

**EKSTRAKSI PIGMEN BIKSIN DARI BIJI KESUMBA (*Bixa orellana* L.)
DENGAN METODE *MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION* (MAE)
DAN KARAKTERISASINYA**

Skripsi

**Disusun untuk melengkapi syarat-syarat
guna memperoleh gelar Sarjana Sains**



**Yuni Astuti
3325111349**

**PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA**

2015

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**EKSTRAKSI PIGMEN BIKSIN DARI BIJI KESUMBA (*Bixa orellana* L.)
DENGAN METODE *MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION* (MAE)
DAN KARAKTERISASINYA**

Nama : Yuni Astuti
No. Registrasi : 3325111349

	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab			
Dekan	: <u>Prof. Dr. Suyono, M.Si</u> NIP. 19671218 199303 1 005		29/07/2015
Wakil Penanggung Jawab			
Pembantu Dekan I	: <u>Dr. Muktiningsih, M.Si</u> NIP. 19640511 198903 2 001		28/07/2015
Ketua	: <u>Dr. Yusmaniar, M.Si</u> NIP. 19620626 199602 2 001		29/07/2015
Sekretaris	: <u>Dr. Fera Kurniadewi, M.Si</u> NIP. 19761231 200112 2 002		23/07/2015
Anggota			
Pembimbing I	: <u>Dr. Erdawati, M.Sc</u> NIP. 19510912 198103 2 001		23/07/2015
Pembimbing II	: <u>Dr. Imam Santoso, M.Si</u> NIP. 19640917 1990033 1 018		27/07/2015
Penguji	: <u>Dr. Afrizal, M.Si</u> NIP. 19730416 199903 1 002		23/07/2015

Dinyatakan lulus ujian skripsi tanggal: 13 Juli 2015

Alhamdulillahirobbil'alamin

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga skripsi ini dapat ku selesaikan tepat waktu.

Dengan rasa senang dan bangga ku persembahkan skripsi hasil jerih payah ku selama ini teruntuk :

♥ *Bapak dan Ibu tercinta*

Telah memberikan kasih sayang dan doa yang tak henti untukku hingga akhirnya dapat terselesaikan tanggung jawab ku sebagai mahasiswa S1

♥ *Kakak-Kakakku tersayang, Mba Erna dan Bang Bowo*

Selalu membantu, mendukung, serta mendoakan ku dalam menggapai cita-cita.

♥ *Teman-teman Kimia 2011*

Telah memberikan persahabatan, persaudaraan, dan cerita indah yang tak terlupakan selama masa kuliah.

Dan semua yang tak bisa ku sebutkan satu per satu, ku ucapkan terima kasih atas bantuan, dukungan, dan doanya dalam penulisan skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa membalasnya.

Terima Kasih... 😊😊

ABSTRAK

YUNI ASTUTI. Ekstraksi Pigmen Biksin dari Biji Kesumba (*Bixa orellana* L.) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) dan Karakterisasinya. Skripsi. Jakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Jakarta. 2015.

Penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi pigmen biksin dari biji kesumba dan mengetahui pengaruh waktu ekstraksi (5,10,15 menit) dan rasio pelarut akuades:etil asetat (1:6.5, 1:7, 1:8 v/v) terhadap perolehan pigmen biksin. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah MAE (*Microwave Assisted Extraction*). Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kondisi optimum dari dua variabel pada rasio pelarut akuades:etil asetat (1:7 v/v) dengan waktu ekstraksi selama 15 menit yang menghasilkan perolehan pigmen biksin maksimum sebesar 0,469 %. Dilakukan uji kemurnian dengan titik leleh dan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan campuran eluen aseton:n-heksana (1:2 v/v) dan etil asetat:kloroform (1:3 v/v). Senyawa hasil ekstraksi dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer Infra Merah, spektrometer massa, dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menunjukkan bahwa hasil ekstraksi merupakan pigmen biksin yang memiliki berat molekul sebesar 394.2 g/mol dengan bilangan gelombang untuk regangan gugus OH karboksilat yang tidak berikatan hidrogen, ikatan C-H, C=O karboksilat, ikatan rangkap C=C, dan ikatan C-O ester. Serta menunjukkan waktu retensi komponen pigmen biksin pada menit ke 12.849.

Kata kunci : *Bixa orellana* L., Biksin, *Microwave Assisted Extraction* (MAE), Spektrofotometer Infra Merah, Spektrometer Massa, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Ekstraksi Pigmen Biksin dari Biji Kesumba (*Bixa orellana* L.) dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) dan Karakterisasinya”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat memperoleh gelar Sarjana Sains untuk Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Dr. Erdawati, M.Sc dan Dr. Imam Santoso, M.Si selaku dosen pembimbing I dan dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dan saran kepada penulis sehingga skripsi ini dapat selesai tepat waktu. Penulis juga berterima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi ini, yaitu:

1. Bapak Drs. Sukro Muhab, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia dan Ibu Dr. Yusmaniar, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia.
2. Bapak Arif Rahman, M.Sc selaku pembimbing akademik selama menjalani masa perkuliahan.
3. Bapak Drs. Zulhipri, M.Si selaku Kepala Laboratorium Kimia.

4. Keluarga tercinta; Ibu, Bapak, Mba Erna, dan Bang Bowo yang senantiasa mendoakan dan mendukung saya baik secara moril maupun materil.
5. Sahabat-sahabat tersayang, Karina Anggraini dan Riyana Monita atas perhatian, semangat, dan waktunya dalam suka maupun duka.
6. Bapak Dadang dan Ibu Dedi dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro) yang telah membantu saya memperoleh biji kesumba.
7. Ibu Dr. Fera Kurniadewi, M.Si yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk konsultasi penelitian saya.
8. Bapak Hanhan Dianhar, M.Si yang telah membantu saya dalam karakterisasi sampel dengan spektrometer massa.
9. Richard A. Tigor, Risa Purwaningsih, dan Kak Yulinar (Kimia 2009) yang baik hati, yang telah banyak membantu dan bersedia menjadi tempat bertukar pikiran.
10. Ibu Adnum, Ibu Dwi, Ibu Ima, Mba Rina, Uni dan Mas Edit selaku laboran yang telah membantu selama penelitian di laboratorium.
11. Teman-teman dari Kimia 2011 atas kebersamaan dan kekeluargaannya selama ini.
12. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam skripsi ini terdapat banyak kekurangan dan masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan adanya kritik dan saran yang membangun dari semua pihak.

Jakarta, Juli 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Identifikasi Masalah	4
C. Pembatasan Masalah	5
D. Perumusan Masalah.....	5
E. Tujuan Penelitian	6
F. Manfaat Penelitian	6
BAB II.....	7
KAJIAN PUSTAKA.....	7
A. Tanaman Kesumba (<i>Bixa orellana</i> Linn).....	7
B. Pigmen Biksin	9
C. Gelombang Mikro.....	11
D. <i>Microwave Assisted Extraction</i> (MAE)	17
E. Uji Kemurnian	21
F. Identifikasi Struktur Molekul	24
1. Spektroskopi Massa.....	24
2. Spektroskopi Infra Merah.....	25
G. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	27
BAB III.....	31
METODOLOGI PENELITIAN.....	31
A. Tujuan Operasional Penelitian.....	31

B. Tempat dan Waktu Penelitian	31
C. Metode Penelitian	31
D. Alat dan Bahan	32
E. Instrumentasi	32
F. Prosedur Penelitian.....	34
1. Ekstraksi Biksin dengan metode <i>Microwave Assisted Extraction</i> (MAE)	34
a) Pengaruh Waktu Ekstraksi terhadap Perolehan Pigmen Biksin.....	34
b) Pengaruh Rasio Pelarut terhadap Perolehan Pigmen Biksin.....	36
2. Identifikasi Struktur Molekul Pigmen Biksin	38
3. Identifikasi Komponen Pigmen Biksin dengan KCKT	38
BAB IV	39
HASIL DAN PEMBAHASAN	39
A. Ekstraksi Pigmen Biksin dengan Metode <i>Microwave Assisted Extraction</i> (MAE).....	39
1. Pengaruh Waktu Ekstraksi pada Metode MAE terhadap Perolehan Pigmen Biksin	41
2. Pengaruh Rasio Pelarut pada Metode MAE terhadap Perolehan Pigmen Biksin	44
B. Uji Kemurnian Pigmen Biksin	47
C. Identifikasi Struktur Molekul Pigmen Biksin	49
1. Spektrofotometer Infra Merah.....	49
2. Spektrometer Massa	52
D. Identifikasi Komponen Pigmen Biksin dengan KCKT	53
BAB V	56
KESIMPULAN DAN SARAN	56
A. Kesimpulan.....	56
B. Saran.....	57
DAFTAR PUSTAKA.....	58
LAMPIRAN.....	61

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Buah kesumba dan bijinya	8
Gambar 2. Struktur Biksin (Chemspider, 2014)	11
Gambar 3. Spektrum Elektromagnetik dan Posisi Gelombang Mikro (Stein, 1994)	12
Gambar 4. Efek gelombang mikro pada molekul air, a) Sesudah adanya gelombang mikro, b) sebelum adanya gelombang mikro (Jain et al., 2009)	14
Gambar 5. Skema alat <i>Microwave Assisted Extraction</i> (MAE)	18
Gambar 6. Mekanisme Perpindahan Panas dan Massa dalam Metode Ekstraksi Berbantu Gelombang Mikro (MAE) dan Konvensional (Veggi <i>et al.</i> , 2013).....	21
Gambar 7. Spektrum dari Spektroskopi Massa Biksin (Christe <i>et al.</i> , 2011)	25
Gambar 8. Spektrum Infra Merah (IR) Biksin (Oskam <i>et al.</i> , 2010)	27
Gambar 9. Prinsip dari (a) Kurva Kalibrasi Standar Eksternal, dan (b) Kurva Kalibrasi Standar Internal (Chromacademy, 2014).....	29
Gambar 10. Kromatogram KCKT Biksin (Rios <i>et al.</i> , 2005)	30
Gambar 11. Oven Gelombang Mikro yang telah dimodifikasi	34
Gambar 12. a) Hasil ekstrak yang terdiri dari dua fasa, b) Fasa etil asetat yang telah ditampung	41
Gambar 13. Grafik Waktu Ekstraksi terhadap Perolehan Pigmen Biksin	42

Gambar 14. Grafik Rasio Pelarut terhadap Perolehan Pigmen Biksin	45
Gambar 15. Kromatogram KLT dengan fase gerak a). aseton:n-heksana (1:2 v/v), b). etil asetat:kloroform (1:3 v/v)	48
Gambar 16 . Spektrum IR Kristal Biksin.....	50
Gambar 17. Spektrum IR Biksin dari literatur.....	52
Gambar 18. a) Kromatogram Biksin standar, b) Kromatogram Sampel biksin yang diukur pada panjang gelombang 450 nm.	54

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Komposisi biji kesumba (Sitompul et al., 2012).....	9
Tabel 2. Konstanta Fisik untuk beberapa pelarut (Jain et al., 2009).....	16
Tabel 3. Perbedaan Metode Microwave Assisted Extraction (MAE) dengan Metode Konvensional (Solanki et al., 2010) ..	19
Tabel 4. Hasil Perolehan Pigmen Biksin dari Perlakuan Waktu Ekstraksi.....	42
Tabel 5. Hasil Perolehan Pigmen Biksin dari Perlakuan Rasio Pelarut.....	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Bagan Kerja Ekstraksi Pigmen Biksin dengan Metode MAE (Penentuan Waktu Optimum).....	61
Lampiran 2. Bagan Kerja Ekstraksi Pigmen Biksin dengan Metode MAE (Penentuan Rasio Pelarut Optimum)	63
Lampiran 3. Perhitungan Perolehan Pigmen Biksin.....	65
Lampiran 4. Bagan Kerja Uji Kemurnian Pigmen Biksin	66
Lampiran 5. Bagan Kerja Identifikasi Struktur Molekul Pigmen Biksin dengan Spektrofotometer IR dan Spektrometer Massa ...	67
Lampiran 6. Bagan Kerja Identifikasi Komponen Pigmen Biksin dengan KCKT.....	68
Lampiran 7. Spektrum IR Pigmen Biksin	69
Lampiran 8. Spektrum Massa Pigmen Biksin	70
Lampiran 9. Kromatogram KCKT Biksin Standar.....	71
Lampiran 10. Kromatogram KCKT Pigmen Biksin	72
Lampiran 11. Spektrum UV-Vis Biksin Standar dan Pigmen Biksin	73

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Warna merupakan suatu pelengkap daya tarik pada makanan dan minuman. Penambahan zat warna dalam makanan dan minuman mempunyai pengaruh yang sangat besar terhadap selera dan daya tarik konsumen. Zat pewarna secara luas digunakan di seluruh dunia, baik pewarna sintetis maupun pewarna alami. Saat ini, lebih dari 100.000 pewarna tersedia secara komersial. Di seluruh dunia, hampir 1 juta ton pewarna sintetis diproduksi setiap tahunnya (Sinha *et al.*, 2013). Namun, bahaya yang ditimbulkan oleh pewarna sintesis terhadap tubuh menyebabkan pemakaiannya di dalam makanan dan minuman diawasi ketat oleh suatu institusi dalam suatu negara, seperti Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) dan *Food and Drug Administration* (FDA).

Berdasarkan permasalahan tersebut, banyak penelitian yang berupaya menemukan zat warna alami. Pewarna alami menjadi pilihan yang paling tepat karena pewarna alami yang berasal dari flora dan fauna dianggap aman dan tidak beracun, non-alergi, non-karsinogenik dan sifatnya yang *biodegradable*. Pewarna alami tidak

memberikan masalah lingkungan pada tahap produksi atau penggunaan dan mempertahankan keseimbangan ekologi (Sinha *et al.*, 2013). Salah satu tanaman yang memiliki zat warna alami adalah kesumba (*Bixa orellana L.*). Tanaman kesumba (*Bixa orellana L.*) adalah pohon kecil yang memiliki tinggi 3-9 m dan berasal dari daerah tropis di Amerika Selatan. Tanaman ini banyak dibudidayakan di Afrika, Brazil, India, dan negara-negara tropis lainnya termasuk Indonesia. Tanaman ini di Indonesia dikenal dengan nama yang berbeda-beda di antaranya: kesumba keling (Jawa), galinggem (Sunda), taluka (Ambon), parada (Bugis), dan kasumbo (Nias). Bagian tanaman yang mengandung zat warna alami terdapat pada bagian bijinya. Biji kesumba mengandung pigmen kuning hingga merah yang merupakan campuran pigmen karotenoid seperti biksin dan norbiksin.

Berbagai metode telah dikembangkan untuk mengekstraksi pewarna alami dari berbagai tumbuhan, seperti maserasi, soklet, ekstraksi cair cair, dan hidrodestilasi. Namun, metode-metode tersebut menggunakan pelarut dengan jumlah yang banyak dan waktu ekstraksi yang lama. Oleh karena itu dibutuhkan teknik baru untuk meningkatkan mekanisme ekstraksi pewarna alami seperti pecahnya dinding sel, pelepasan pewarna alami, dan perpindahan zat pewarna ke dalam pelarut.

Salah satu metode ekstraksi yang sedang berkembang pesat adalah metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE). Proses ekstraksi pada metode MAE menggunakan gelombang mikro yang memiliki kelebihan diantaranya: mengurangi konsumsi energi, pelarut yang sedikit, waktu ekstraksi yang singkat, dan jumlah limbah yang sedikit. Pada penelitian sebelumnya, Vasu *et al.* (2010) telah menggunakan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) untuk mengekstraksi biksin dari *Bixa orellana* dan aktivitas antioksidan in-vitro. Hasil penelitiannya menunjukkan pemanasan gelombang mikro pada 210 W selama 18 menit menghasilkan rendemen sebesar 16.281 % dan pemanasan konvensional menghasilkan rendemen sebesar 8.231 % selama 90 menit. Hasil ini menunjukkan bahwa dengan metode MAE waktu ekstraksi 72 menit lebih cepat dan rendemen yang besar dibandingkan dengan metode soklet. Sinha *et al.* (2013) menggunakan metode MAE untuk mengekstraksi pewarna alami dari biji kesumba (*Bixa orellana*) dengan *response surface methodology* (RSM) dan *artificial neural network* (ANN). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa metode MAE terhadap pewarna alami kuning-merah dari biji kesumba dengan parameter pH, waktu ekstraksi, dan jumlah biji kesumba menunjukkan bahwa ANN memiliki prediksi yang lebih baik dari RSM. Sedangkan penelitian Mosquera *et al.* (2013) tentang aplikasi teknologi gelombang mikro terhadap ekstraksi

bahan alam dari buah Amazonian menunjukkan bahwa metode MAE dapat digunakan untuk ekstraksi pigmen seperti untuk tanaman carayuru (*Arrabidaea chica*) dan achiote (*Bixa orellana*) yang menghasilkan rendemen masing-masing sebesar 19 % dan 11,4 % pada 50 % daya maksimum selama 15 menit.

Berdasarkan kelebihan dari metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) maka penelitian ini menggunakan metode tersebut untuk mengekstraksi pigmen biksin dari biji kesumba (*Bixa orellana*) dengan perolehan pigmen biksin yang besar.

B. Identifikasi Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah diatas, masalah yang dapat muncul dalam penelitian ini diantaranya:

1. Apakah metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) tepat untuk mengekstraksi pigmen biksin dari biji kesumba?
2. Berapa lama waktu ekstraksi dengan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) yang tepat untuk menghasilkan perolehan pigmen biksin (%) yang besar?
3. Berapa rasio pelarut dengan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) yang diperlukan untuk menghasilkan perolehan pigmen biksin (%) yang besar?
4. Bagaimana cara pemilihan pelarut dalam proses ekstraksi dengan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE)?

5. Apakah pelarut yang digunakan mempengaruhi proses ekstraksi dengan gelombang mikro?
6. Apakah hasil ekstrak yang didapat berupa senyawa biksin?
7. Komponen pigmen apa saja yang terdapat pada hasil ekstrak?

C. Pembatasan Masalah

Pada penelitian ini masalah yang dikaji dibatasi untuk mengetahui pengaruh waktu ekstraksi dan rasio pelarut pada metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) terhadap perolehan pigmen biksin, menginterpretasikan senyawa hasil ekstrak yang didapat dengan spektrofotometer Infra Merah dan spektrometer massa, dan mengidentifikasi komponen pigmen hasil ekstrak dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

D. Perumusan Masalah

Berdasarkan pembatasan masalah diatas, perumusan masalah pada penelitian ini adalah:

- 1 Bagaimanakah kondisi optimum dari waktu ekstraksi dan rasio pelarut dalam menghasilkan perolehan pigmen biksin (%) yang besar pada metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE)?
- 2 Apakah hasil ekstrak yang didapatkan berupa senyawa biksin?

- 3 Komponen pigmen apa saja yang terdapat pada hasil ekstrak yang diukur menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)?

E. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu ekstraksi dan rasio pelarut pada metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) terhadap perolehan pigmen biksin serta mengidentifikasi struktur molekul dan komponen pigmen dari senyawa hasil ekstrak.

F. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pigmen alami yang terdapat dalam biji kesumba (*Bixa orellana* L.) serta memberikan alternatif metode ekstraksi yang lebih ramah lingkungan dengan bantuan gelombang mikro.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA

A. Tanaman Kesumba (*Bixa orellana Linn*)

Kesumba adalah tanaman yang berasal dari famili Bixaceae. Kesumba merupakan pohon tropis dari Amerika Selatan yang memiliki pigmen alami berwarna kuning hingga merah yang diperoleh dari lapisan luar bijinya (Tabel.1)(Giridhar *et al.*, 2012). Tanaman kesumba tersebar di daerah tropis lainnya seperti Brazil, India, Afrika, Portugis serta Indonesia. Tanaman ini di Indonesia termasuk tanaman liar yang tumbuh di pinggir-pinggir jalan maupun sebagai tanaman hias. Tanaman kesumba memiliki buah mirip seperti rambutan. Buah berbentuk pipih dan jika sudah tua buah mekah menjadi dua bagian. Di dalam buah terdapat biji sekitar 45-55 butir dan diselubungi daging berwarna merah jingga. Berat biji kesumba sebesar 0,5-2 gram dalam setiap buahnya. Nama kesumba pada beberapa daerah di Indonesia bermacam-macam, diantaranya Kesumba keling (Jawa), galinggem (Sunda), taluka (Ambon), parada (Bugis), sedangkan nama asingnya adalah annatto (Inggris), urucum (Portugis), dan achiote (Spanyol).

Pigmen utama yang terdapat pada biji kesumba adalah karotenoid biksin dan norbiksin (Rodrigues *et al.*, 2014). Biji kesumba mengandung pewarna alami yang banyak digunakan

dalam industri farmasi, kosmetik, dan produk makanan seperti pada keju, es krim, mentega, sereal, dan sosis (Vasu *et al.*, 2010). Hal ini dikarenakan pigmen biksin memiliki intensitas warna yang baik, stabilitas yang lebih besar dan berbagai variasi warna dari kuning hingga merah. Rentang warna merupakan keuntungan tambahan dari karotenoid pada biji kesumba terhadap karotenoid lainnya. Seperti wortel dan bit, yang hanya menunjukkan warna masing-masing (Silva *et al.*, 2008).



Gambar 1. Buah kesumba dan bijinya

Klasifikasi tanaman Kesumba (*Bixa Orellana L.*) adalah sebagai berikut (Plantamor, 2014) :

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)

Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (Berkeping dua/ dikotil)
Sub Kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Violales
Famili	: Bixaceae
Genus	: Bixa
Spesies	: <i>Bixa orellana</i> L.

Komposisi biji kesumba terdiri dari lapisan terluar (aril) dimana pada lapisan ini terdapat zat warna (pigmen), kulit biji dan biji terdalam (kernel). Berikut ini adalah kandungan dari setiap lapisan pada biji kesumba:

Tabel 1. Komposisi biji kesumba (Sitompul *et al.*, 2012)

Lapisan	Kandungan
Biji terdalam (kernel)	Minyak, substansi lilin, abu mineral, dan komponen alkaloid
Kulit biji	Selulosa dan tannin
Lapisan terluar (aril)	Pigmen, air, dan sedikit minyak

B. Pigmen Biksin

Biksin (Metil hidrogen-9'-cis-6,6'-diapokaroten-6,6'-dioat) adalah pigmen karotenoid yang tidak larut dalam air dan terdiri dari rantai ikatan rangkap terkonjugasi dengan gugus asam karboksilat

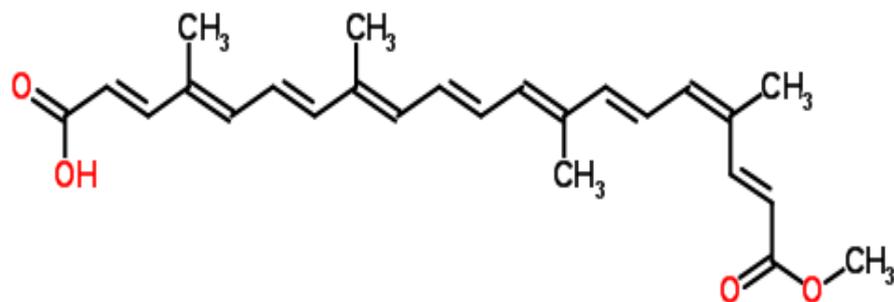
di salah satu ujung rantai dan gugus metil ester pada ujung yang lain (Oskam *et al.*, 2010). Ikatan rangkap terkonjugasi ini bertindak sebagai kromofor. Struktur biksin berfungsi untuk penyerapan cahaya dan aktivitas antioksidan. Oleh karena itu, pigmen ini menjadi kandidat yang sangat baik untuk pigmen alami yang dapat digunakan dalam kosmetik, farmasi, dan industri makanan. Tidak seperti β -karoten yang tersebar luas di sayuran dan buah, biksin hanya dapat ditemukan pada biji kesumba dan terdiri lebih dari 80% total kandungan karotenoid pada bijinya (Rodrigues *et al.*, 2014).

Biksin memiliki rumus molekul $C_{25}H_{30}O_4$. Hidrolisis dari gugus metil ester pada biksin menghasilkan asam dikarboksilat yaitu norbiksin ($C_{24}H_{28}O_4$) yang merupakan pigmen kesumba larut dalam larutan alkali berair (Giridhar *et al.*, 2012). Biksin bersifat rentan terhadap degradasi oksidatif, seperti sifat karotenoid yang lain. Biksin tidak stabil dengan adanya oksigen, panas, cahaya, dan pH (Noppe *et al.*, 2008). Oleh karena itu, dalam proses ekstraksi pada biji kesumba perlu diperhatikan beberapa faktor seperti pelarut, pH, suhu, dan waktu ekstraksi.

Berdasarkan struktur molekulnya, biksin merupakan senyawa non polar dan menunjukkan afinitas yang tinggi untuk pelarut berkepolaran medium seperti aseton, etil asetat, metanol, dan etanol. Berdasarkan penelitian cardarelli *et al.* (2008), etil

asetat memiliki efisiensi kelarutan paling tinggi untuk ekstraksi biksin dari biji kesumba. Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan pelarut etil asetat untuk ekstraksi biksin dari biji kesumba.

Berikut ini adalah struktur molekul biksin;



Gambar 2. Struktur Biksin (Chemspider, 2014)

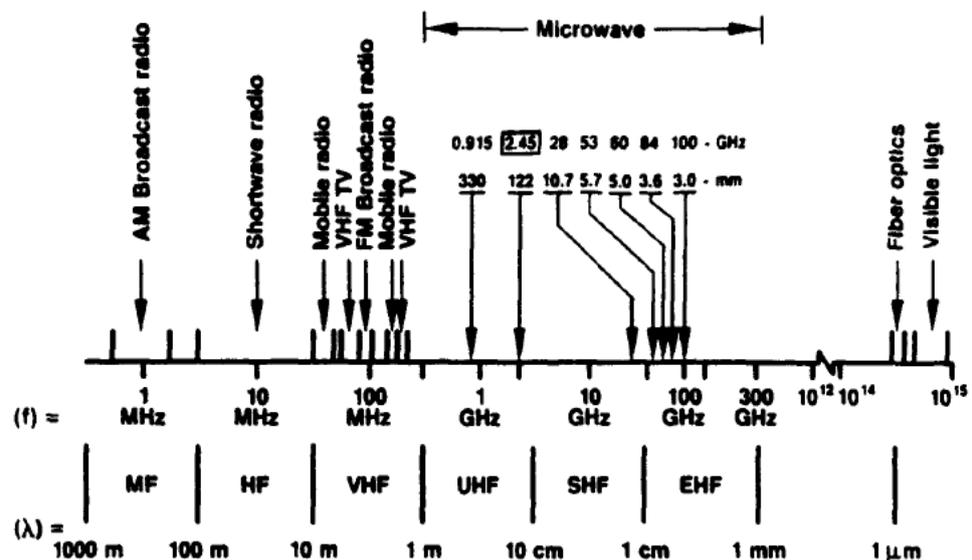
C. Gelombang Mikro

Gelombang mikro adalah bentuk energi elektromagnetik yang memiliki panjang gelombang antara 1 mm sampai 1 m dengan frekuensi 300 MHz sampai 300 GHz (Cardoso-ugarte *et al.*, 2013). Gelombang mikro merupakan gelombang elektromagnetik yang timbul akibat adanya perubahan medan listrik yang diikuti oleh perubahan medan magnet secara terus menerus yang merambat ke segala arah. Medan listrik dan medan magnet saling tegak lurus dan keduanya tegak lurus terhadap arah perambatan gelombang. Aplikasi kedua medan ini adalah interaksi langsung gelombang

terhadap bahan yang mampu menyerap energi elektromagnetik dan mengubahnya menjadi panas.

Gelombang mikro tidak hanya dapat membuat pemanasan lebih efektif dan selektif, tetapi juga membantu untuk mempercepat perpindahan energi, respon terhadap kontrol pemanas dan mengurangi gradien termal, ukuran peralatan, dan unit operasi (Li *et al.*, 2013).

Berikut ini adalah posisi gelombang mikro dalam spektrum elektromagnetik:



Gambar 3. Spektrum Elektromagnetik dan Posisi Gelombang Mikro (Stein, 1994)

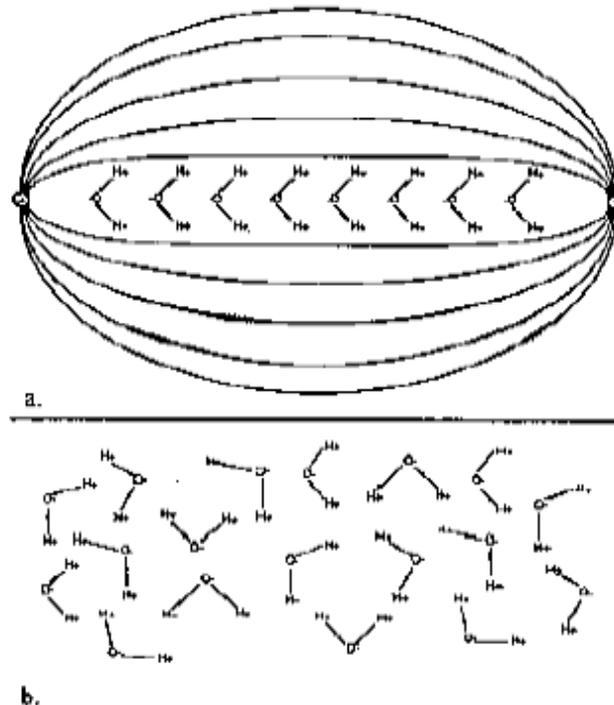
Prinsip pemanasan gelombang mikro adalah berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan materi. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan materi memiliki 3 proses yang berbeda,

diantaranya transmisi, absorpsi, dan refleksi. Pada interaksi transmisi, gelombang masuk ke dalam partikel materi lalu ditransmisikan (dikeluarkan kembali) setelah berinteraksi dengan materi, Pada interaksi absorpsi, gelombang mikro masuk ke dalam partikel materi dan berinteraksi dengan materi tersebut. sedangkan pada interaksi refleksi, gelombang mikro mengenai partikel di bagian luar (tidak sampai masuk ke dalam), kemudian dipantulkan kembali. Oleh karena itu, perubahan energi gelombang mikro menjadi panas dipengaruhi oleh sifat bahan yang digunakan.

Perubahan energi gelombang mikro menjadi energi panas terjadi melalui dua fenomena yaitu konduksi ionik dan rotasi dipol. Dalam banyak kasus, kedua fenomena tersebut berjalan secara simultan, yang secara efektif mengubah energi gelombang mikro menjadi energi panas. Konduksi ionik mengarah pada migrasi elektrophoretik ion dalam pengaruh perubahan medan listrik. Resistansi yang ditimbulkan oleh larutan terhadap proses migrasi ion menyebabkan tumbukan antarmolekul yang akan menghasilkan energi kalor dan meningkatkan suhu sekitarnya (Veggi *et al.*, 2013). Selain itu, migrasi ion terlarut meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam matriks sehingga membawa senyawa analit.

Rotasi dipol merupakan fenomena penyusunan ulang dari molekul-molekul dipol akibat adanya perubahan medan listrik yang cepat (Anwar *et al.*, 2011). Fenomena ini hanya terjadi pada 2450

MHz atau frekuensi kerja oven gelombang mikro, dimana komponen listrik dari gelombang mikro berubah $4,9 \times 10^4$ kali per detik, yang menyebabkan pemanasan menjadi cepat. Sehingga semakin besar momen dipol molekul, osilasi dalam medan gelombang mikro akan semakin kuat. Proses rotasi dari molekul air dapat dilihat pada gambar 4, adanya pengaruh gelombang mikro menyebabkan molekul air menjadi lebih teratur dan berjajar. Adanya perubahan medan listrik yang cepat pada gelombang mikro menyebabkan molekul air mengalami rotasi dipol. Peristiwa rotasi dipol ini yang mengubah energi gelombang mikro menjadi panas akibat rotasi molekul tersebut.



Gambar 4. Efek gelombang mikro pada molekul air, a) Sesudah adanya gelombang mikro, b) sebelum adanya gelombang mikro (Jain *et al.*, 2009)

Pada pemanasan gelombang mikro terdapat dua parameter penting yang mendefinisikan sifat dielektik bahan yaitu konstanta dielektrik (ϵ') dan *dielectric loss factor* (ϵ''). Konstanta dielektrik menunjukkan kepolaran dari molekul di dalam sebuah medan listrik. Sedangkan *dielectric loss factor* mengukur efisiensi pelarut dalam mengubah energi gelombang mikro menjadi panas. Kedua parameter ini berubah dengan meningkatnya frekuensi gelombang mikro. Rasio dari kedua parameter tersebut menghasilkan faktor disipasi (δ) (Lindstrom *et al.*, 2001)

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'}$$

Faktor disipasi adalah ukuran kemampuan pelarut untuk menyerap gelombang mikro dan mengubahnya menjadi panas. Nilai konstanta dielektrik, *dielectric loss factor* dan faktor disipasi untuk beberapa pelarut dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Konstanta Fisik untuk beberapa pelarut (Jain *et al.*, 2009)

Pelarut	Konstanta dielektrik (ϵ') F/m	<i>Dielectric Loss Factor</i> (ϵ'') F/m	Tan $\delta \times 10^4$
Air	80	12	1500
Aseton	20.7	11.5	5555
Metanol	23.9	15.2	6400
Etanol	7	1.6	2286
Hexane	1.88	0.00019	0.10
Etil Asetat	6.02	3.2	5316

Penerapan gelombang mikro dalam proses pemisahan seperti ekstraksi telah terbukti mengurangi waktu ekstraksi dan volume pelarut yang dibutuhkan, meminimalkan dampak lingkungan dengan memancarkan lebih sedikit CO₂ di atmosfer dan memerlukan energi yang lebih kecil dari energi yang digunakan dalam metode ekstraksi konvensional. Kemajuan ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro telah menyebabkan pengembangan dalam berbagai teknik seperti *microwave hydro distillation* (MWHD), *vacuum microwave hydro distillation* (VMHD), *microwave by hydro diffusion and gravity* (MHG), *microwave assisted extraction* (MAE) dan *solvent-free microwave extraction* (SFME) (Cardoso-ugarte *et al.*, 2013).

Oleh karena itu, penelitian ini menggunakan salah satu teknik ekstraksi menggunakan gelombang mikro yaitu *microwave assisted extraction* (MAE).

D. *Microwave Assisted Extraction* (MAE)

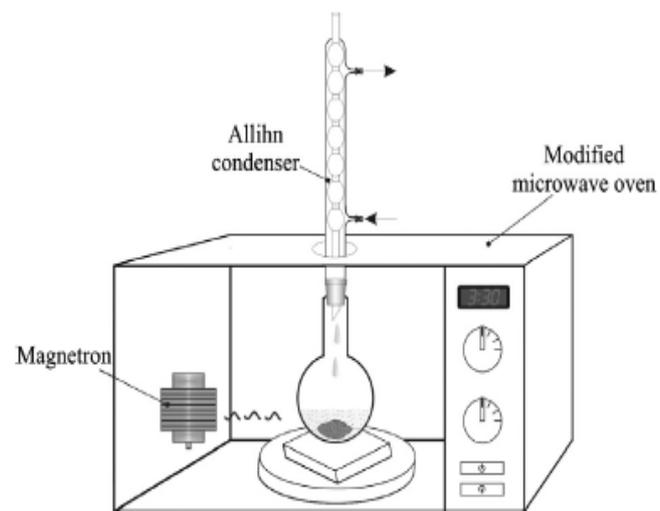
Ekstraksi berbantu gelombang mikro (MAE) adalah metode ekstraksi yang relatif baru dimana energi gelombang mikro digunakan untuk memanaskan pelarut polar dalam kontaknya dengan sampel dan partisi senyawa antara sampel dan pelarut. MAE memiliki keuntungan diantaranya mengurangi waktu ekstraksi, jumlah pelarut, dan konsumsi energi. Selain itu, juga menghasilkan rendemen yang lebih tinggi (Dahmoune *et al.*, 2015).

Ekstraksi berbantu gelombang mikro (MAE) memberikan teknik dimana senyawa dapat selektif diekstraksi dalam waktu singkat dan mengkonsumsi sedikit daya serta mengurangi zat limbah dibandingkan proses ekstraksi konvensional. Penyerapan energi gelombang mikro selama MAE bergantung pada matriks sampel dan sifat kimia senyawa yang sedang terkena radiasi gelombang mikro.

Faktor utama yang mempengaruhi proses ekstraksi dengan metode MAE adalah sifat pelarut, waktu ekstraksi, dan kekuatan radiasi. Pemilihan pelarut untuk MAE ditentukan berdasarkan kelarutan analit oleh interaksi antara pelarut dan matriks serta sifat

pelarut yang dapat berinteraksi dengan gelombang mikro.
(Mosquera *et al.*, 2013)

Berikut ini adalah skema alat ekstraksi dengan metode *Microwave Assisted Extraction (MAE)* :



Gambar 5. Skema alat *Microwave Assisted Extraction (MAE)*

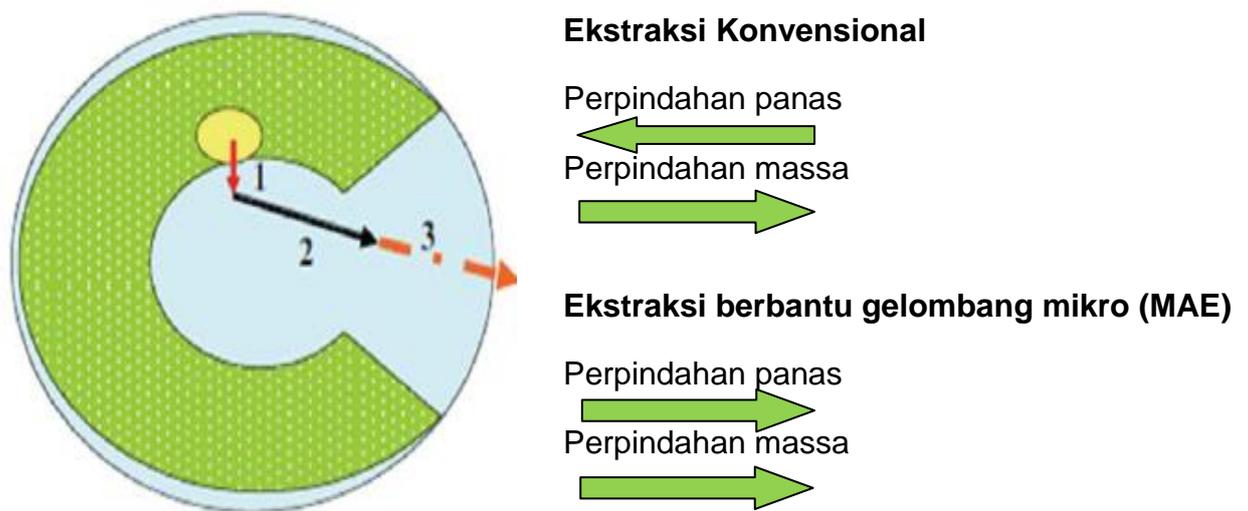
Ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro (MAE) lebih menguntungkan jika dibandingkan dengan ekstraksi metode konvensional. Berikut ini perbedaan metode ekstraksi dengan bantuan gelombang mikro dengan ekstraksi metode konvensional.

Tabel 3. Perbedaan Metode Microwave Assisted Extraction (MAE) dengan Metode Konvensional (Solanki *et al.*, 2010)

No.	Konvensional	Microwave
1.	Proses pemanasan campuran terjadi pada permukaan wadah campuran	Proses pemanasan campuran terjadi langsung di dalam campuran
2.	Wadah campuran harus kontak fisik dengan sumber panas	Wadah campuran tidak perlu kontak fisik dengan sumber panas. Wadah disimpan dalam ruang microwave.
3.	Pemanasan berlangsung dengan sumber pemanasan termal atau listrik.	Pemanasan berlangsung dengan pemanasan gelombang elektromagnetik.
4.	Mekanisme melibatkan pemanasan konduksi	Mekanisme pemanasan melibatkan polarisasi dielektrik dan konduksi ion
5.	Transfer energi terjadi dari dinding permukaan wadah ke dalam campuran	Campuran dipanaskan langsung sedangkan permukaan dinding wadah mengalami pelepasan kalor.
6.	Dalam pemanasan konvensional, semua senyawa dalam campuran dipanaskan secara sama	Dalam microwave, komponen tertentu dapat dipanaskan secara khusus
7.	Laju pemanasan berkurang	Laju pemanasan meningkat beberapa kali lipat lebih tinggi
8.	Dalam pemanasan konvensional, suhu tertinggi yang dapat dicapai dibatasi oleh titik didih campuran tertentu.	Dalam microwave, suhu campuran dapat meningkat lebih dari titik didihnya yang disebut dengan pemanasan berlebih (Super Heating)

Berdasarkan tabel 3, pada pemanasan gelombang mikro perpindahan panas terjadi secara langsung pada bahan atau sampel yang berinteraksi dengan gelombang mikro sehingga panas yang dihasilkan mampu membawa zat terlarut keluar dari matriks sampel ke dalam pelarut. Sedangkan pemanasan konvensional, perpindahan panas terjadi dari kontak fisik antara sumber pemanas dengan wadah sampel yang kemudian memanaskan campuran dalam wadah, sehingga terjadi perpindahan massa zat terlarut dari matriks sampel ke dalam pelarut. Hal ini yang menyebabkan waktu ekstraksi dengan gelombang mikro lebih cepat dibandingkan dengan waktu ekstraksi metode konvensional.

Berikut ini adalah mekanisme perpindahan panas dan massa dalam proses ekstraksi gelombang mikro dan ekstraksi konvensional.



1. Desorpsi
2. Difusi Internal
3. Difusi Eksternal

Gambar 6. Mekanisme Perpindahan Panas dan Massa dalam Metode Ekstraksi Berbantu Gelombang Mikro (MAE) dan Konvensional (Veggi *et al.*, 2013)

E. Uji Kemurnian

Kemurnian merupakan hal penting yang dimiliki suatu senyawa. Metode yang digunakan untuk menentukan kemurnian suatu senyawa dapat dilakukan dengan menggunakan penentuan titik leleh dan kromatografi lapis tipis (KLT).

Titik leleh berperan penting dalam identifikasi dan pengujian kemurnian senyawa organik padat. Titik leleh merupakan tetapan fisika yang penting untuk senyawa hasil isolasi, sintesis, dan kristalisasi. Titik leleh suatu zat padat adalah temperatur dimana

suatu zat padat mulai berubah bentuk menjadi cairan dalam kesetimbangan. Energi yang diserap oleh molekul senyawa dapat meningkatkan gerakan vibrasi dan rotasi molekul tersebut sehingga molekul berubah dari padat menjadi cair ketika temperatur terus dinaikkan. Suatu senyawa murni memiliki rentang temperatur maksimum sebesar 1-2°C. Adanya pengotor pada sampel akan menyebabkan suhu titik leleh rendah dan rentang temperatur titik leleh lebih lebar dari senyawa murni.

Selain itu, untuk mengetahui kemurnian suatu senyawa dapat pula dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis. Kromatografi Lapis Tipis merupakan metode pemisahan komponen-komponen berdasarkan perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fasa diam dengan menggunakan pelarut atau campuran pelarut pengembang. Fasa diam yang digunakan dapat berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai penyerap. Sedangkan fasa gerak dapat berupa pelarut atau campuran pelarut. Elusi pada KLT umumnya dilakukan dengan cara menaik (*ascending*) (Mulja, 1995).

Dalam analisis dengan KLT, sampel dalam jumlah yang sangat kecil ditotolkan sebagai titik noda di atas permukaan fasa diam. Kemudian diletakkan dalam suatu bejana yang berisi pelarut pengembang. Pelarut pengembang bergerak naik sepanjang permukaan lempeng fasa diam dan membawa komponen-

komponen senyawa. Komponen senyawa yang bersifat polar akan melekat lebih kuat pada lempeng dan cenderung berdekatan dengan tempat semula ditotolkan. Senyawa tak polar kurang melekat pada fasa diam polar sehingga bergerak lebih jauh ke atas lempeng, sehingga jarak tempuh ke atas lempengan merupakan cerminan polaritas senyawa. Jarak yang ditempuh oleh komponen senyawa pada lempeng fasa diam dibandingkan dengan jarak yang ditempuh pelarut ke atas lempeng. Perbandingan ini dikenal sebagai nilai R_f :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Jika analisis KLT dilakukan dengan mengubah pelarut atau campuran pelarut beberapa kali dan hasil elusi tetap menunjukkan satu noda maka dapat dikatakan bahwa sampel yang ditotolkan telah murni. Keuntungan dari Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah memerlukan sedikit bahan, mampu menganalisis senyawa campuran, dan hasil pemisahan mudah dilihat.

F. Identifikasi Struktur Molekul

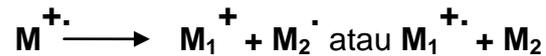
Untuk mengidentifikasi struktur molekul senyawa hasil ekstraksi digunakan beberapa teknik spektroskopi antara lain:

1. Spektroskopi Massa

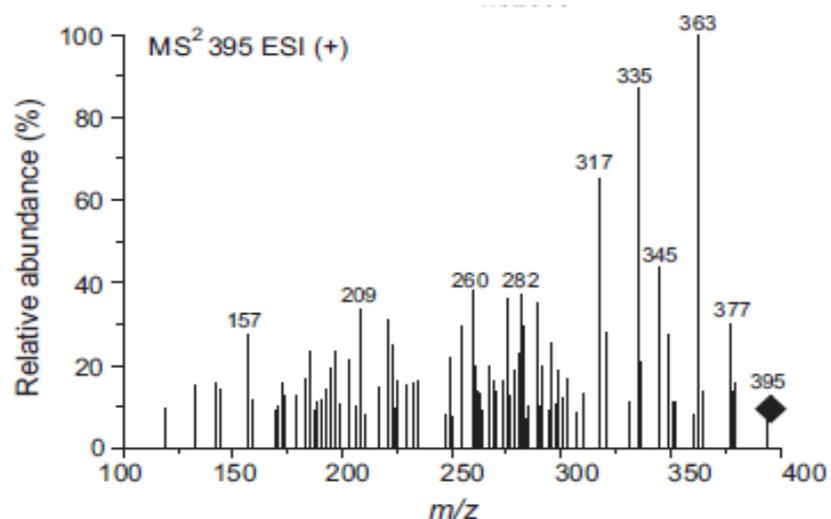
Spektrometer massa adalah alat atau instrumen yang dapat mengubah sampel menjadi ion-ion dan memisahkannya sesuai dengan perbandingan massa terhadap muatan (m/z). Spektrometer massa digunakan untuk mengetahui struktur kimia dari molekul berdasarkan perhitungan massa molekul tersebut serta pola fragmentasinya. Pada spektrometer ini, suatu sampel dalam keadaan gas ditabrak atau ditembak dengan elektron berenergi tinggi yang menyebabkan lepasnya satu elektron dari molekul sampel dan membentuk suatu ion organik. Molekul yang kehilangan satu elektron akan menjadi suatu kation radikal. Kation radikal tersebut mengandung semua atom-atom dari molekul asal yang disebut ion molekul (M^+) (Mistry, 2009).



Ion molekul yang dihasilkan oleh penembakan elektron berenergi tersebut tidak stabil dan pecah menjadi fragmen kecil, baik berbentuk radikal bebas maupun ion-ion lain. Dalam sebuah spektrometer massa yang khas, fragmen yang bermuatan positif akan dideteksi (Fessenden&Fessenden, 1982).



Spektrum massa adalah suatu alur antara kelimpahan jumlah relatif fragmen bermuatan positif terhadap massa per muatan (m/z) dari fragmen-fragmen tersebut. Struktur dan massa fragmen memberikan petunjuk mengenai struktur molekul induknya dan dapat pula menentukan massa molekul suatu senyawa dari spektrum massanya. Spektrum yang dihasilkan pada spektrometer massa dapat dilihat pada gambar dibawah ini



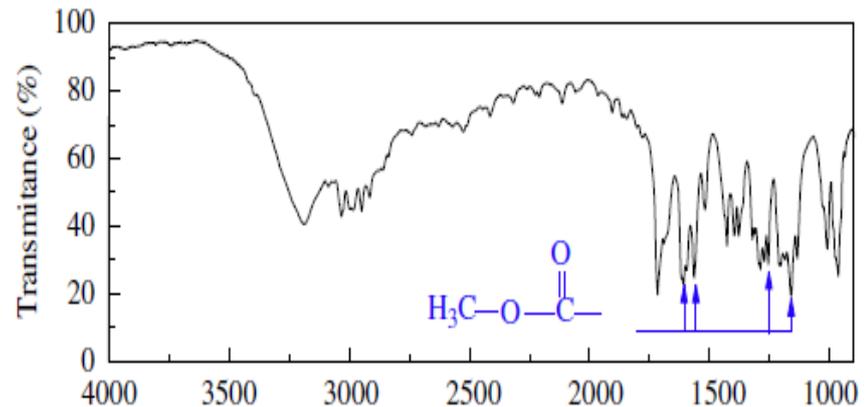
Gambar 7. Spektrum dari Spektroskopi Massa Biksin (Christe *et al.*, 2011)

2. Spektroskopi Infra Merah

Spektrofotometer Infra Merah merupakan instrumen yang sederhana, cepat, dan nondestruktif dalam membuktikan keberadaan berbagai macam gugus fungsi. Spektrofotometer Infra Merah sangat diperlukan dalam penelitian ini karena berguna untuk

mengetahui gugus fungsi apa saja yang terdapat dalam senyawa hasil ekstraksi.

Analisa infra merah bergantung pada interaksi antara molekul atau atom dengan radiasi elektromagnetik. Gugus fungsi dari molekul organik memiliki susunan ikatan atom yang spesifik sehingga penyerapan radiasi infra merah oleh molekul organik tersebut akan menghasilkan bilangan gelombang yang khas (Solomons *et al.*, 2013). Daerah serapan infra merah terletak antara spektrum elektromagnetik sinar tampak dan spektrum radio yaitu $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Banyaknya radiasi yang diabsorpsi oleh suatu ikatan bergantung pada perubahan dalam momen ikatan seperti vibrasi atom-atom yang saling berikatan. Semakin besar perubahan momen ikatan, maka semakin banyak radiasi yang diserap. Ikatan non polar seperti ikatan C-C dan C-H mengalami absorpsi yang lemah, sedangkan ikatan polar seperti C=O mengalami absorpsi yang kuat (Fessenden&Fessenden, 1982). Dibawah ini adalah spektrum inframerah dari tiap-tiap gugus fungsi pada analisis dengan spektroskopi inframerah.



Gambar 8. Spektrum Infra Merah (IR) Bixin (Oskam *et al.*, 2010)

G. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

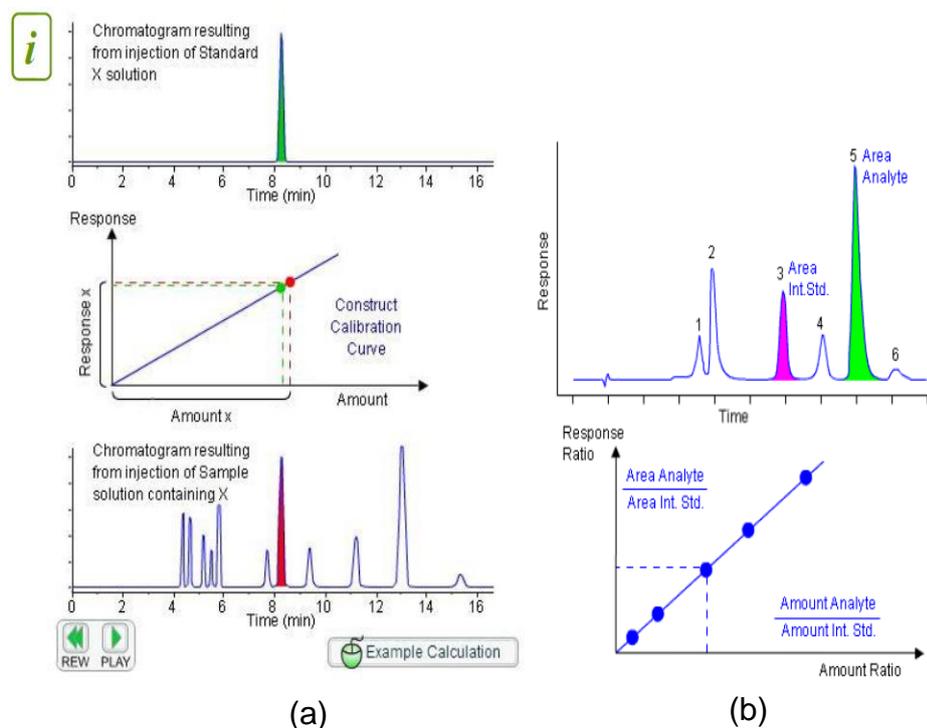
KCKT merupakan singkatan yang dipakai untuk menggantikan istilah HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Penggunaan KCKT pada penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan pemisahan suatu komponen senyawa yang baik dengan waktu proses pemisahan yang relatif cepat.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu metode kromatografi yang menggunakan suatu padatan, cairan, resin penukar ion (*ion exchange resin*) atau polimer berpori (*porous polymer*) pada kolom sebagai fase diamnya, sedangkan fase gerakanya berupa suatu cairan yang melewati kolom pada tekanan tinggi. Berdasarkan fase diam dan fase gerakanya, kolom kromatografi cair kinerja tinggi dibedakan menjadi dua jenis yaitu kolom fase normal dan kolom fase terbalik (Mulja, 1995). Kolom fase normal adalah kolom konvensional dimana fase diamnya bersifat polar dan fase gerakanya bersifat non polar. Sedangkan

kromatografi dengan kolom yang fase gerakanya bersifat polar dan fase diamnya bersifat non polar disebut kolom fase terbalik. Fase diam pada kolom fase terbalik yang umum digunakan antara lain adalah C₁₈, C₈, dan C₂. Proses pemisahan senyawa diidentifikasi berdasarkan waktu retensi dan pengamatan pada spektrum UV-Vis. Waktu retensi adalah selang waktu yang diperlukan oleh sampel saat mulai injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya secara maksimal ditangkap oleh detektor (Corradini, 2011). Sedangkan pengamatan pada spektrum UV-Vis dapat dilihat dari puncak penyerapan maksimum pada panjang gelombang yang khas dari suatu komponen senyawa. Suatu karotenoid memiliki penyerapan maksimum pada tiga panjang gelombang yang ditunjukkan dengan adanya tiga puncak pada spektrum UV-Vis. Hasil yang diperoleh dari proses pemisahan komponen senyawa dengan KCKT disebut kromatogram KCKT. Pada kromatogram KCKT terdapat puncak-puncak yang menggambarkan banyaknya komponen dalam sampel.

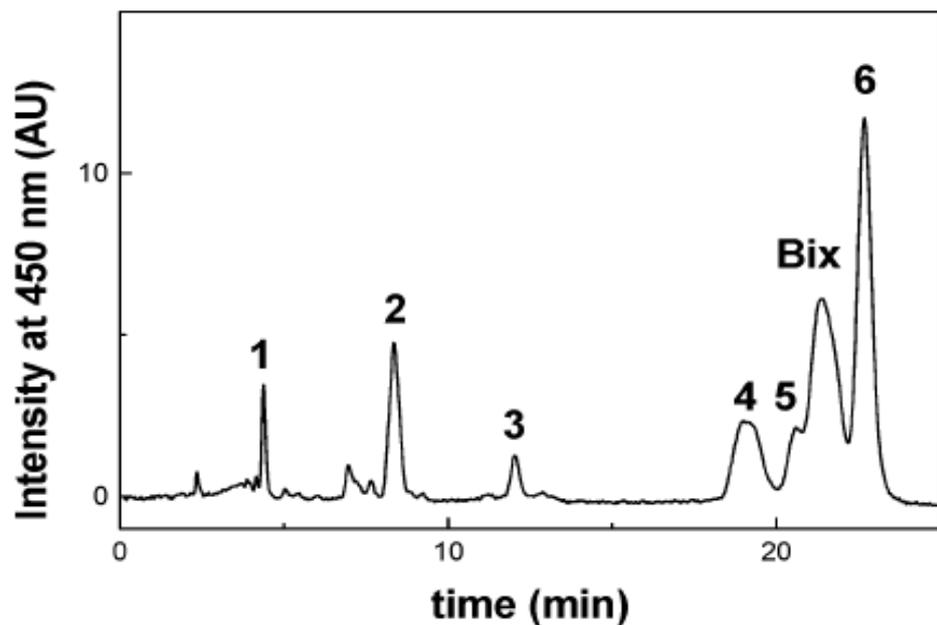
Analisis kuantitatif dengan KCKT dapat digunakan untuk mengetahui besar konsentrasi komponen yang terkandung didalamnya. Setelah pemisahan komponen, penentuan konsentrasi komponen tersebut dilakukan dengan membandingkan luas atau tinggi puncak standar dengan sampel. Kurva kalibrasi dilakukan dengan menggunakan standar. Pembuatan kurva kalibrasi standar

internal dilakukan dengan menggunakan standar yang bukan komponen dari sampel yang diuji dan tidak bereaksi dengan sampel uji. Standar juga harus mempunyai sifat fisika dan kimia yang mirip dan terpisah dengan jarak yang relatif dekat dari zat sampel dibawah kondisi percobaan. Sedangkan pembuatan kurva kalibrasi standar eksternal yaitu dengan membuat larutan standar yang diketahui kadarnya kemudian diukur dengan instrumen dibawah kondisi yang sama dengan yang digunakan oleh zat sampel. Dibawah ini adalah prinsip dari kurva kalibrasi standar eksternal dan standar internal.



Gambar 9. Prinsip dari (a) Kurva Kalibrasi Standar Eksternal, dan (b) Kurva Kalibrasi Standar Internal (Chromacademy, 2014).

Kelebihan metode identifikasi dengan KCKT adalah memiliki kepekaan yang tinggi, proses pemisahan yang cepat, dan dapat menghindari kerusakan pada sampel yang dianalisis. Selain itu, metode identifikasi KCKT juga memiliki kemampuan untuk mendeteksi isomer cis-trans pada karotenoid. Dibawah ini adalah kromatogram yang dihasilkan dari pemisahan suatu komponen senyawa dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).



Gambar 10. Kromatogram KCKT Bixsin (Rios *et al.*, 2005)

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan waktu ekstraksi dan rasio pelarut yang optimum pada metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) dengan perolehan pigmen biksin yang besar dari biji kesumba, mampu menginterpretasikan senyawa hasil ekstrak yang didapat dengan spektrofotometer Infra Merah dan spektrometer massa, serta mengidentifikasi komponen pigmen hasil ekstrak yang didapat dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium penelitian kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta. Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari hingga April 2015.

C. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang meliputi ekstraksi pigmen biksin dengan variabel waktu ekstraksi dan rasio pelarut menggunakan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE), mengidentifikasi struktur molekul

pigmen biksin dengan spektrofotometer Infra Merah dan spektrometer massa, dan mengidentifikasi komponen pigmen biksin dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

D. Alat dan Bahan

Alat-alat gelas yang digunakan, gelas kimia, gelas ukur, spatula, batang pengaduk, pipet, erlenmeyer, kaca arloji, cawan porselen, corong, pendingin liebig, labu bulat, corong pisah, Peralatan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), neraca analitik, kertas saring, pipa kapiler, plat KLT Silika Gel 60 F₂₅₄ Merck, alat pengukur titik leleh Melting Point Stuart smp10, dan Rotary Evaporator Eyela.

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini yaitu biji kesumba yang diperoleh dari Sleman, Yogyakarta. Bahan lain yang digunakan pada penelitian ini yaitu biksin standar, akuades, berbagai pelarut kualifikasi teknis yang sudah didestilasi (etil asetat dan diklorometana), padatan natrium sulfat anhidrat, pelarut dengan kualifikasi p.a seperti metanol, aseton, n-heksana, kloroform, asetonitril, diklorometana, asam format 0.1% dan asam asetat 2%.

E. Instrumentasi

Instrumen yang digunakan untuk karakterisasi sampel pada penelitian ini yaitu karakterisasi dengan spektrofotometer Infra Merah Shimadzu IR-Prestige 21 yang dilakukan di Badan Tenaga

Nuklir Nasional (BATAN) Lebak Bulus, spektrometer massa Waters LCT Premier XE yang dilakukan di Laboratorium MS dan NMR, FMIPA-Institut Teknologi Bandung, dan KCKT Waters Alliance yang dilakukan di Laboratorium Kesehatan Daerah Provinsi DKI Jakarta, Rawasari, Jakarta Pusat.

Alat utama penelitian ini adalah alat ekstraksi berupa oven gelombang mikro merk Panasonic NN-ST342M dengan maksimum daya sebesar 800 W yang telah dimodifikasi dengan dilengkapi labu bulat, termokopel, pendingin liebig, dan pengontrol suhu. Oven tersebut dimodifikasi untuk keperluan ekstraksi. Di bagian atap oven dibuat lubang dan disambungkan dengan termokopel. Lubang tersebut digunakan untuk memasang pendingin liebig dan menghubungkan termokopel dengan kabel dan pengontrol suhu. Di dalam oven juga dimodifikasi agar baki kaca tidak berputar.

Berikut gambar alat ekstraksi pada proses ekstraksi berbantu gelombang mikro (MAE).



Gambar 11. Oven Gelombang Mikro yang telah dimodifikasi

F. Prosedur Penelitian

1. Ekstraksi Biksin dengan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE)

Proses ekstraksi biksin dengan metode MAE dilakukan dengan variabel waktu ekstraksi dan rasio pelarut. Langkah-langkah yang dilakukan pada proses ekstraksi pigmen biksin dengan metode MAE adalah sebagai berikut:

a) Pengaruh Waktu Ekstraksi terhadap Perolehan Pigmen Biksin

Biji kesumba dimasukkan ke dalam labu bulat sebanyak 10 gram. Menambahkan 75 mL etil asetat dan 10 mL akuades. Kemudian alat disusun sesuai dengan Gambar

11. Menyalakan oven gelombang mikro dengan mengeset daya yang rendah dan waktu ekstraksi selama 5, 10, dan 15 menit. Setelah ekstraksi selesai, hasil ekstraksi didinginkan dan disaring untuk memisahkan larutan ekstrak dengan residu. Fasa air dan fasa organik dipisahkan dengan corong pisah, kemudian fasa organik etil asetat ditambahkan dengan natrium sulfat anhidrat lalu disaring dan filtrat ditampung. Fasa etil asetat diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C. Kemudian konsentrat biksin dikristalisasi dengan menempatkan di waterbath dingin sampai terbentuk kristal pada dasar wadah. Kristal yang terbentuk kemudian disaring dan dikeringkan. Kristal yang telah kering direkristalisasi dengan menambahkan diklorometana dan metanol (1:4 v/v), sebanyak 3 mL diklorometana ditambahkan secara perlahan-lahan. Setelah penambahan diklorometana, ditambahkan metanol sebanyak 12 mL secara perlahan-lahan (Vasu *et al.*, 2010). Larutan ini dipanaskan kemudian diletakkan dalam freezer. Kristal yang terbentuk di dasar wadah kemudian disaring, dibilas dengan metanol dan dikeringkan. Setiap kristal biksin dihitung perolehannya dengan perhitungan persen massa dan didapatkan waktu ekstraksi yang optimum.

Perolehan kristal biksin dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Perolehan Biksin (\%)} = \frac{m \text{ biksin}}{m \text{ biji kesumba}} \times 100$$

b) Pengaruh Rasio Pelarut terhadap Perolehan Pigmen Biksin

Biji kesumba dimasukkan ke dalam labu bulat sebanyak 10 gram. Menambahkan pelarut dengan rasio akuades dan etil asetat (1:6,5, 1:7, 1:8 v/v). Kemudian alat disusun sesuai dengan Gambar 11. Menyalakan oven gelombang mikro dengan mengeset daya yang rendah dan waktu ekstraksi yang optimum. Setelah ekstraksi selesai, hasil ekstraksi didinginkan dan disaring untuk memisahkan larutan ekstrak dengan residu. Fasa air dan fasa organik dipisahkan dengan corong pisah, kemudian fasa organik etil asetat ditambahkan dengan natrium sulfat anhidrat lalu disaring dan filtrat ditampung. Fasa etil asetat diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 40°C. Kemudian konsentrat biksin dikristalisasi dengan menempatkan di waterbath dingin sampai terbentuk kristal pada dasar wadah. Kristal yang terbentuk kemudian disaring dan dikeringkan. Kristal yang telah kering direkristalisasi dengan menambahkan diklorometana dan metanol (1:4 v/v), sebanyak 3 mL diklorometana ditambahkan secara

perlahan-lahan. Setelah penambahan diklorometana, ditambahkan metanol sebanyak 12 mL secara perlahan-lahan (Vasu *et al.*, 2010). Larutan ini dipanaskan kemudian diletakkan dalam freezer. Kristal yang terbentuk di dasar wadah kemudian disaring, dibilas dengan metanol dan dikeringkan. Setiap kristal biksin dihitung perolehannya dengan perhitungan persen massa dan didapatkan rasio pelarut yang optimum.

Perolehan kristal biksin dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Perolehan Biksin (\%)} = \frac{m \text{ biksin}}{m \text{ biji kesumba}} \times 100$$

Kristal biksin yang diperoleh dari kondisi optimum dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan titik leleh (Lit. 198°C). Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan pada plat silika dengan melarutkan kristal biksin dalam metanol. Larutan sampel ditotolkan ke plat kemudian dielusi dengan menggunakan fasa gerak aseton:n-heksana (1:2 v/v) dan etil asetat:kloroform (1:3 v/v). Sedangkan untuk uji titik leleh, kristal biksin dimasukkan ke dalam pipa kapiler kemudian diamati titik leleh yang terjadi pada sampel dengan menggunakan alat pengukur titik leleh.

2. Identifikasi Struktur Molekul Pigmen Biksin

Untuk mengidentifikasi struktur molekul dari senyawa hasil ekstraksi dilakukan menggunakan spektrometer massa dan spektrofotometer Infra Merah (IR) dengan menganalisis spektrum yang dihasilkan. Spektrum infra merah pigmen biksin dilihat pada bilangan gelombang $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Sedangkan spektrum massa pigmen biksin dideteksi pada mode ion positif dan ion negatif.

3. Identifikasi Komponen Pigmen Biksin dengan KCKT

Proses identifikasi komponen pigmen biksin menggunakan KCKT adalah sebagai berikut, mula-mula sampel pigmen biksin dan biksin standar dilarutkan dalam asetonitril. Kemudian larutan disaring dengan membran minisart $0,45 \mu\text{m}$ dan diinjeksi sebanyak $20 \mu\text{L}$ ke dalam injektor KCKT. Pengoperasian KCKT dilakukan dengan suhu kolom 25°C . Kolom yang digunakan pada proses pemisahan yaitu kolom fasa balik C_{18} *Agilent ZORBAX Eclipse Plus* ($150 \times 4.6 \text{ mm}$, ukuran partikel $5 \mu\text{m}$). Fasa gerak yang digunakan yaitu campuran antara asetonitril:asam asetat 2%:diklorometana ($65:35:2 \text{ v/v}$). Laju alir diatur menjadi $1,0 \text{ mL/menit}$. Penyuntikan sampel dilakukan sebanyak 2 kali (Montenegro *et al.*, 2004).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Ekstraksi Pigmen Biksin dengan Metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE)

Ekstraksi pigmen biksin dari biji kesumba dilakukan dengan bantuan gelombang mikro (MAE). Metode ekstraksi berbantu gelombang mikro (MAE) yang digunakan pada penelitian ini berdasarkan penelitian Vasu *et al.* (2010) yang telah dimodifikasi dengan menambahkan padatan natrium sulfat anhidrat pada fasa etil asetat. Pada proses ekstraksi ini menggunakan pelarut etil asetat dan akuades. Kedua pelarut ini dipilih sebagai pelarut dalam ekstraksi karena memiliki fungsi khusus yaitu pelarut etil asetat digunakan karena dapat melarutkan pigmen biksin dari biji kesumba dengan baik. Hal ini telah diteliti oleh cardarelli *et al.* (2008) bahwa pelarut yang baik untuk ekstraksi biksin adalah etil asetat dengan perolehan biksin sebesar 4.92 mg biksin/g biji kesumba kering. Sementara akuades yang merupakan pelarut polar berfungsi sebagai pelarut tambahan yang dapat menimbulkan panas akibat pergerakan molekul-molekul dengan migrasi ion dan rotasi kedua kutubnya. Hal ini dikarenakan akuades dapat berinteraksi dengan gelombang mikro. Peningkatan proses ekstraksi terletak pada pelarut atau sampel yang dipanaskan secara cepat oleh interaksi langsung dengan radiasi

elektromagnetik. Interaksi langsung dengan radiasi elektromagnetik menyebabkan pemanasan lebih cepat hingga 20-30 kali dibandingkan sistem konvensional. Hal inilah yang menghemat waktu secara signifikan sehingga ekstraksi dapat diselesaikan dalam hitungan menit.

Biji kesumba yang diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dan akuades dengan metode MAE menghasilkan larutan ekstrak berwarna merah kecoklatan. Kemudian larutan ekstrak ini dipisahkan, dan ke dalam fasa etil asetat ditambahkan dengan natrium sulfat anhidrat yang berfungsi untuk mengikat air. Setelah disaring, diuapkan sehingga diperoleh konsentrat biksin. Kemudian konsentrat biksin dikristalisasi. Kristal yang terbentuk disaring dan dikeringkan. Selanjutnya direkristalisasi menggunakan pelarut diklorometana dan metanol dengan perbandingan (1:4 v/v). Larutan ini dipanaskan untuk meningkatkan kelarutan, kemudian didinginkan beberapa waktu hingga terbentuk kembali kristal. Kristal dipisahkan dari sisa pelarut yang ada dan kemudian ditimbang massa kristal yang diperoleh. Rekristalisasi ini bertujuan untuk menghilangkan zat pengotor dengan cara melarutkan pada suatu pelarut yang sesuai kemudian dikristalkan kembali, sehingga kristal yang diperoleh merupakan kristal yang telah bebas dari zat pengotor.



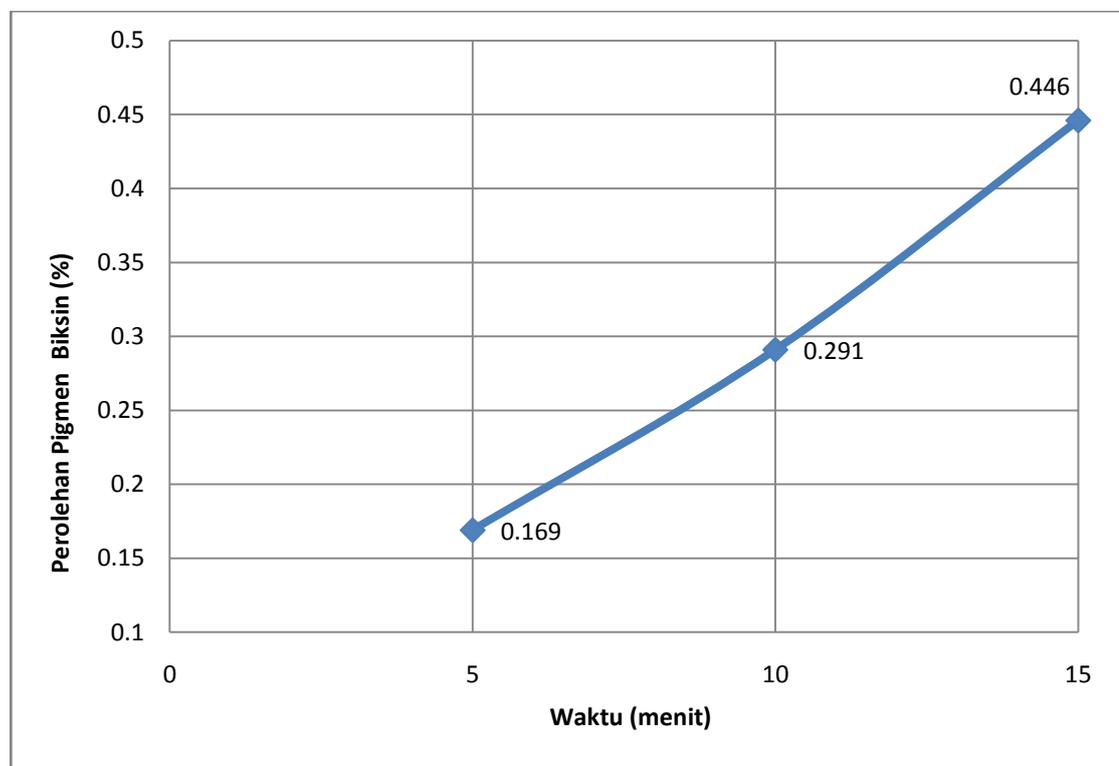
Gambar 12. a) Hasil ekstrak yang terdiri dari dua fasa, b) Fasa etil asetat yang telah ditampung

1. Pengaruh Waktu Ekstraksi pada Metode MAE terhadap Perolehan Pigmen Biksin

Parameter yang diuji pada penelitian ini adalah waktu ekstraksi terhadap perolehan pigmen biksin dari biji kesumba. Perhitungan perolehan pigmen biksin dilakukan dari perbandingan massa biksin dengan massa sampel biji kesumba dalam persen. Berikut ini hasil penelitian pengaruh waktu ekstraksi pada metode MAE terhadap perolehan pigmen biksin.

Tabel 4. Hasil Perolehan Pigmen Biksin dari Perlakuan Waktu Ekstraksi

t (menit)	% Perolehan Pigmen Biksin
5	0.169 %
10	0.291 %
15	0.446 %



Gambar 13. Grafik Waktu Ekstraksi terhadap Perolehan Pigmen Biksin

Gambar 13 menunjukkan bahwa perolehan pigmen biksin semakin besar seiring dengan semakin lamanya waktu ekstraksi. Hasil ini dipengaruhi oleh adanya sifat dielektrik dari air. Sifat dielektrik air yang besar mempengaruhi proses pemanasan pada ekstraksi berbantu gelombang mikro (MAE). Air merupakan pelarut polar yang dapat berinteraksi dengan gelombang mikro sehingga semakin lama waktu radiasi gelombang mikro, air semakin cepat panas.

Panas yang dihasilkan oleh interaksi gelombang mikro dengan pelarut polar kemudian meningkatkan difusi pelarut dan analit. Pelarut mampu berdifusi ke matriks dan mengekstrak analit kemudian berdifusi keluar dari matriks membawa komponen yang larut. Oleh karena itu, naiknya suhu akan meningkatkan efisiensi dari proses ekstraksi karena desorpsi zat yang diinginkan dari matriks akan meningkat.

Berdasarkan pengamatan pada pengontrol suhu, saat waktu ekstraksi 5 menit suhu dalam labu bulat mencapai 33°C, waktu ekstraksi 10 menit suhu dalam labu bulat mencapai 48°C, sedangkan waktu ekstraksi 15 menit suhu labu bulat mencapai 69°C. Suhu ini termasuk suhu yang masih aman untuk ekstraksi pigmen biksin, karena pigmen biksin mulai mengalami degradasi apabila suhu pemanasan lebih dari 80°C (Bittencourt *et al.*, 2005). Hal inilah yang menjadi pertimbangan dalam menentukan variabel

waktu ekstraksi agar pigmen biksin yang diperoleh tidak mengalami degradasi akibat suhu yang tinggi.

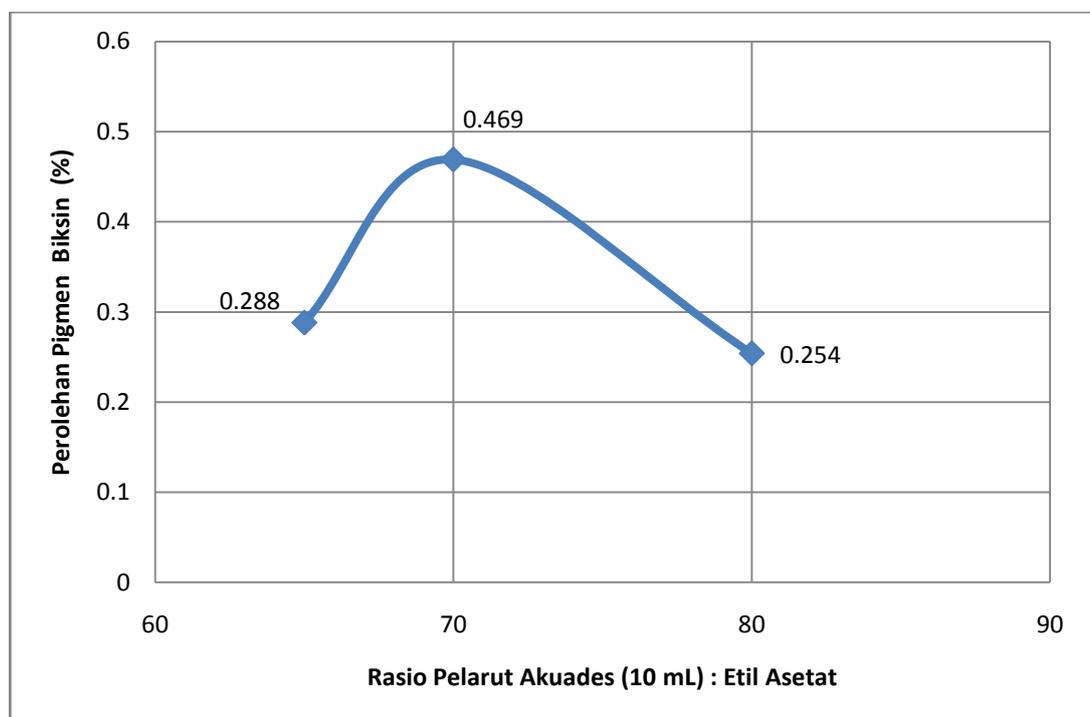
Hasil penelitian menunjukkan bahwa perolehan pigmen biksin maksimum diperoleh sebesar 0.446% dengan waktu ekstraksi selama 15 menit. Sehingga dapat diketahui waktu ekstraksi optimum dengan metode MAE pada penelitian ini adalah 15 menit. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan rasio pelarut yang berbeda.

2. Pengaruh Rasio Pelarut pada Metode MAE terhadap Perolehan Pigmen Biksin

Parameter yang diuji pada penelitian ini adalah rasio pelarut akuades dan etil asetat terhadap perolehan pigmen biksin dari biji kesumba. Rasio pelarut akuades dan etil asetat yang digunakan adalah 1:6,5, 1:7, dan 1:8 v/v dengan waktu ekstraksi optimum yaitu selama 15 menit. Perhitungan perolehan pigmen biksin dilakukan dari perbandingan massa biksin dengan massa sampel biji kesumba dalam persen. Berikut ini hasil penelitian pengaruh rasio pelarut pada metode MAE terhadap perolehan pigmen biksin.

Tabel 5. Hasil Perolehan Pigmen Biksin dari Perlakuan Rasio Pelarut

Rasio Pelarut Akuades: Etil Asetat (v/v)	Total Volume (mL)	% Perolehan Pigmen Biksin
1:6,5	75	0.288 %
1:7	80	0.469 %
1:8	90	0.254 %



Gambar 14. Grafik Rasio Pelarut terhadap Perolehan Pigmen Biksin

Gambar 14 menunjukkan bahwa bertambahnya volume etil asetat menyebabkan perolehan pigmen biksin meningkat pada

rasio pelarut 10 mL akuades dan 70 mL etil asetat (1:7 v/v) dengan perolehan pigmen biksin maksimum sebesar 0.469 %. Namun pada volume etil asetat 80 mL (1:8 v/v) perolehan pigmen biksin menurun menjadi 0.254%. Umumnya dalam teknik ekstraksi konvensional semakin banyak volume pelarut maka kontak sampel dengan pelarut akan semakin besar sehingga meningkatkan perolehan ekstrak. Namun dalam ekstraksi berbantu gelombang mikro (MAE) volume pelarut yang lebih besar dapat pula mengakibatkan menurunnya perolehan ekstrak.

Pada penelitian ini, massa biji kesumba yang digunakan konstan dengan total volume pelarut yang meningkat. Bertambahnya volume pelarut menyebabkan interaksi permukaan sampel dengan pelarut menjadi lebih besar (Spigno dan Faveri, 2009). Namun volume pelarut yang besar dan adanya kandungan air pada biji kesumba dapat menyebabkan pemanasan yang berlebih atau super heating. Pemanasan berlebih menyebabkan suhu campuran menjadi lebih tinggi dari titik didihnya. Pemanasan berlebih memiliki pengaruh terhadap senyawa dalam material dimana senyawa dapat mengalami termal stress akibat panas yang cepat pada campuran. Selain itu, dapat terjadi penguapan pelarut yang menyebabkan volume pelarut berkurang. Oleh karena itu, pada penelitian ini mengalami penurunan perolehan pigmen biksin

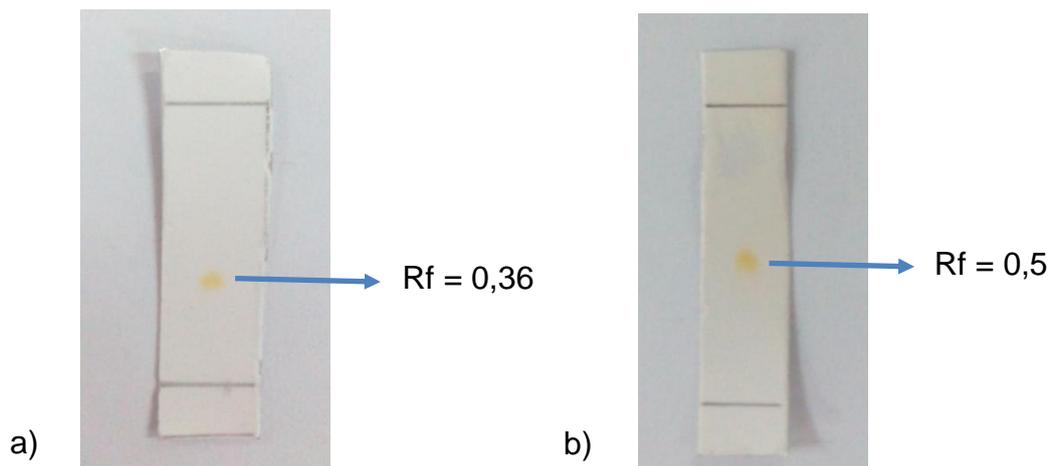
karena terjadinya pemanasan berlebih atau super heating pada campuran.

Berdasarkan hasil dari kedua parameter yang telah dilakukan, diperoleh kondisi optimum pada ekstraksi berbantu gelombang mikro (MAE) yaitu rasio pelarut akuades:etil asetat (1:7 v/v) waktu ekstraksi selama 15 menit dengan perolehan pigmen biksin sebesar 0.469 % .

B. Uji Kemurnian Pigmen Biksin

Untuk mengetahui kemurnian dari kristal biksin yang diperoleh maka dilakukan beberapa uji kualitatif dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan uji titik leleh.

Uji kualitatif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan dengan melarutkan kristal biksin dalam metanol. Kemudian ditotolkan ke plat silika. Fasa gerak yang digunakan adalah aseton:n-heksana (1:2 v/v) dan etil asetat:kloroform (1:3 v/v). Berdasarkan hasil kromatogram KLT pada gambar 15 menunjukkan noda kuning bulat dan tidak berekor.



Gambar 15. Kromatogram KLT dengan fase gerak a). aseton:n-heksana (1:2 v/v), b). etil asetat:kloroform (1:3 v/v)

Nilai Rf yang dihasilkan sebesar 0,36 dan 0,5. Kedua hasil tersebut menunjukkan bahwa hasil elusi tetap menampilkan satu noda dengan campuran pelarut yang berbeda, sehingga dapat dikatakan bahwa sampel yang ditotolkan telah murni. Selain itu, dilakukan juga uji titik leleh untuk mengetahui kemurnian kristal biksin yang diperoleh dari ekstraksi dengan metode MAE. Kristal biksin dimasukkan ke dalam pipa kapiler yang tertutup salah satu ujungnya. Pipa kapiler dimasukkan ke dalam alat pengukur titik leleh. Suhu pada saat mula-mula zat meleleh sampai meleleh sempurna seluruhnya dicatat sebagai jarak leleh. Jarak titik leleh kristal biksin didapatkan sekitar 196^o-198^oC. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa kristal biksin cukup murni karena memiliki rentang perbedaan suhu yang sempit yaitu 2^oC.

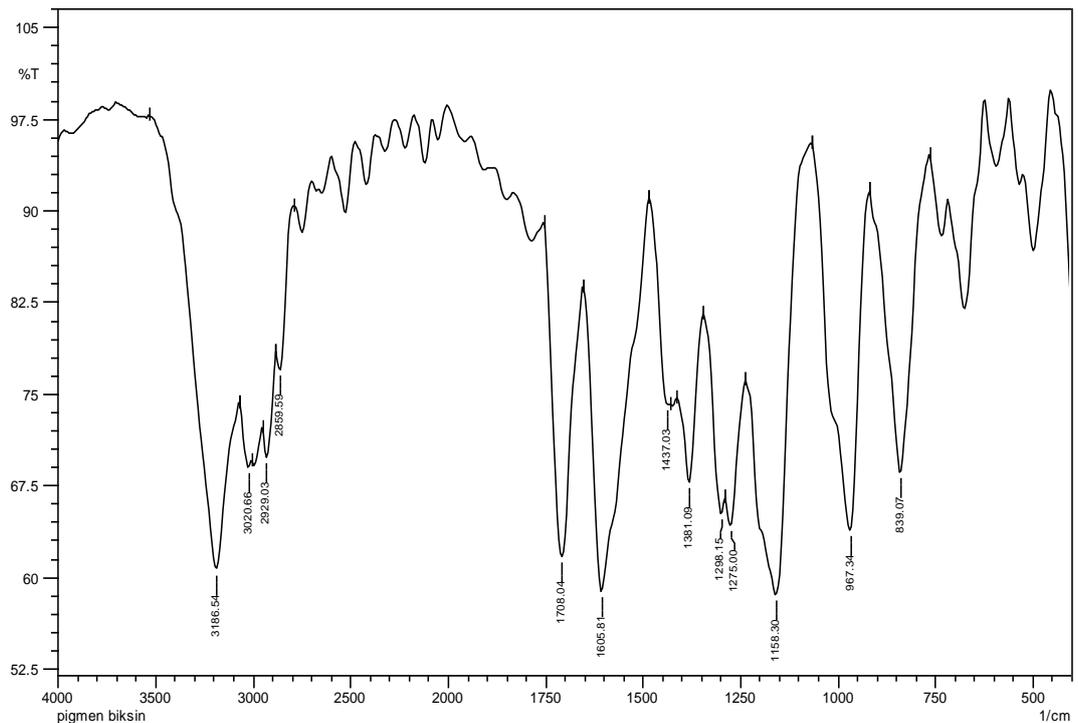
Berdasarkan hasil KLT dan uji titik leleh, dapat diketahui bahwa kristal biksin yang diperoleh dari ekstraksi biji kesumba dengan bantuan gelombang mikro (MAE) merupakan biksin yang telah murni dan siap untuk dilakukan identifikasi strukturnya.

C. Identifikasi Struktur Molekul Pigmen Biksin

1. Spektrofotometer Infra Merah

Kristal biksin hasil ekstraksi dengan metode MAE diidentifikasi struktur molekulnya menggunakan spektrofotometer Infra Merah (IR). Analisis spektrum infra merah bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat pada senyawa hasil ekstraksi. Hal ini dapat diketahui dengan membandingkan hasil spektrum infra merah kristal biksin dengan biksin dari literatur.

Berikut ini hasil spektrum infra merah dari kristal biksin dalam persentase transmisi.



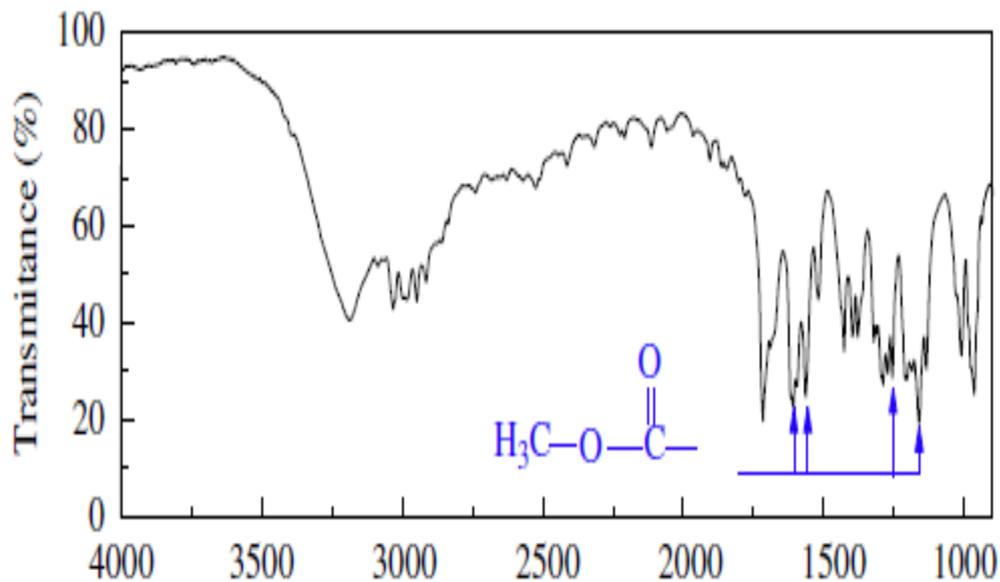
Gambar 16 . Spektrum IR Kristal Biksin

Pada gambar 16, spektrum Infra Merah dari pigmen biksin ditunjukkan dengan perluasan daerah dari 4000-400 cm⁻¹. Berdasarkan hasil identifikasi pigmen biksin dengan Spektrofotometer Infra Merah diperoleh 13 puncak pada bilangan gelombang sebagai berikut: 3186.54 cm⁻¹, 3020.66 cm⁻¹, 2929.03 cm⁻¹, 2859.59 cm⁻¹, 1708.04 cm⁻¹, 1605.81 cm⁻¹, 1437.03 cm⁻¹, 1381.09 cm⁻¹, 1298.15 cm⁻¹, 1275 cm⁻¹, 1158.30 cm⁻¹, 967.34 cm⁻¹, dan 839.07 cm⁻¹.

Puncak pada bilangan gelombang 3186.54 cm⁻¹ menunjukkan adanya regangan dari gugus O-H karboksilat yang tidak berikatan hidrogen, kemudian pada bilangan gelombang

3020.66 cm^{-1} menunjukkan adanya regangan dari C-H sp^2 (=C-H), pada bilangan gelombang 2929.03 cm^{-1} dan 2859.59 cm^{-1} menunjukkan adanya regangan C-H dari gugus metil, pada bilangan gelombang 1708.04 cm^{-1} menunjukkan adanya regangan C=O karboksilat, pada bilangan gelombang 1605.81 cm^{-1} menunjukkan adanya regangan C=C alkena, pada bilangan gelombang 1437.03 cm^{-1} dan 1381.09 cm^{-1} menunjukkan adanya tekukan C-H dari gugus metil, pada bilangan gelombang 1298.15 cm^{-1} , 1275 cm^{-1} dan 1158.30 cm^{-1} menunjukkan adanya regangan C-O dari ester, dan pada bilangan gelombang 967.34 cm^{-1} dan 839.07 cm^{-1} menunjukkan adanya tekukan CH dari =C-H.

Berdasarkan hasil pengamatan spektrum Infra Merah, dapat diketahui bahwa senyawa hasil ekstraksi memiliki gugus O-H karboksilat yang tidak berikatan hidrogen, ikatan C-H, gugus C=O karboksilat, ikatan rangkap C=C, dan ikatan C-O dari ester. Kemudian hasil spektrum Infra Merah pigmen biksin dibandingkan dengan spektrum infra merah biksin dari literatur, hasil yang didapatkan ini sesuai dengan gugus fungsi penyusun biksin dan memiliki bilangan gelombang yang hampir sama dengan yang dipaparkan oleh Oskam *et al.* (2010). Berikut ini adalah spektrum Infra Merah biksin dari literatur yang ditunjukkan pada gambar 17.



Gambar 17. Spektrum IR Biksin dari literatur

2. Spektrometer Massa

Identifikasi kristal biksin hasil ekstraksi dengan metode MAE juga dilakukan dengan menggunakan spektrometer massa. Hal ini bertujuan untuk mengetahui massa molekul dari pigmen biksin. Pengukuran kristal biksin dengan spektrometer massa dilakukan dengan mode deteksi ion positif dan ion negatif. Sebelum pengukuran, sampel ditambahkan pengion berupa asam agar dapat terionisasi dengan baik. Spektrum massa dari pigmen biksin dapat dilihat pada lampiran 8.

Berdasarkan hasil spektrum massa, diketahui terdapat puncak dengan massa ion molekul $[\text{M}+\text{H}]^+$ sebesar 395.2 m/z dan massa ion molekul $[\text{M}-\text{H}]^-$ sebesar 393.2 m/z. Pada mode positif untuk mengetahui massa molekul senyawa, m/z puncak dikurangi

dengan pengionnya yaitu H^+ . Sedangkan untuk mengetahui massa molekul pada mode negatif, m/z puncak ditambah dengan pengionnya. Massa molekul yang terdeteksi oleh kedua mode tersebut adalah massa molekul pigmen biksin sebesar 394.2 g/mol.

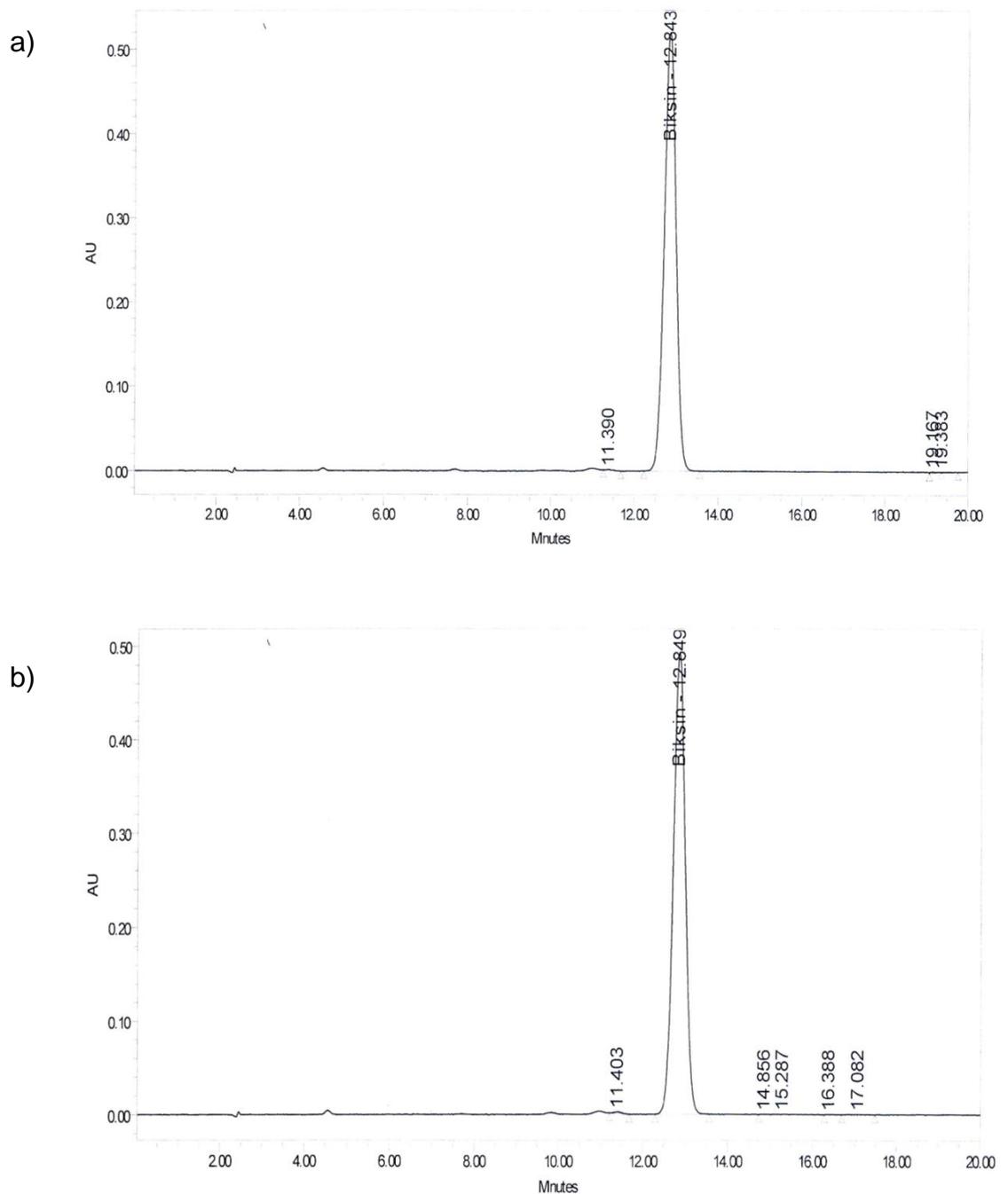
Berdasarkan hasil yang didapatkan dari pengukuran sampel dengan spektrometer massa, dapat diketahui bahwa kristal hasil ekstraksi dengan metode MAE merupakan pigmen biksin yang memiliki massa molekul sebesar 394.2 g/mol.

D. Identifikasi Komponen Pigmen Biksin dengan KCKT

Tahap selanjutnya yaitu identifikasi pigmen biksin dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang dilakukan dengan melarutkan kristal biksin dan standar masing-masing ke dalam asetonitril. Kondisi KCKT yang digunakan berdasarkan penelitian Montenegro *et al.* (2004) yaitu dengan menggunakan kolom C18 *Agilent ZORBAX Eclipse Plus* dengan kecepatan alir 1.0 mL/menit, panjang gelombang 450 nm, volume penyuntikan 20 μ L. Komposisi fasa gerak yang digunakan yaitu asetonitril:asam asetat 2%:diklorometana (65:35:2 v/v).

Penggunaan KCKT pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komponen pigmen biksin dengan membandingkan waktu retensi sampel biksin yang diperoleh dari ekstraksi berbantu

gelombang mikro (MAE) dengan biksin standar. Dibawah ini adalah kromatogram KCKT dari biksin standar dan sampel biksin:



Gambar 18. a) Kromatogram Biksin standar, b) Kromatogram Sampel biksin yang diukur pada panjang gelombang 450 nm.

Berdasarkan hasil yang didapatkan dari pengukuran KCKT pada panjang gelombang 450 nm, terdapat puncak biksin standar yang muncul pada menit ke 12,843 dengan luas area sebesar 10098841, sedangkan puncak sampel biksin muncul pada menit ke 12,849 dengan luas area sebesar 9559317. Hasil ini menunjukkan bahwa sampel biksin yang diperoleh dari ekstraksi berbantu gelombang mikro (MAE) memiliki waktu retensi yang hampir sama dengan waktu retensi standar. Selain itu dibandingkan juga dengan data dari literatur, komponen biksin dalam larutan asetonitril:metanol (1:1) diukur dengan kondisi KCKT yang sama dan diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa puncak biksin muncul pada menit ke 12,7 (Montenegro *et al.*, 2004). Pengukuran KCKT ini juga dilengkapi dengan detektor UV-Vis. Sampel biksin dan biksin standar diukur pada panjang gelombang 250-600 nm. Berdasarkan spektrum UV-Vis pada lampiran 11, keduanya memiliki tiga puncak dengan panjang gelombang maksimum yang sama.

Berdasarkan hasil pengamatan pada kromatogram KCKT, dapat diketahui bahwa identifikasi komponen pigmen biksin yang diperoleh dengan metode MAE memiliki waktu retensi yang hampir sama dengan biksin standar dan waktu retensi komponen biksin yang dipaparkan oleh Montenegro *et al.* (2004).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil ekstraksi dari biji kesumba (*Bixa orellana L.*) dengan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) diperoleh kondisi optimum pada rasio pelarut akuades dan etil asetat (1:7 v/v) waktu ekstraksi selama 15 menit dengan perolehan pigmen biksin sebesar 0.469%.
2. Diperoleh kristal biksin dari ekstraksi biji kesumba dengan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) yang ditunjukkan oleh spektrum IR dengan adanya puncak pada bilangan gelombang 3186.54, 3020.66, 2929.03, 2859.59, 1708.04, 1605.81, 1298.15, 1275, 967.34 & 839.07 cm^{-1} yang mewakili regangan dari gugus O-H karboksilat yang tidak berikatan hidrogen, CH alkena, CH metil, C=O karboksilat, C=C alkena, C-O ester, dan tekukan CH alkena dari senyawa biksin.
3. Hasil yang didapatkan dari spektrum massa menunjukkan bahwa pigmen biksin memiliki berat molekul sebesar 394.2 g/mol.

4. Berdasarkan kromatogram kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) diperoleh puncak komponen pigmen biksin pada menit ke 12,849.

B. Saran

Berdasarkan kesimpulan dari hasil penelitian, maka dapat disarankan:

1. Dilakukan ekstraksi pigmen biksin dari biji kesumba (*Bixa orellana* L.) dengan metode *Microwave Assisted Extraction* (MAE) menggunakan parameter lain seperti daya microwave.
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk uji aktivitas terhadap pigmen biksin.

DAFTAR PUSTAKA

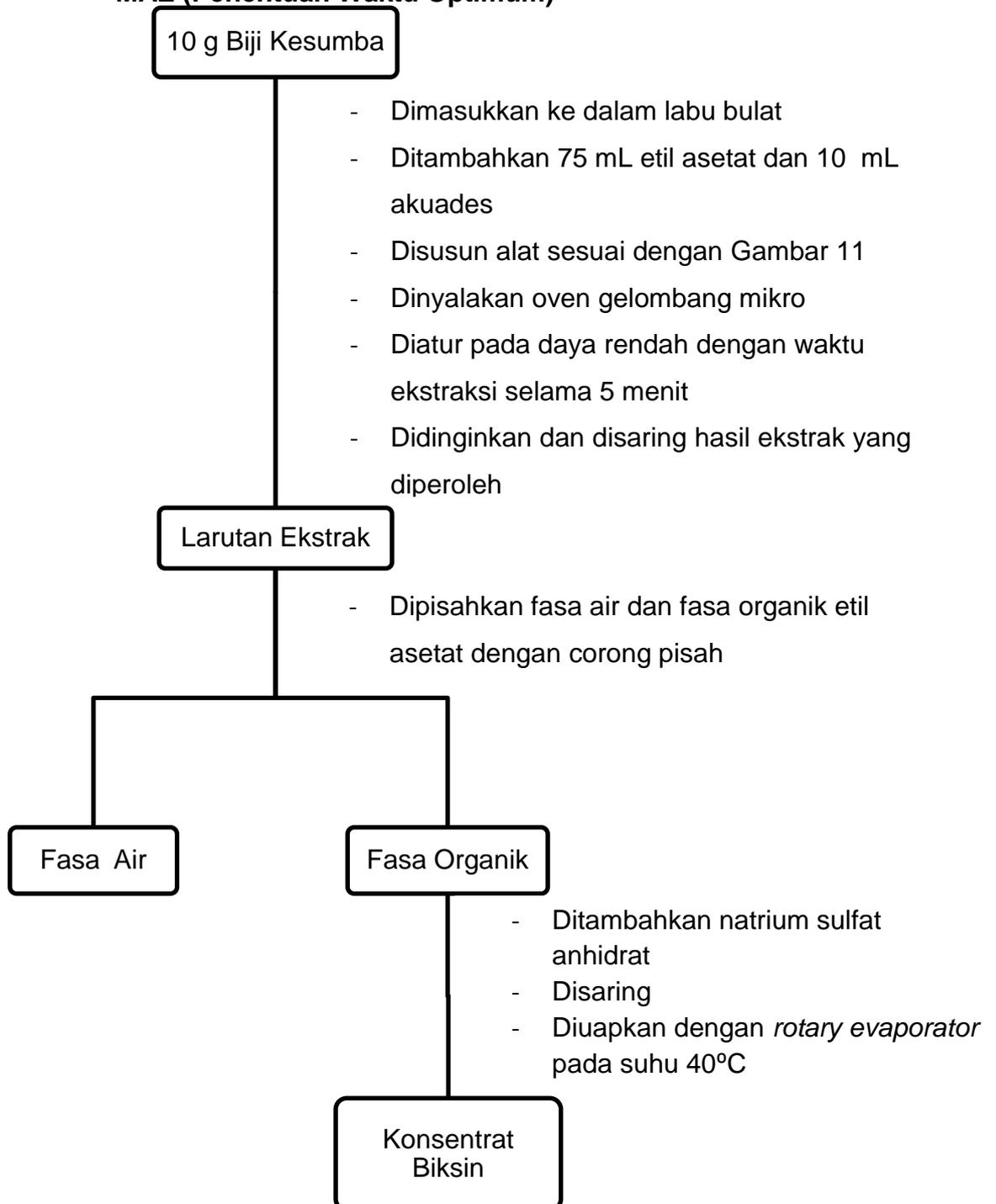
- Anwar, J., Shafique, U., Zaman, W.U., Rehman, R., Salman, M., Dar, A., Anzano, J.M., Ashraf, U., Ashraf, S. 2011. Microwave chemistry: Effect of ions on dielectric heating in microwave ovens. *Arabian Journal of Chemistry*. 8(1). 100-104.
- Bittencourt, C., Felicissimo, M.P., Pireaux, J.J., Houssiau, L. 2005. ToF-SIMS Characterization of Thermal Modifications of Bixin from Bixa orellana Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 53. 6195-6200.
- Cardarelli, R.C., Benassi, M.T., Mercadante, A.Z. 2008. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and colour properties. *LWT-Food Science and Technology*. 41. 1689-1693.
- Cardoso-ugarte G. A., Juárez-Becerra G. P., Sosa-Morales M. E., López-Malo A. 2013. Microwave-assisted Extraction of Essential Oils from Herbs. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 47 (1), 2013, pp. 63-72.
- Chemspider, 2014. Struktur Bixin. [http:// www.chemspider.com/](http://www.chemspider.com/). Diakses pada tanggal 25 September 2014, pukul 21.00 WIB.
- Chiste, R.C., Yamashita, F., Gozzo, F.C., Mercadante, A.Z. 2011. Simultaneous Extraction and Analysis by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Diode Array and Mass Spectrometric Detectors of Bixin and Phenolic Compounds from Annato seeds. *Journal of Chromatography A*. 1218. 57-63.
- Chromacademy, 2014. Quantitative & Qualitative HPLC. [http:// www.chromacademy.com](http://www.chromacademy.com). Diakses pada tanggal 21 November 2014, pukul 19.06 WIB.
- Corradini, D. 2011. *Handbook of HPLC Second Edition*. New York: CRC press. 101. Chapter 7: 207-215.
- Fessenden, R. J., & Fessenden, J. S. 1982. *Kimia Organik Jilid 1*. Jakarta: Erlangga. 312-326.
- Fessenden, R. J., & Fessenden, J. S. 1982. *Kimia Organik Jilid 2*. Jakarta: Erlangga. 454-462.

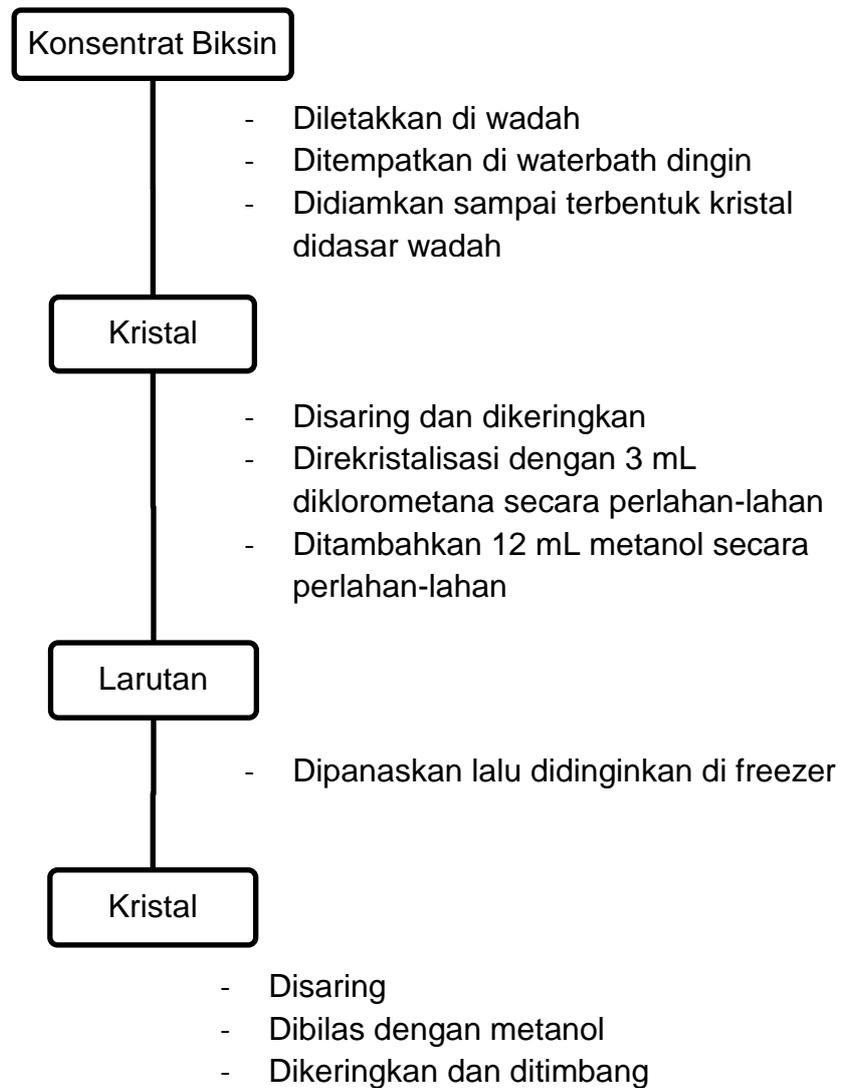
- Giridhar, P., Venugopalan, A., Parimalan, R. 2012. A review on annatto dye extraction, analysis and processing – A Food Technology Perspective. *Journal of Scientific Research and Reports*. 3(2). 327-348.
- Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A., Shukla, S.S. 2009. Microwave Assisted Extraction for Phytoconstituents- An overview. *Asian J. Research Chem*. 2(1).
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Vian, M.A., Chemat, F. 2013. Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 47. 1-11.
- Lidstrom, P., Tiemey, J., Wathey, B., Westman, J. 2001. Microwave assisted organic synthesis. *Tetrahedron*. 57. 9225-9283.
- Mistry, B.D. 2009. *A Handbook of spectroscopic data: Chemistry*. India. Oxford book company. Chapter 5: 128.
- Montenegro, M.A., Rios, A.O., Mercadante, A.Z., Nazareno, M.A., Borsarelli, C.D. 2004. Model Studies on the Photosensitized Isomerization of Bixin. *J. Agric. Food Chem*. 52. 367-373.
- Mosquera, D.M., Carrillo, M.P., Gutierrez, R.H., Diaz, O.R., Hernandez, M.S., Fernandez, J.P. 2013. Microwave technology applied to natural ingredient extraction from Amazonian fruits. *Foods*. 1.
- Mulja, M.H.1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press. 236-267.
- Noppe, H., Martinez, S.A., Verheyden, K., Loco, J.V., Beltran, R.C., Brabander, H.F. 2008. Determination of Bixsin and norBixsin in meat using liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Additives and Contaminants*. 1–8.
- Oskam, G., Gomez-Ortiz, N.M., Va´zquez-Maldonado, I.A., Pe´ rez-Espadas, A.R. 2010. Dye-sensitized solar cells with natural dyes extracted from Achiote seeds. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 94. 40–44.
- Plantamor, 2014. *Bixa orellana* L. [http:// www.plantamor.com/](http://www.plantamor.com/). Diakses pada tanggal 13 September 2014, pukul 20.00 WIB.
- Przybylski, M., Weinmann, M., Fligge, T.A. 2003. *Handbook of Spectroscopy*. Germany. Chapter 10: 329-339.

- Ramamoorthy, S., Dossa, F.P., Kundua, K., Satyanarayanab, V.S.V., Kumar, V. 2010. Molecular characterization of bixin—An important industrial product. *Industrial Crops and Products*. 32. 48–53.
- Rios, A.O., Borsarelli, C.D., Mercadante, A.Z. 2005. Thermal Degradation Kinetics of Bixin in an Aqueous Model System. *J. Agric. Food Chem.* 53. 2307-2311.
- Rodrigues, L.M., Alcazar-Alay, S.C., Petenate, A.J., Meireles, M.A. 2014. Bixin extraction from defatted annatto seeds. *C. R. Chimie*, 17. 268–283.
- Scotter, M. 2009. The Chemistry and Analysis of Annatto Food Colouring: A Review. *Food Additives and Contaminants*. Vol. 26. 1123-1145.
- Sinha, K., Chowdhury, S., Saha, P.D., Datta, S. 2013. Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye from seeds of *Bixa orellana* (Annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). *Industrial Crops and Products*, 41.165– 171.
- Sitompul, J.P., Situmorang, M.F., Soerawidjaja, T.H. 2012. Studi Metode-metode Ekstraksi Pewarna Makanan Alami Annatto dari Biji Kesumba (*Bixa orellana*). *Reaktor*. Vol.14. No.1. 73-78.
- Solanki, H.K., Prajapati, V.D., Jani, G.K. 2010. Microwave Technology- A Potential tool in Pharmaceutical Science. *International Journal of PharmTech Research*. Vol.2, No.3, pp 1754-1761.
- Spigno G., De Faveri D.M. 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *J Food Eng.* 93. 210-217
- Stein, D.F. 1994. *Microwave Processing of Materials*. National Academy Press. Washington DC. 9-27.
- Vasu S., Palaniyappan, V., Kothandam, H.P., Badami S. 2010. Microwave facilitated extraction of Bixin from *Bixa orellana* and its *in-vitro* antioxidant activity. *Der Pharmacia Lettre*. 2 (2) : 479-485.
- Veggi, P.C., Martinez, J., Meireles, M.A.A. 2013. *Fundamentals of Microwave Extraction*. University Of Campinas. Brazil. Chapter 2: 15-47.
- Zhang, H.F., Yang, X.H., Wang, Y. 2011. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*. 22. 672-688.

LAMPIRAN

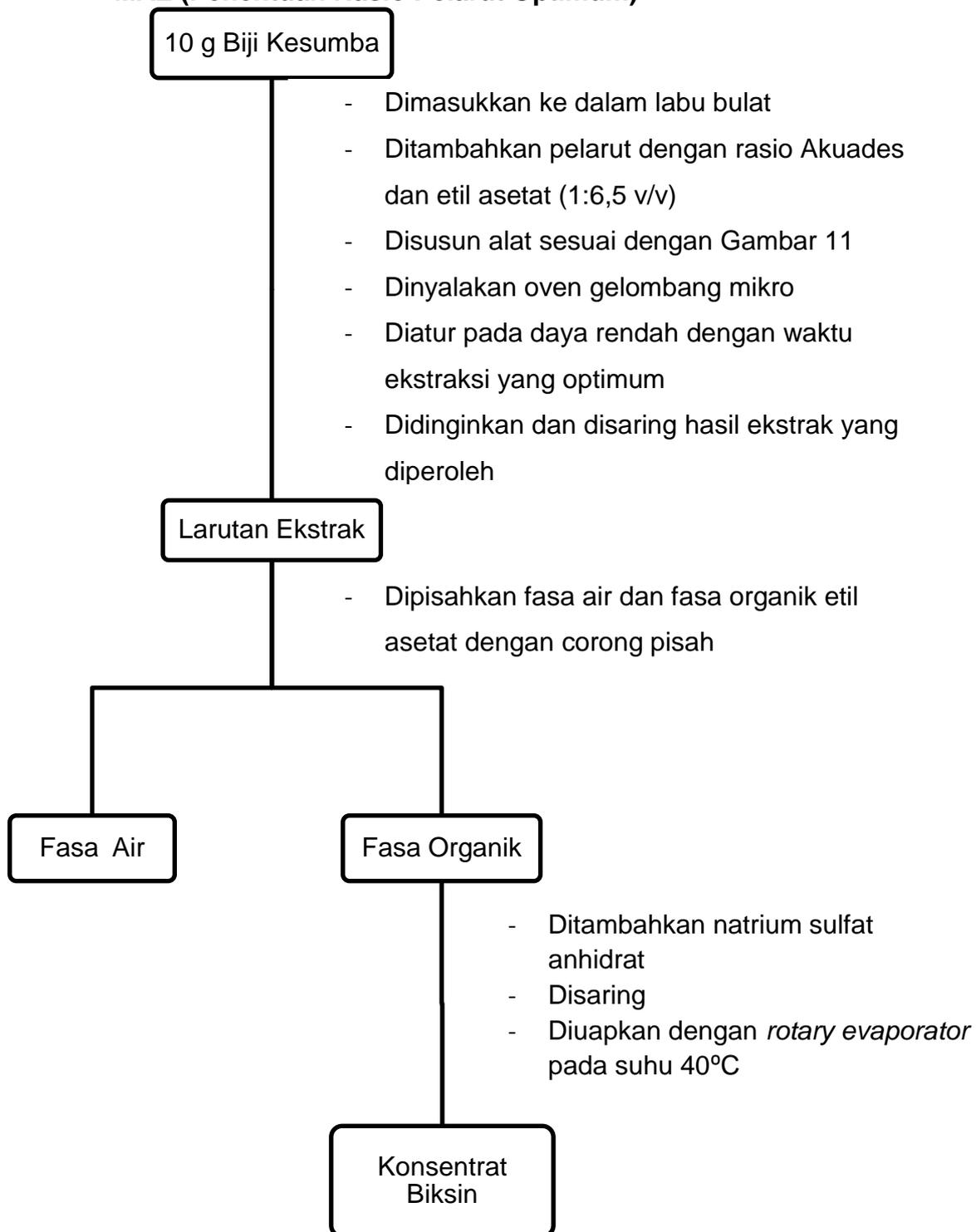
Lampiran 1. Bagan Kerja Ekstraksi Pigmen Biksin dengan Metode MAE (Penentuan Waktu Optimum)

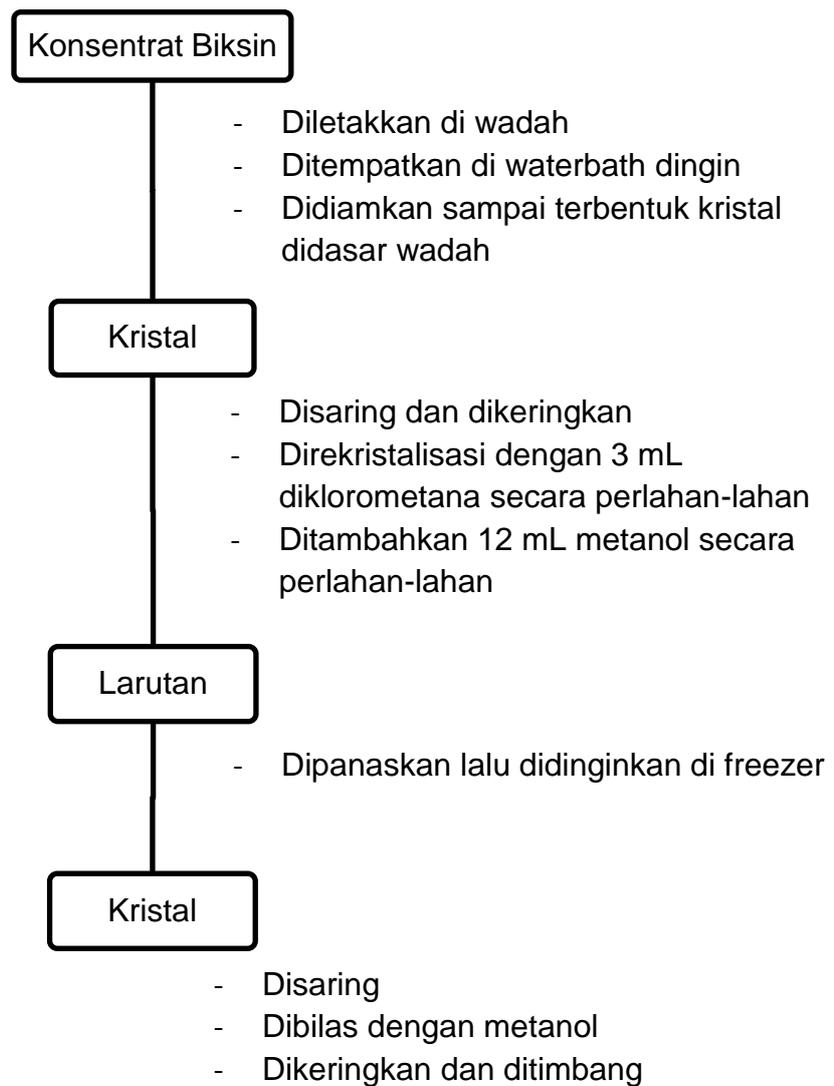




*Proses ekstraksi diulangi dengan waktu ekstraksi selama 10 dan 15 menit

Lampiran 2. Bagan Kerja Ekstraksi Pigmen Biksin dengan Metode MAE (Penentuan Rasio Pelarut Optimum)





*Proses ekstraksi diulangi dengan rasio pelarut akuades:etil asetat (1:7&1:8 v/v)

Lampiran 3. Perhitungan Perolehan Pigmen Biksin

1. Data Penelitian Ekstraksi Pigmen Biksin dengan Variasi Waktu Ekstraksi

Waktu (menit)	Massa Biji kesumba (gram)	Massa Biksin (gram)	Perolehan Pigmen Biksin (%)
5	10	0.0169	0.169
10	10	0.0291	0.291
15	10	0.0446	0.446

Daya microwave : Rendah

Rasio pelarut : Akuades : etil asetat (1:7,5 v/v)

$$\text{Perolehan Biksin (\%)} = \frac{m \text{ biksin}}{m \text{ biji kesumba}} \times 100$$

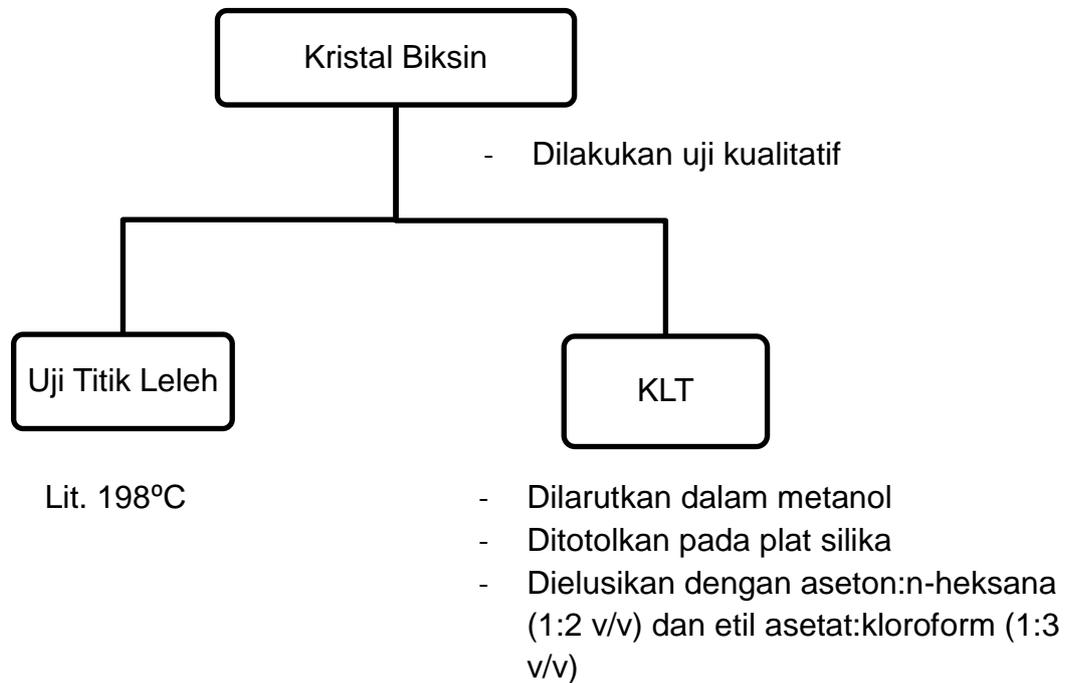
2. Data Penelitian Ekstraksi Pigmen Biksin dengan Variasi Rasio pelarut

Rasio Pelarut Akuades: Etil Asetat (v/v)	Volume total pelarut (mL)	Massa Biji Kesumba (gram)	Massa Biksin (gram)	Perolehan Pigmen Biksin (%)
1:6.5	75	10	0.0288	0.288
1:7	80	10	0.0469	0.469
1:8	90	10	0.0254	0.254

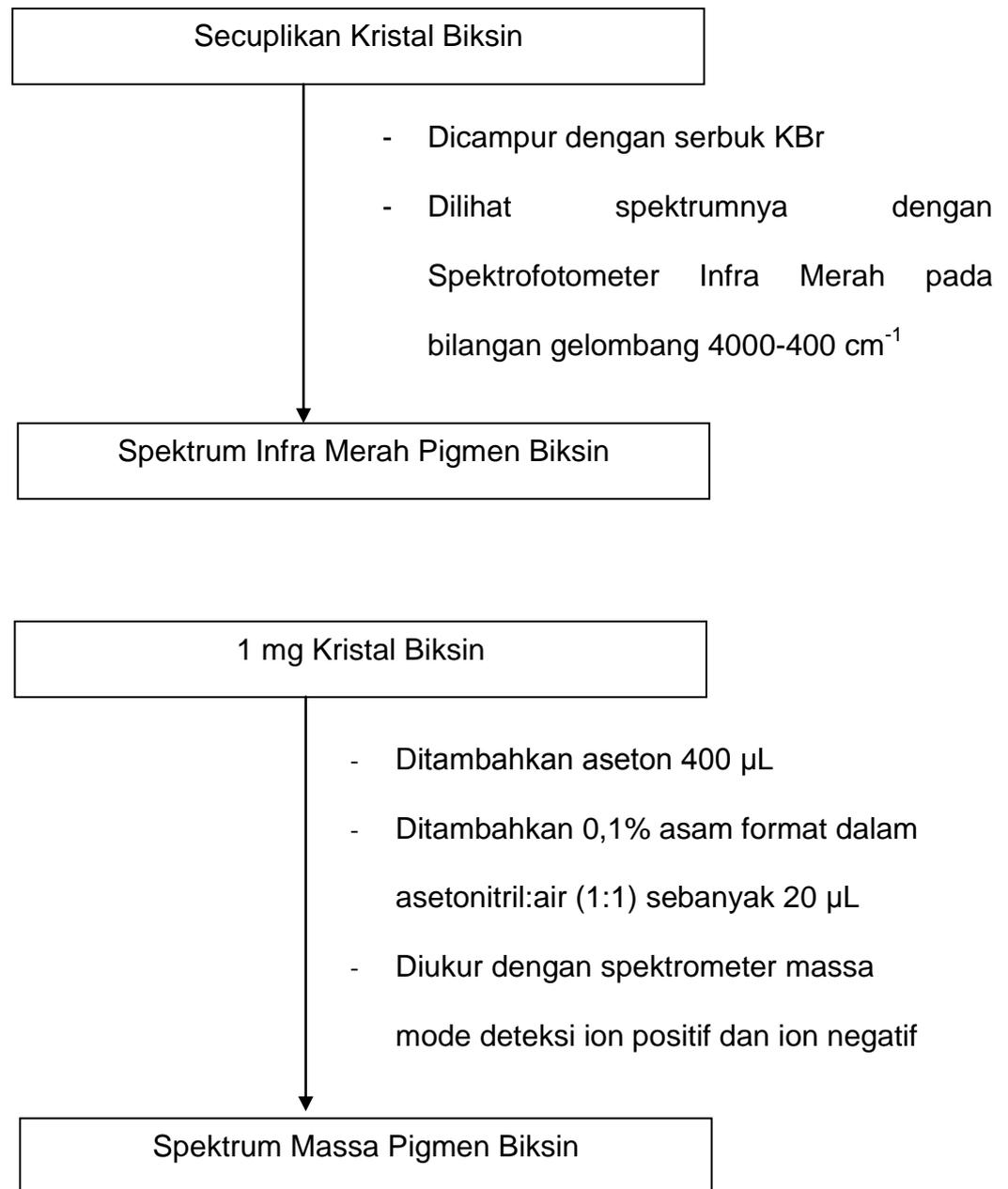
Daya microwave : Rendah

Waktu Ekstraksi Optimum : 15 menit

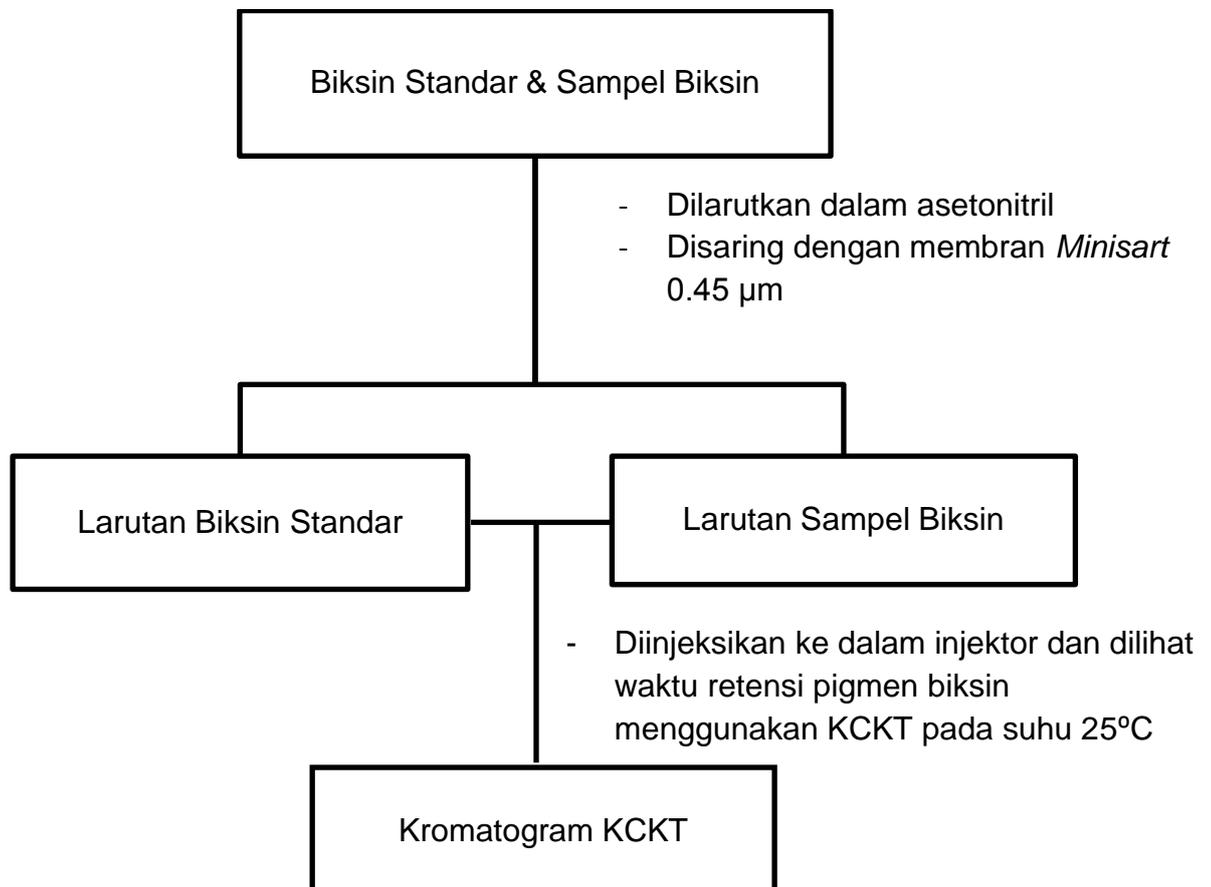
$$\text{Perolehan Biksin (\%)} = \frac{m \text{ biksin}}{m \text{ biji kesumba}} \times 100$$

Lampiran 4. Bagan Kerja Uji Kemurnian Pigmen Biksin

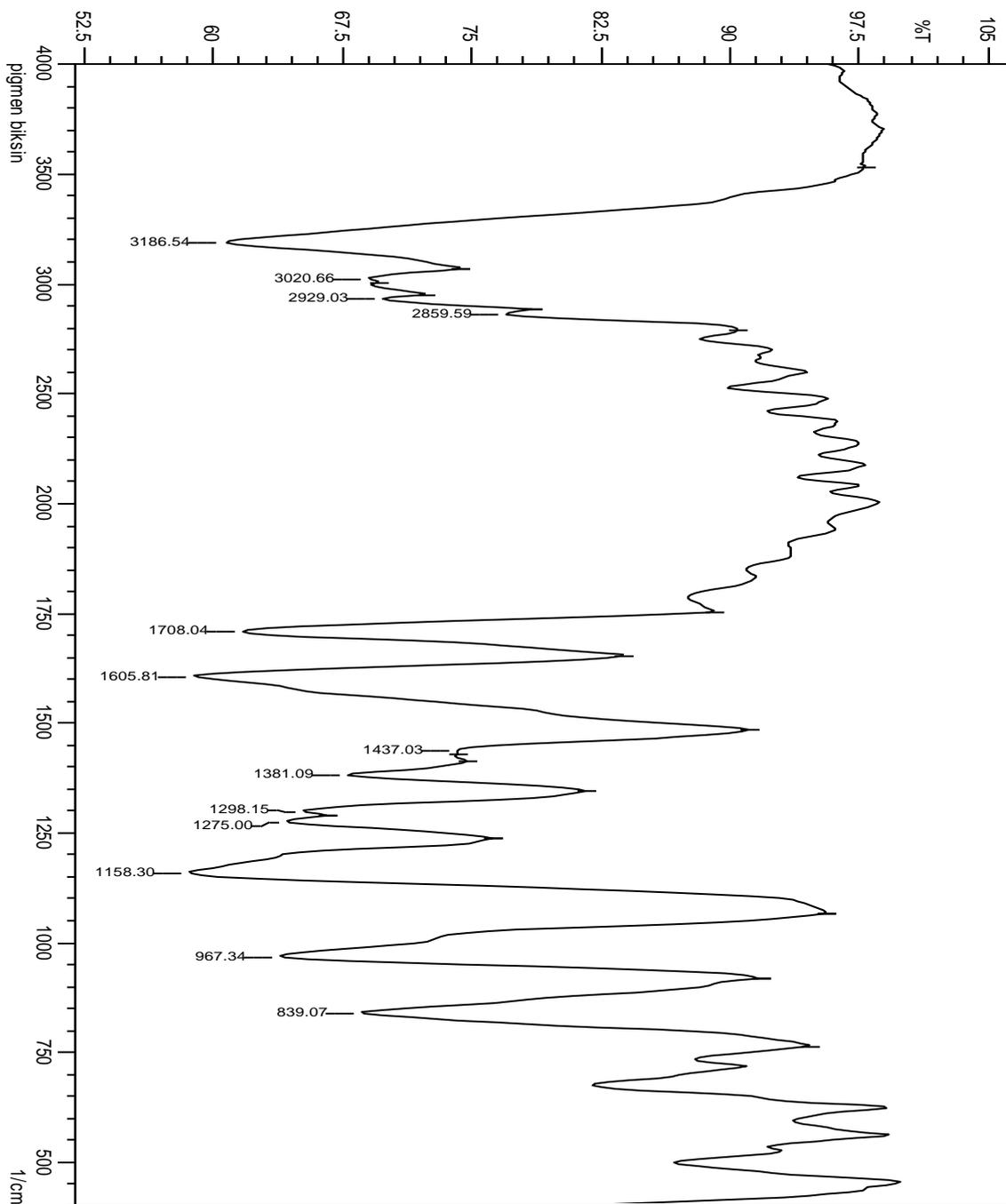
Lampiran 5. Bagan Kerja Identifikasi Struktur Molekul Pigmen Biksin dengan Spektrofotometer IR dan Spektrometer Massa



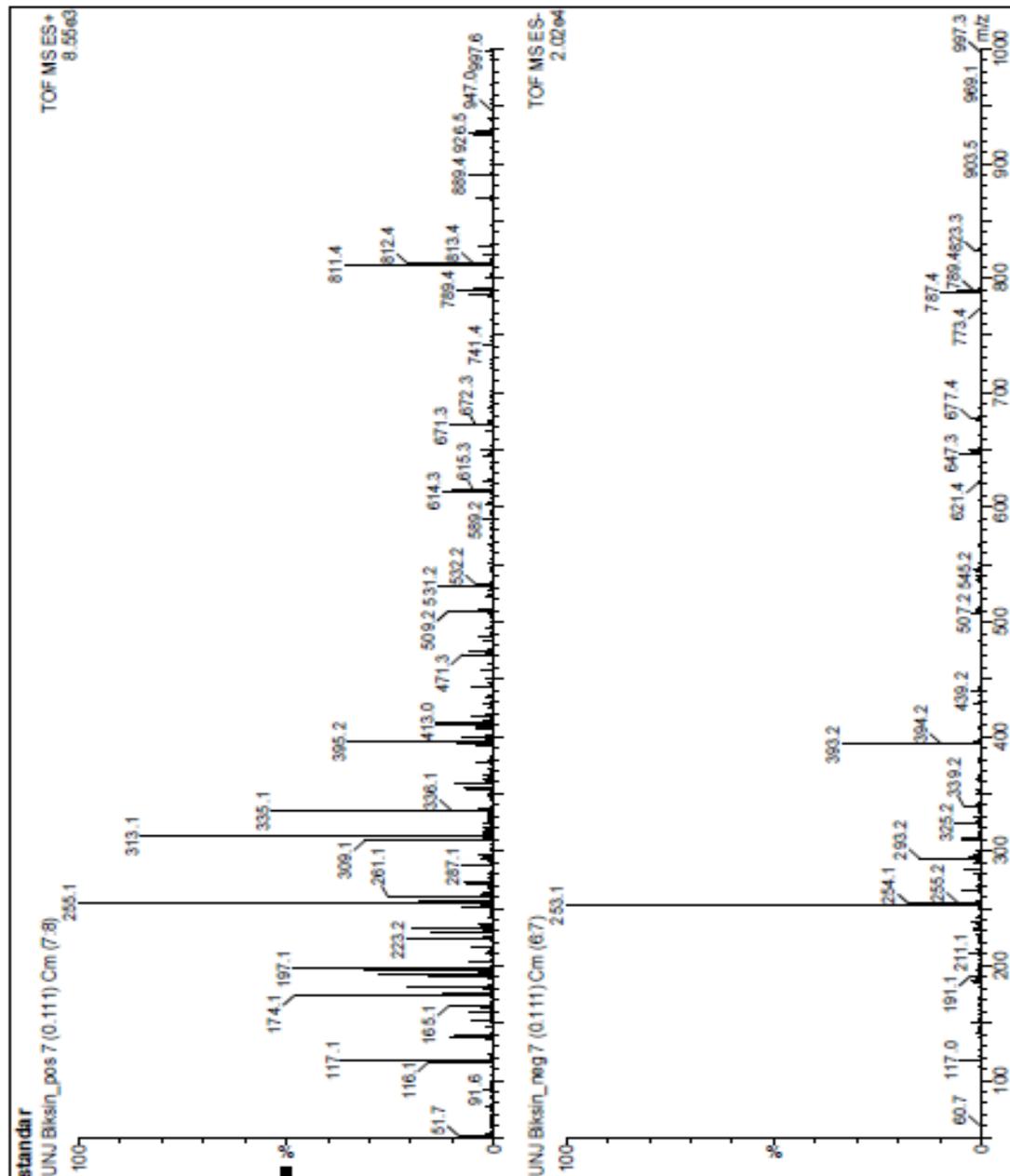
Lampiran 6. Bagan Kerja Identifikasi Komponen Pigmen Biksin dengan KCKT



Lampiran 7. Spektrum IR Pigmen Biksin



Lampiran 8. Spektrum Massa Pigmen Biksin



Lampiran 9. Kromatogram KCKT Biksin Standar



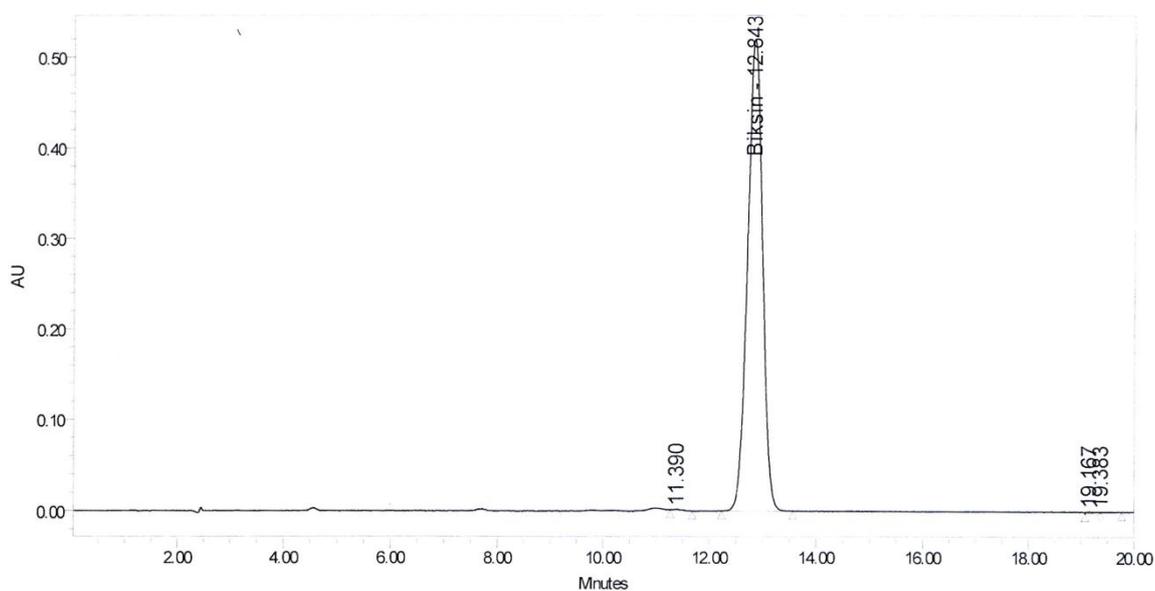
Default Individual Report

Reported by User: System

Project Name: Biksin

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Spl 106 (Std Biksin 47.6 ppm)	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Date Acquired:	5/8/2015 12:39:39 PM
Vial:	20	Acq. Method Set:	Biksin MS
Injection #:	2	Date Processed:	5/11/2015 10:31:35 AM
Injection Volume:	20.00 ul	Processing Method:	Biksin FM
Run Time:	20.0 Minutes	Channel Name:	biksin.2015
Sample Set Name:	Biksin 150508_a	Proc. Chnl. Descr.:	FDA 450.0 nm



Lampiran 10. Kromatogram KCKT Pigmen Biksin



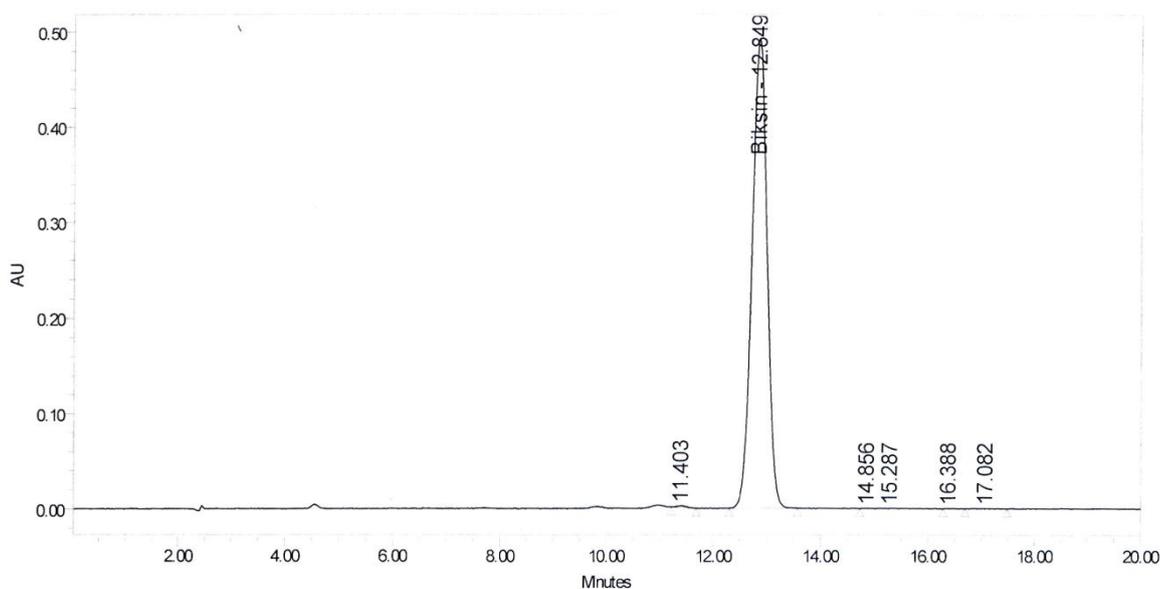
Default Individual Report

Reported by User: System

Project Name: Biksin

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Spl 105 (pigmen biksin)	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	5/8/2015 1:21:20 PM
Vial:	21	Acq. Method Set:	Biksin MS
Injection #:	2	Date Processed:	5/11/2015 10:31:36 AM
Injection Volume:	20.00 ul	Processing Method:	Biksin FM
Run Time:	20.0 Minutes	Channel Name:	biksin 2015
Sample Set Name:	Biksin 150508_a	Proc. Chnl. Descr.:	FDA 450.0 nm

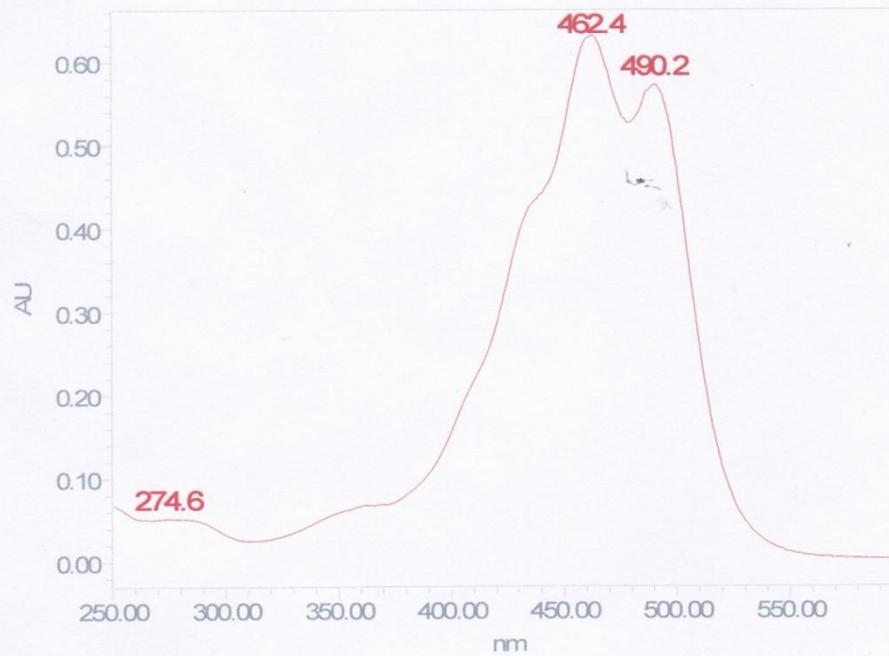


Perhitungan Konsentrasi Sampel Pigmen Biksin

$$\text{Konsentrasi standar} = \frac{2,38 \text{ mg}}{0.05 \text{ L}} = 47.6 \text{ ppm}$$

$$\text{Konsentrasi sampel (ppm)} = \frac{\text{Luas area puncak sampel}}{\text{Luas area puncak standar}} \times \text{Konsentrasi standar (ppm)}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi sampel (ppm)} &= \frac{9559317}{10098841} \times 47.6 \text{ ppm} \\ &= 45.057 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Lampiran 11. Spektrum UV-Vis Biksin Standar dan Pigmen Biksin**Spl 106 (Std Biksin λ 250 - 600 nm)****Spl 105 (Biksin λ 250 - 600 nm)**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya yang bertanda tangan dibawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta:

Nama : Yuni Astuti

No. Registrasi : 3325111349

Jurusan : Kimia

Program studi : Kimia

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul **“EKSTRAKSI PIGMEN BIKSIN DARI BIJI KESUMBA (*Bixa orellana* L.) DENGAN METODE *MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION* (MAE) DAN KARAKTERISASINYA”** adalah:

1. Dibuat dan diselesaikan oleh saya sendiri, berdasarkan data yang diperoleh dari hasil penelitian pada bulan Januari – April 2015.
2. Bukan merupakan duplikat skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain atau jiplakan karya tulis orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan saya ini tidak benar.

Jakarta, Juli 2015
Pembuat Pernyataan

Yuni Astuti

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



YUNI ASTUTI. Dilahirkan di Bekasi pada tanggal 26 Juni 1993. Anak ketiga dari tiga bersaudara, pasangan Bapak Sariman dan Ibu Syamah. Pendidikan formal yang pernah ditempuh oleh penulis berawal pada tahun 1999 di SDN Jatimekar I Bekasi, kemudian melanjutkan ke SMPN 9 Bekasi pada tahun 2005, dan pada tahun 2008 di SMAN 5 Bekasi. Lulus pada tahun 2011 dan diterima melalui jalur SNMPTN tertulis di Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta.

Selama masa perkuliahan, penulis pernah mengikuti kunjungan industri ke PT. Sosro dan PT. Sari Roti yang dilaksanakan pada tahun 2011 dan juga kunjungan industri ke Pocari Sweat Pasuruan pada tahun 2015. Selain itu, penulis juga pernah menjadi asisten laboratorium Praktikum Kimia Dasar Umum dan Praktikum Kinetika II.