pigmen bixin, serta metode ultrasonikasi (Butnariu, 2016). Untuk mendapatkan pigmen bixin dengan kemurnian yang lebih tinggi dilakukan proses isolasi dan purifikasi. Koul *et al.* (2003) menggunakan metode ekstraksi pelarut pada kondisi refluks dalam purifikasi bixin dan menghasilkan rendemen hasil sebesar 18,6% terhadap berat ekstrak kasar. Metode purifikasi lain untuk pigmen bixin adalah dengan metode rekristalisasi dalam pelarut aseton (M. J. Scotter, 1995). Penelitian oleh Rahmalia *et al.* (2015) menggunakan metode ekstraksi pelarut dipercepat (*Accelerated Solvent Extraction/ASE*) dan menghasilkan *cis*-bixin dengan kemurnian 88,8%.

Berkembangnya teknik isolasi dan identifikasi senyawa dari produk alami, serta pemanfaatan yang luas dari bixin dalam berbagai bidang industri menyebabkan diperlukannya metode yang tepat untuk mengekstraksi pigmen bixin dari biji kesumba. Oleh karena itu, pada penelitian ini pigmen bixin akan diekstraksi dan dipurifikasi dengan metode *flash chromatography*. Pigmen bixin yang diperoleh dari hasil isolasi dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer ultraviolet-visible (UV-Vis) dan *Fourier-transform infrared* (FTIR).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya alat gelas standar, *hot plate*, kertas saring, seperangkat alat kolom *flash chromatography*, lampu UV (254 nm), *magnetic stirrer*, neraca analitik (Pioneer), oven, plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis), *chamber*, *rotary vacuum evaporator* (Heidolph), spatula, seperangkat alat gelas, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1280 dan spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (FTIR) (IRPrestige-21 Shimadzu).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya biji tanaman Kesumba (*Bixa orellana* L.), akuades (H₂O), aseton (CH₃COCH₃) ≥ 99,9%, etil asetat (C₄H₈O₂) ≥ 99,8%, metanol (CH₃OH) ≥ 99,9%, *n*-heksana (C₆H₁₄) ≥ 95%, seluruh pelarut yang digunakan disuplai oleh Merck, silika gel G60 untuk kolom (70-230 dan 230-400 mesh) (Merck) dan silika gel G60 untuk impregnasi (0,2-0,5 mm) (Merck), plat silika gel G60 F₂₅₄ (Merck).

Prosedur Kerja

Ekstraksi dan purifikasi bixin dari ekstrak biji Kesumba

Ekstraksi bixin dari biji kesumba pada penelitian ini mengadopsi metode ekstraksi oleh Gómez-Ortíz *et al.* (2010) dan Rahmalia *et al.* (2015) yang telah dimodifikasi. Biji kesumba yang diperoleh dikeringkan dalam oven pada suhu 50 °C selama 7 jam. Ekstraksi bixin dari biji kesumba dilakukan dengan mencampurkan 100 gram biji kering kesumba dan pelarut etil asetat kemudian distirer. Ekstraksi dilakukan berulang setiap penambahan 200 mL etil asetat. Larutan berwarna

merah pekat hasil ekstraksi kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan biji kesumba setelah proses ekstraksi. Pelarut yang masih terdapat dalam ekstrak biji kesumba dapat dihilangkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C. Ekstrak kering kemudian dicuci dengan metanol dan *n*-heksana sambil disaring. Residu yang diperoleh kemudian disimpan pada kondisi gelap dan temperatur 4 °C. Ekstrak kering kesumba yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan KLT dalam beberapa variasi eluen *n*-heksana dan etil asetat yaitu (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), dan (1:1), serta eluen aseton : metanol dengan perbandingan (1:1). Analisis KLT ini dilakukan untuk mengetahui eluen dengan pemisahan terbaik.

Purifikasi bixin dari ekstrak kasar mengadopsi metode purifikasi Gómez-Ortíz *et al.* (2010) menggunakan kolom *flash chromatography*. Sebanyak 2 gram ekstrak biji kesumba dilarutkan dalam aseton. Larutan sampel kemudian diimpregnasi ke silika gel 60–70 *mesh* dan dibiarkan mengering. Elusi sampel yang telah diimpreg dilakukan menggunakan fasa gerak *n*-heksana : etil asetat (EA) dengan variasi rasio (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), dan (1:1) secara berurutan, kemudian elusi dilanjutkan menggunakan aseton : metanol dengan perbandingan (1:1). Setiap eluat yang dihasilkan ditampung dan dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), fraksi yang memiliki nilai *R_f* sama digabungkan. Eluat dikumpulkan, dievap untuk menghilangkan pelarut dan dianalisis dengan spektrofotometri UV-Vis dan spektroskopi FTIR. Spektra absorpsi pigmen bixin hasil analisis diukur dengan melarutkan pigmen bixin hasil isolasi dalam pelarut aseton dan dilakukan *scanning* pada rentang panjang gelombang 350–600 nm. Analisis bixin menggunakan spektrofotometer FTIR dilakukan pada rentang bilangan gelombang 4000 – 400 cm^{-1} dengan metode *pellet* KBr.

HASIL DAN PEMBAHASAN

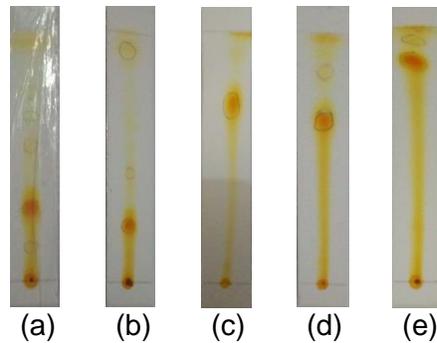
Ekstraksi Pigmen Bixin dari Biji Kesumba

Sebelum proses ekstraksi, pengeringan biji kesumba pada suhu 50°C selama 7 jam terlebih dahulu dilakukan untuk mengurangi kadar air yang terkandung. Pengeringan pada biji kesumba juga dilakukan agar ekstraksi pigmen bixin pada biji kesumba dapat berlangsung optimal. Pada kondisi kering interaksi antara sampel dan pelarut organik yang digunakan pada proses ekstraksi akan lebih besar dibandingkan jika sampel diekstraksi dalam kondisi basah (Butnariu, 2016).



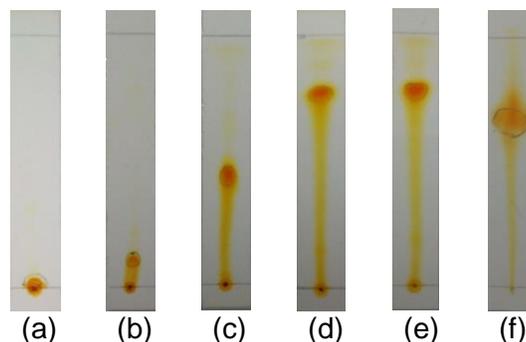
Gambar 2. Biji kesumba kering yang telah dioven

Biji kesumba yang telah kering kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat karena sifat dari bixin yang larut baik dalam pelarut semipolar. Struktur bixin yang terdiri dari rantai poliena dan memiliki gugus karboksilat serta metil ester menyebabkan bixin bersifat lebih polar dibandingkan karotenoid lainnya dan memiliki afinitas yang lebih besar pada pelarut semipolar (Rahmalia *et al.*, 2014). Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi menggunakan pelarut organik dan pengadukan secara mekanis pada suhu kamar (Giridhar *et al.*, 2014). Ekstraksi dilakukan pada suhu kamar karena sifat dari pigmen bixin yang memiliki termostabilitas rendah dan akan terdegradasi pada suhu tinggi (Rios *et al.*, 2005). Rendemen ekstrak kasar biji kesumba yang diperoleh adalah sebesar 9,39% dari total berat kering biji kesumba.



Gambar 3. Hasil KLT ekstrak kesumba dalam berbagai variasi eluen *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan (a) 9:1 (b) 8:2 (c) 7:3 (d) 6:4 (e) 1:1

Ekstrak biji kesumba yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan metode KLT untuk mengetahui komponen kimia yang terdapat pada ekstrak biji kesumba tersebut sebelum dilakukan tahap purifikasi (isolasi) dengan metode *flash chromatography*. Analisis KLT dilakukan dalam beberapa variasi eluen *n*-heksana dan etil asetat yaitu (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), dan (1:1), serta eluen aseton : metanol dengan perbandingan (1:1). Variasi eluen dalam analisis KLT ini dilakukan untuk mengetahui eluen dengan pemisahan terbaik yang akan digunakan dalam analisis KLT pada identifikasi setiap fraksi hasil purifikasi menggunakan kolom *flash chromatography*. Berdasarkan hasil KLT dan nilai R_f yang dihasilkan dapat disimpulkan bahwa eluen *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan (7:3) dan (6:4) merupakan eluen dengan pemisahan paling baik untuk identifikasi setiap fraksi hasil purifikasi menggunakan kolom *flash chromatography*.



Gambar 4. Hasil KLT ekstrak kesumba setelah dilakukan pencucian dengan *n*-heksana dan metanol dalam berbagai variasi eluen *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan (a) 9:1 (b) 8:2 (c) 7:3 (d) 6:4 (e) 1:1 dan eluen aseton : metanol dengan perbandingan (f) 1:1

Hasil analisis KLT pada Gambar 3 menunjukkan terdapat beberapa komponen pada ekstrak yang diperoleh, hal ini diindikasikan dengan munculnya beberapa noda. Ekstrak biji kesumba yang diperoleh kemudian dicuci dengan pelarut *n*-heksana dan metanol untuk mengurangi fraksi non polar dan polar dalam ekstrak biji kesumba. Pencucian menggunakan *n*-heksana dipilih karena pigmen bixin relatif tidak larut dalam pelarut *n*-heksana yang bersifat non polar ($\mu = 0,08$) dan metanol yang bersifat polar ($\mu = 2,87$) (Rahmalia *et al.*, 2014). Ekstrak kering biji kesumba yang telah dicuci dengan pelarut *n*-heksana dan metanol kembali dianalisis dengan KLT dan menunjukkan noda (spot) berwarna jingga pekat dengan *tailing* (berekor) yang sangat jelas (dilihat pada Gambar 4).

Tailing (pengekoran) yang terjadi pada spot yang dihasilkan dari analisis KLT dapat disebabkan karena pemisahan yang terjadi tidak sempurna dan konsentrasi komponen yang terlalu tinggi (Sherma and Fried, 2003). Komponen kimia pada sampel memiliki afinitas yang lebih besar terhadap fasa diam dibandingkan dengan fasa gerak, sehingga masih terdapat komponen kimia

pada sampel yang tertinggal pada fasa diam (Spangenberg *et al.*, 2011). Hasil analisis KLT menunjukkan bahwa diperlukan proses pemurnian lebih lanjut dengan metode *flash chromatography* untuk mendapatkan pigmen bixin dengan kemurnian yang lebih tinggi.

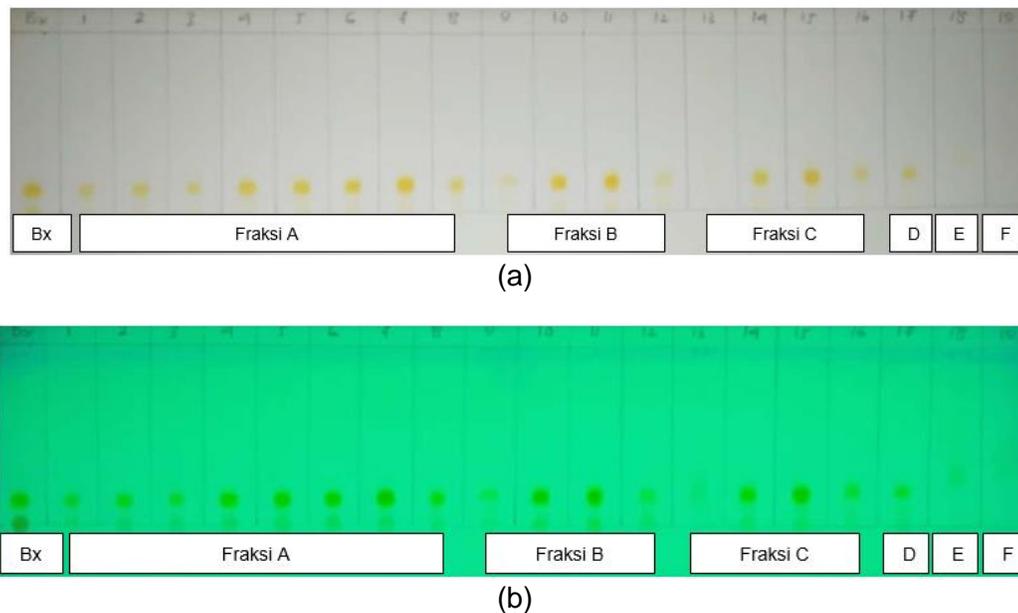
Purifikasi dan Karakterisasi Pigmen Bixin dari Ekstrak Biji Kesumba

Sebelum melakukan isolasi dengan metode *flash chromatography*, sebanyak 2 gram sampel ekstrak biji kesumba dilarutkan dalam aseton, kemudian diimpregnasikan terlebih dahulu pada silika gel 60–70 *mesh* hingga merata. Preparasi ini bertujuan untuk menghomogenkan sampel ekstrak kesumba dengan fasa diam (silika gel) agar pemisahan yang dihasilkan lebih baik. Pada proses ini terjadi interaksi fisik antara sampel ekstrak kesumba dengan permukaan silika.

Sampel ekstrak kesumba yang telah diimpregnasi kemudian dielusi pada kolom *flash chromatography*. Prinsip pemisahan senyawa menggunakan *flash chromatography* didasarkan pada perbedaan kepolaran. Elusi dilakukan dengan teknik elusi gradien menggunakan perbandingan eluen *n*-heksana : etil asetat (9:1), (8:2), (7:3), (6:4) dan (1:1) secara berurutan, kemudian elusi dilanjutkan menggunakan aseton : metanol dengan perbandingan (1:1). Elusi diawali dengan pelarut yang bersifat non polar yaitu *n*-heksana : etil asetat perbandingan 9:1 untuk mengeluarkan senyawa non polar yang belum terelusi secara sempurna pada saat dilakukan analisis dengan metode KLT. Pada proses ini eluen akan mengelusi senyawa yang terikat lemah dengan fasa diam (silika), sehingga akan lebih dulu keluar dari kolom pada proses elusi.

Teknik elusi bergradien dilakukan dengan meningkatkan kepolaran sistem pelarut secara perlahan atau meningkatkan konsentrasi pelarut dengan kepolaran yang lebih tinggi agar senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak biji kesumba dapat terelusi dengan teratur sesuai dengan tingkat kepolarannya (Braithwaite and Smith, 1999). Teknik ini dilakukan agar dapat menghasilkan pemisahan yang sesuai dengan tingkat kepolaran pigmen bixin. Bixin memiliki gugus metil ester dan gugus karboksilat pada rantai poliena dalam struktur kimianya, sehingga bixin memiliki afinitas yang lebih besar terhadap pelarut semi polar (Rahmalia *et al.*, 2014).

Setiap eluat yang dihasilkan dari pemisahan menggunakan *flash chromatography* kemudian dianalisis dengan KLT. Proses elusi dilakukan bersamaan dengan bixin standar (88,8%). Eluen yang digunakan adalah *n*-heksana : EA dengan perbandingan 7:3.



Gambar 5. Hasil KLT fraksi hasil *flash chromatography* dibandingkan dengan bixin standar (a) pada UV 254 nm (b)

Senyawa yang memiliki karakteristik hampir sama akan menunjukkan nilai Rf relatif sama dan karakteristik spot yang sama pula. Hasil isolasi ekstrak kesumba menghasilkan 6 fraksi gabungan yaitu fraksi A–F yang memiliki nilai Rf mendekati bixin standar (88,8%) dan memiliki satu spot (data dapat dilihat pada Tabel 1). Berdasarkan hasil KLT tersebut (Gambar 5) dapat disimpulkan bahwa fraksi A memiliki nilai Rf yang sama dengan pigmen bixin.

Tabel 1. Nilai Rf hasil identifikasi pigmen bixin dari ekstrak kesumba dalam eluen *n*-heksana : EA (7:3)

Fraksi	No vial	Nilai Rf
Bixin standar	-	0,143
A	1-8	0,143
B	9-12	0,171
C	13-16	0,186
D	17	0,200
E	18	0,286
F	19	0,371

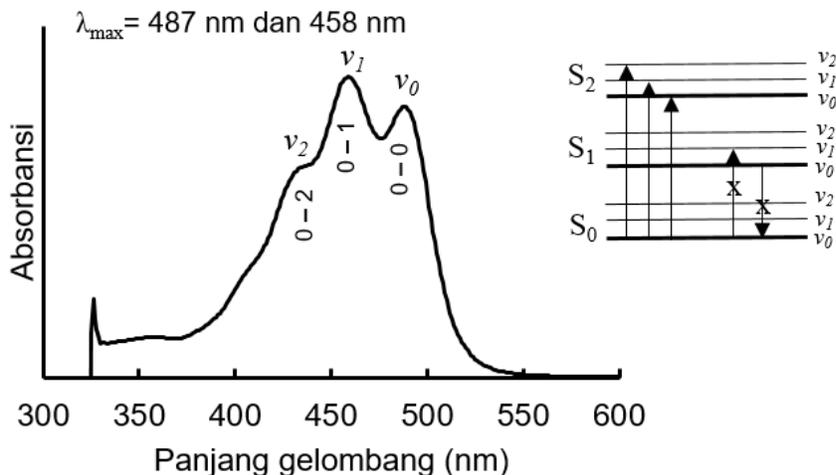
Filtrat fraksi A (Gambar 6) yang diperoleh kemudian dievaporasi untuk menghilangkan pelarut. Pigmen bixin yang diperoleh dari hasil ekstraksi dan isolasi biji kesumba adalah sebesar 125,5 mg (0,17% terhadap berat kering biji kesumba dan 6,28% terhadap berat ekstrak kasar yang digunakan pada proses isolasi).

Pigmen bixin hasil isolasi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis bertujuan untuk mengetahui karakteristik spektra absorpsi dari pigmen bixin fraksi A yang digunakan dalam penelitian ini. Analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan dengan melarutkan sejumlah tertentu sampel dalam pelarut aseton dan dilakukan *scanning* pada rentang panjang gelombang 350–600 nm. Rentang panjang gelombang ini dipilih sesuai dengan karakteristik pigmen bixin yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sebagai gugus kromofor, sehingga akan menghasilkan karakteristik spektra absorpsi yang kuat pada panjang gelombang diatas 400 nm (Rahmalia *et al.*, 2014).



Gambar 6. Filtrat pigmen bixin fraksi A hasil isolasi dengan metode *flash chromatography*

Karakteristik spektra elektronik pada bixin dapat terbentuk karena adanya ikatan rangkap terkonjugasi dan delokalisasi elektron π rantai poliena pada strukturnya (Scotter, 2009). Bixin memiliki tiga puncak karakteristik pada spektra absorpsi karena adanya beberapa tingkat vibrasi (ν_0 , ν_1 , ν_2) yang kemudian menghasilkan λ_{max} pada posisi pita $\nu_1(0-1)$ (Rahmalia *et al.*, 2015). Bixin hasil purifikasi dalam penelitian ini memiliki tiga puncak serapan pada panjang gelombang 430 nm, 458 nm dan 487 nm. Hasil yang diperoleh ini sesuai dengan panjang gelombang maksimum yang dihasilkan untuk puncak karakteristik *cis*-bixin dalam pelarut aseton pada penelitian yang dilakukan oleh Rahmalia *et al.* (2015).

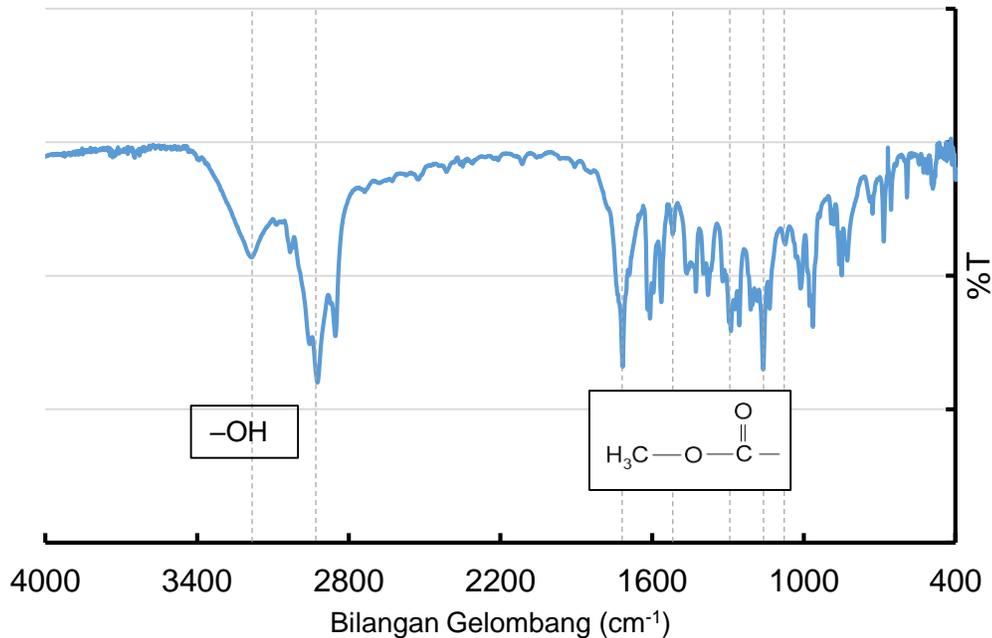


Gambar 7. Spektra absorpsi pigmen bixin dalam pelarut aseton

Tiga puncak maksimum yang terbentuk menunjukkan transisi elektronik yang terjadi pada struktur bixin. Transisi elektronik tersebut terjadi dari tingkat vibrasional paling rendah pada keadaan dasar ke tingkat vibrasional paling rendah pada keadaan tereksitasi (HOMO→LUMO). Puncak dengan absorpsi maksimal (v_1) pada 456 nm menunjukkan adanya transisi elektronik dari orbital $\pi \rightarrow \pi^*$ yang terjadi pada ikatan rangkap terkonjugasi dari rantai poliena. Puncak lainnya (v_0) yang muncul pada 487 nm menunjukkan transisi dari sistem konjugasi C = C dan C = O dari $\pi \rightarrow \pi^*$ (Yadav, 2005).

Spektra absorpsi bixin pada Gambar 7 menunjukkan pita serapan yang kuat sesuai dengan energi transisi yang khas untuk pigmen karotenoid yaitu transisi elektronik dari $S_0 \rightarrow S_2$. Transisi elektronik yang terjadi dari $S_0 (1^1A_g^-) \rightarrow S_2 (1^1B_u^+)$ menunjukkan dua jenis transisi $\pi \rightarrow \pi^*$. $S_0 (1^1A_g^-)$ menunjukkan keadaan dasar, $S_1 (2^1A_g^-)$ adalah keadaan tereksitasi terendah dan $S_2 (1^1B_u^+)$ adalah keadaan tereksitasi kedua (Christensen, 1999). Adanya transisi elektronik ini akan menunjukkan karakteristik tiga puncak struktur dari karotenoid yang sesuai dengan tiga pita vibrasi paling rendah dari transisi elektronik $S_0 \rightarrow S_2$, yang disebut 0-0, 0-1 dan 0-2 (Llansola-Portoles *et al.*, 2017). Energi transisi lainnya yaitu $S_0 (1^1A_g^-) \rightarrow S_1 (2^1A_g^-)$ tidak dapat terdeteksi pada pengukuran absorpsi standar karena puncak transisi yang dihasilkan terlalu lemah untuk dideteksi. Hal ini juga dapat disebabkan karena transisi yang terjadi (transisi $g \rightarrow g$) merupakan transisi terlarang menurut aturan simetri (Geldof *et al.*, 1971).

Spektrum bixin dari hasil analisis menggunakan FTIR (Gambar 8) menunjukkan pita pada daerah bilangan gelombang 3183 cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi untuk *stretching* -OH; pita yang muncul pada 3032 cm^{-1} menunjukkan vibrasi untuk *stretching* =C-H, pita pada daerah 2955 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} dan 2852 cm^{-1} menunjukkan vibrasi *bending* H-C-H (Gómez-Ortíz *et al.*, 2010); pita pada 1689 cm^{-1} menunjukkan vibrasi *stretching* untuk C=O karboksilat; 1716 cm^{-1} menunjukkan vibrasi untuk C=O ester (Dananjaya *et al.*, 2015); 1608 cm^{-1} , 1595 cm^{-1} dan 1563 cm^{-1} menunjukkan vibrasi untuk *stretching* C=C alkena; 1379 cm^{-1} menunjukkan vibrasi *bending* C-H untuk gugus metil; 1288 cm^{-1} menunjukkan vibrasi untuk *stretching* C-O; 1161 cm^{-1} dan 1255 cm^{-1} menunjukkan vibrasi simetrik dan asimetrik gugus ester C-O-C; 964 cm^{-1} menunjukkan vibrasi untuk (=C-H) *out of plane*; 849 cm^{-1} menunjukkan vibrasi *wagging out-of-plane* untuk C-H dan merupakan karakteristik untuk isomer *cis* karotenoid (Marshall, 1998).



Gambar 8. Spektra infrared pigmen bixin hasil isolasi dan purifikasi

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fraksi A yang berwarna merah jingga kemerahan dapat diidentifikasi sebagai pigmen bixin dengan massa 125,5 mg (0,17% terhadap berat kering biji kesumba dan 6,28% terhadap berat ekstrak kasar yang digunakan pada proses isolasi). Hal ini dapat diidentifikasi dari hasil analisa menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan menghasilkan tiga puncak serapan pada panjang gelombang 430 nm, 458 nm dan 487 nm. Hasil analisis menggunakan FTIR menunjukkan gugus fungsi yang sesuai dengan struktur bixin, yaitu pita pada 3183 cm^{-1} menunjukkan vibrasi *stretching* -OH , 1689 cm^{-1} menunjukkan vibrasi *stretching* untuk C=O karboksilat, 1716 cm^{-1} menunjukkan vibrasi untuk C=O ester, dan 1161 cm^{-1} dan 1255 cm^{-1} menunjukkan vibrasi simetrik dan asimetrik gugus ester C-O-C . Hasil analisis menggunakan KLT juga menunjukkan penampakan noda tunggal dan nilai R_f yang sama dengan bixin standar.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis tujukan kepada Dr. Ajuk Sapar, M.Si dan Adhitiyawarman, M.Si., Ph.D atas diskusi, masukan dan saran dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Braithwaite, A., and Smith, F. J., 1999, *Chromatographic Methods*, Kluwer Academic Publishers : New York, USA
- Butnariu, M., 2016, Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products, *Journal of Ecosystem & Ecography*, 6(2).
- Christensen, R. L., 1999, *The Electronic State of Carotenoids In: Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J. (eds) The Photochemistry of Carotenoids. Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol 8*. Springer International Publishing : New York
- Dananjaya, S. H. S., Munasinghe, D. M. S., Ariyaratne, H. B. S., Lee, J., and De Zoysa, M., 2015, Natural Bixin as a Potential Carotenoid for Enhancing Pigmentation and Colour in Goldfish (*Carassius auratus*), *Aquaculture Nutrition*, 23(2), 255–263.

- Geldof, P.A., Rettschnick, R.P.H., and Hoythink, G., 1971, Vibronic Coupling and Radiative Transitions, *ChemPhys Lett*, 10:549-558
- Giridhar, P., Venugopalan, A., and Parimalan, R., 2014, A Review on Annatto Dye Extraction, Analysis and Processing – A Food Technology Perspective, *Journal of Scientific Research and Reports*, 3(2), 327–348.
- Gómez-Ortíz, N. M., Vázquez-Maldonado, I. A., Pérez-Espadas, A. R., Mena-Rejón, G. J., Azamar-Barrios, J. A., and Oskam, G., 2010, Dye-sensitized solar cells with natural dyes extracted from achiote seeds, *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 94(1), 40–44.
- Koul, V. K., Koul, S., and Tikoo, C. L., 2003, Process Optimization for Extraction and Purification of Bixin from Annatto, *Indian Journal of Chemical Technology*, 10(5), 545–547.
- Llansola-Portoles, M. J., Pascal, A. A., and Robert, B., 2017, Electronic and Vibrational Properties of Carotenoids: From In Vitro to In Vivo, *Journal of the Royal Society Interface*, 14(135).
- M. Olson, D.N. Allen, 2010, Natural photodynamic agents and their use, US20100266716.
- Marshall, J., 1998, Fourier Transform Infrared Spectra of Freshly Isolated β -Carotene, *Asian Journal of Chemistry*, 10(1), 29–34.
- Montenegro, M. A., Rios, A. D. O., Mercadante, A. Z., Nazareno, M. A., and Borsarelli, C. D., 2004, Model Studies on the Photosensitized Isomerization of Bixin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 367–373.
- Paliwal, H.; Goyal, S.; Singla, S. and Daksh. S., 2016, Pigments from natural sources: An overview, *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1 (3):1-12
- Rahmalia, W., Fabre, J. F., Usman, T., and Mouloungui, Z., 2014, Aprotic solvents effect on the UV-visible absorption spectra of bixin, *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 131, 455–460.
- Rahmalia, W., Fabre, J.-F., and Mouloungui, Z., 2015, Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method, *Procedia Chemistry*, 14, 455–464.
- Rao, M. P., Manjunath, K., Bhagawati, S. T., and Thippeswami, B. S., 2014, Bixin Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Enhanced Hepatoprotection - Preparation, Characterisation and In Vivo Evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, 473(1–2), 485–492.
- Ribeiro, J. A., Oliveira, D. T., Passos, M. L., and Barrozo, M. A. S., 2005, The use of nonlinearity measures to discriminate the equilibrium moisture equations for Bixa orellana seeds, *Journal of Food Engineering*, 66(1), 63–68.
- Rios, A.O., Borsarelli, C.D., and Mercadante A.Z., 2005, Thermal Degradation Kinetics of Bixin in an Aqueous Model System, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2307-2311
- Scotter, M. J., 1995, Characterisation of The Coloured Thermal Degradation Products of Bixin from Annatto and A Revised Mechanism for Their Formation, *Food Chemistry*, 53(2), 177–185.
- Scotter, M., 2009, The Chemistry and Analysis of Annatto Food Colouring: A Review, *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26(8), 1–21.
- Sherma, J. and Fried, B., 2003, *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, Marcel Dekker Inc : New York
- Spangenberg, B., Poole, C. F., and Weins, Ch., 2011, *Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey*, Springer : New York
- Yadav, 2005, *Organic Spectroscopy*. Kluwer Academic Publishers : New York, USA