

## ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF BIXIN PIGMENT FROM ANNATTO (*Bixa orellana* L.) SEEDS

### *Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Pigmen Bixin Selaput Biji Kesumba (Bixa orellana L.)*

Pipin T. Kurniawati<sup>1</sup>, H. Soetjipto<sup>1</sup> and Leenawati Limantara<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Satya Wacana Christian University, Jl. Diponegoro 52-61 Salatiga 50711

<sup>2</sup> Workstation of Mochtar Riady Institute for Nanotechnology, Lippo Karawaci

Received 29 January 2007; Accepted 21 February 2007

### ABSTRACT

Research on *Bixa orellana* L. have been done to isolate, identify and determine bixin percentage, the antioxidant and antibacterial activities of bixin from *B. orellana* seed. Isolation and identification of bixin was done by thin layer chromatography (TLC), column chromatography, chemical test of bixin and UV-Vis double beam spectroscopy. Percentage of bixin was calculated by JECFA method, the antioxidant activity was determined by DPPH (1-1 diphynilpicrylhidrazil) method while antibacterial activity was analyzed by the use of agar diffusion method. Thin layer chromatography (TLC) for the crude extract contained 5 spot, where spot 5th was bixin. *Bixa orellana* has 75±3% of bixin. Antioxidant activity of bixin had  $IC_{50}$  548.5±20.0 ppm. Whereas the antibacterial activity of bixin against the *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* could be classified as weak inhibition category at 500-750 µg and medium inhibition category at 1500 µg.

**Keywords:** *Bixa orellana* L., bixin, antioxidant, antibacteria.

### PENDAHULUAN

Warna seperti halnya citarasa, juga 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 [1]. *Bixa orellana* L. merupakan salah satu tanaman yang hasil pigmennya dapat digunakan sebagai pewarna makanan [2-5], kosmetik, dan tekstil [4]. Pigmen karotenoid yang terdapat dalam *B. orellana* adalah bixin dan norbixin [4, 6-10]. Menurut Tan [11] dan Alves dkk [12] bixin merupakan pigmen dominan pada *B. orellana* yang sebagian besar terdapat pada selaput biji.

Selain berfungsi sebagai pewarna, biji *B. orellana* juga mempunyai fungsi yang lain yaitu sebagai antioksidan [13] yang dapat menetralkan radikal bebas berlebihan, antibakteri [14], dan mengobati penyakit diabetes [13]. Umumnya fungsi pigmen biji *B. orellana* yang dilaporkan masih dalam bentuk ekstrak kasar. Berdasarkan latar belakang di atas penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi dan menentukan persen kadar pigmen bixin biji *B. orellana* serta menentukan aktivitas antioksidan dan antibakteri pigmen tersebut.

### METODE PENELITIAN

#### Bahan

Sampel yang digunakan adalah selaput biji *Bixa orellana* L. yang diambil di daerah Salatiga. Bahan kimia yang digunakan adalah aseton, CaCO<sub>3</sub> (Merck),

petroleum eter, etanol, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, betakaroten (Merck), akuades, sedangkan bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* FNCC 0047 dan *Escherichia coli* FNCC 0095 yang diperoleh dari laboratorium kimia Universitas Kristen Satya Wacana.

#### Prosedur Kerja

##### Ekstraksi Pigmen [15]

Ekstraksi pigmen dilakukan dengan menggunakan metode Britton yang telah dimodifikasi. Sebanyak 20 g sampel dilarutkan dengan aseton 100 mL dan ditambah CaCO<sub>3</sub> 1 g, setelah itu diaduk dan disaring menggunakan kertas Whatman no. 2. Filtrat yang diperoleh ditampung sedangkan residunya diekstraksi kembali menggunakan aseton 100 mL sampai seluruh pigmen terangkat. Ekstrak dipartisi menggunakan petroleum eter, lapisan eternya diambil dan ditambah Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kemudian disaring dan diuapkan. Ekstrak pekat yang diperoleh disimpan dalam botol dan dikeringkan dengan gas N<sub>2</sub>. Ekstrak kasar yang diperoleh sebanyak 0,75 g.

##### Isolasi dan Identifikasi Pigmen Bixin

##### Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak dianalisis menggunakan KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) dengan menotolkan sampel pada pelat KLT kemudian dielusikan dengan larutan aseton:heksana (1:2 v/v). Pola pemisahan pigmen digambar dan nilai R<sub>f</sub>nya dihitung.

\* Corresponding author. Phone: 0298-321212, fax: 0298-321433, Email address: shlimantara@yahoo.com.

### Kromatografi Kolom

Pigmen bixin diisolasi dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel Si-60 dan menggunakan fase gerak aseton:heksana (1:2 v/v). Masing-masing fraksi hasil pemisahan ditampung dalam botol sampel dan dikeringkan dengan gas N<sub>2</sub>. Semua fraksi dianalisa dengan melarutkannya dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dan warna *cornflower-blue* (biru keunguan) yang terbentuk menunjukkan bahwa fraksi tersebut merupakan pigmen bixin.

### Spektroskopi UV Tampak

Pengukuran spektra dilakukan untuk ekstrak kasar dan hasil isolasi menggunakan spektrofotometer berkas rangkap CARY 50 pada panjang gelombang 300-600 nm dengan pelarut aseton.

### Analisa Persen Kadar Pigmen Bixin [16]

Penentuan kadar pigmen dilakukan menurut JECFA. Sebanyak 0,1 g sampel dilarutkan dengan 100 mL aseton, diambil 1 mL kemudian dilarutkan dengan 100 mL aseton dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer berkas tunggal Shimadzu 1240 pada panjang gelombang 502 nm dengan ketelitian ± 0,005 Abs (pada 1,0 Abs). Persen kadar pigmen yang diperoleh dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ total bixin} = \frac{A}{2,870} \times \frac{100.000}{\text{berat sampel (mg)}} \times 100$$

Dalam penghitungan 0,1 g sampel dianggap setara dengan 1 g sampel, dimana A adalah absorbansi yang didapatkan.

### Uji Aktivitas Antioksidan [17]

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan menurut Panovska dkk [17]. Satu mL sampel dalam aseton ditambahkan pada 4 mL larutan DPPH 0,1 mM dalam larutan metanol 95%. Sebagai blanko digunakan 4 mL metanol 95% ditambah 1 mL aseton. Absorbansi pada 517 nm diukur setelah 30 menit inkubasi dengan spektrofotometer berkas tunggal Shimadzu 1240. Persen aktivitas penghambatan dihitung dengan rumus:

$$\text{Persen penghambatan} = \frac{[DPPH]_0 - [DPPH]_s}{[DPPH]_0} \times 100\%$$

$[DPPH]_0$  = Konsentrasi DPPH awal

$[DPPH]_s$  = Konsentrasi DPPH akhir yang tersisa

Sebagai pembanding digunakan betakaroten murni dan nilai IC<sub>50</sub> dihitung dengan persamaan regresi.

**Tabel 1.** Kisaran Rf dan warna hasil pemisahan pigmen.

| Total ke | Warna       | Kisaran Rf |   |   |       | ekstrak |
|----------|-------------|------------|---|---|-------|---------|
|          |             | Fraksi     |   |   |       |         |
|          |             | 1          | 4 | 5 | 1,4,5 |         |
| 1        | Orange tua  | 0,80       | - | - | 0,80  | 0,80    |
| 2        | Orange muda | -          | - | - | -     | 0,51    |

### Uji Antibakteri dengan Metode Difusi Agar

Sebanyak 1 ose biakan bakteri yang berumur 18-24 jam dipindahkan ke dalam media agar miring Nutrient Agar (NA). Bakteri tersebut diinkubasi dalam suhu ruang selama 18-24 jam. Biakan bakteri dari NA tersebut diambil beberapa ose kemudian dimasukkan dalam larutan garam 0,85 % sampai memiliki OD 0,131-0,139 pada panjang gelombang 600 nm atau setara dengan 0,5 dari standar Mac Farlands. Satu mL dari larutan tersebut dimasukkan dalam cawan petri steril dan ditambah 9 mL medium Mueller Hinton (MH). Cawan digoyang dan dibiarkan beberapa saat hingga agar memadat.

Tiga buah cakram kertas berdiameter 6 mm yang telah ditetesi bixin dengan konsentrasi 500, 750 dan 1500 µg diletakkan pada permukaan agar yang telah memadat. Selanjutnya cawan diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pengukuran dilakukan dengan melihat diameter daerah hambatan (DDH) dari zona yang dihasilkan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi dan Identifikasi Pigmen

Pigmen bixin diidentifikasi berdasarkan hasil KLT, uji kimia dan hasil spektroskopi UV-Tampak.

### Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

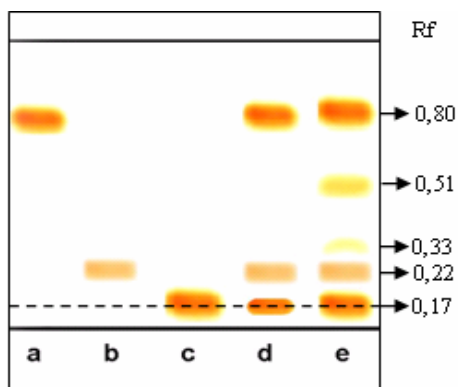
Ekstrak dipisahkan dengan kromatografi kolom menggunakan fase gerak aseton:heksana (1:2 v/v) dan fase diamnya silika gel. KLT untuk hasil kolom disajikan pada Gambar 1 dan Tabel 1.

Hasil kromatografi kolom yang berhasil dipisahkan adalah fraksi 1, 4, dan 5, sedangkan fraksi 2 dan 3 tidak dapat diambil karena jumlahnya yang sangat sedikit. Jika dilihat dari warna yang dihasilkan, fraksi 5 berwarna orange kemerahan sesuai dengan warna bixin pada literatur [16].

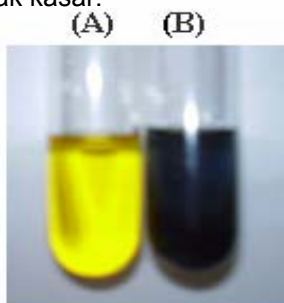
Semua fraksi diidentifikasi dengan menambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dan jika diperoleh warna *cornflower-blue* menunjukkan fraksi tersebut adalah bixin. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa fraksi 5 adalah bixin (Gambar 2).

### Spektroskopi

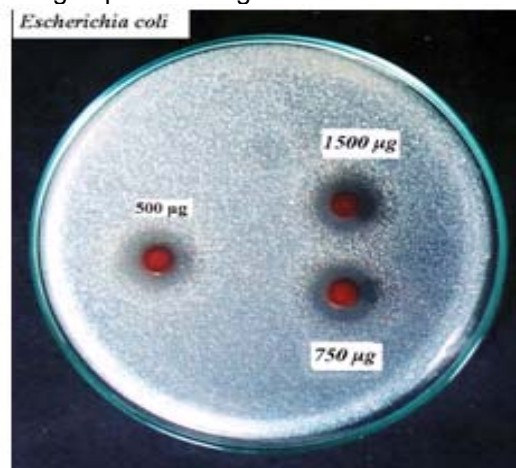
Pigmen hasil isolasi dan ekstrak kasar juga diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer CARY 50 pada panjang gelombang 300-600 nm. Hasil spektra disajikan pada Gambar 3 dan Tabel 2.



**Gambar 1.** Hasil scan pola pemisahan pigmen (a.) fraksi 1, (b.) fraksi 4, (c.) fraksi 5, (d.) gabungan fraksi 1, 4, 5 dan (e.) ekstrak kasar.



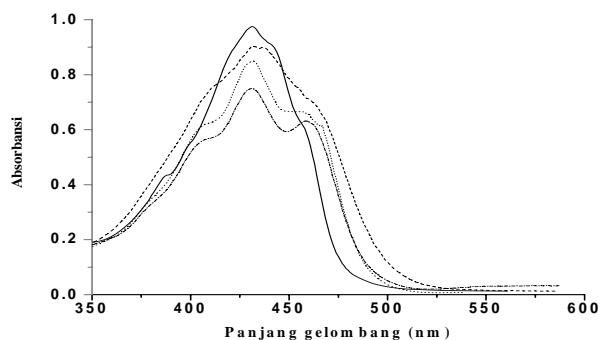
**Gambar 2.** Hasil identifikasi pigmen bixin untuk fraksi 5 sebelum (A) dan sesudah (B) penambahan  $H_2SO_4$ .



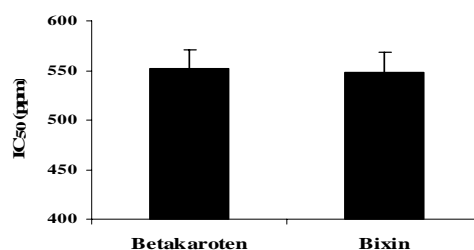
**Gambar 5.** Zona penghambatan pigmen bixin terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

**Tabel 2.** Serapan maksimum spektra bixin dalam aseton.

| Sampel        | $\lambda$ maks(nm) |           |
|---------------|--------------------|-----------|
|               | Hasil              | Referensi |
| Ekstrak kasar | 410                | -         |
| Fraksi 1      | 458                | -         |
| Fraksi 4      | 430                | -         |
| Fraksi 5      | 454                | 457       |



**Gambar 3.** Pola spektra ekstrak kasar (\_\_\_\_), fraksi 1 (-----), fraksi 4 (.....) dan fraksi 5 (-.-.-) dalam aseton.



**Gambar 4.** Diagram batang aktivitas antioksidan bixin dengan pembandingan betakaroten.

**Tabel 3.** Persen kadar pigmen bixin.

| Ulangan   | Total Bixin (%) |
|-----------|-----------------|
| 1         | 69,69           |
| 2         | 73,13           |
| 3         | 73,13           |
| 4         | 76,65           |
| 5         | 80,14           |
| 6         | 73,13           |
| 7         | 76,65           |
| $\bar{x}$ | 74,65           |
| SE        | 3,15            |

**Tabel 4.**  $IC_{50}$  Bixin dan betakaroten.

| IC <sub>50</sub> | Betakaroten | Bixin |
|------------------|-------------|-------|
| $\bar{\chi}$     | 551,4       | 548,5 |
| SE               | 14,5        | 20,0  |

Dari pola spektra (Gambar 3) tampak bahwa fraksi 5 memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 454 nm mendekati serapan maksimum bixin dari literatur [16]. Hasil serapan maksimum masing-masing spektra disajikan pada Tabel 2.

### Persen Kadar Pigmen Bixin

Persen kadar pigmen selaput biji *B. orellana* dianalisis dengan spektrofotometer berkas tunggal Shimadzu 1240 pada panjang gelombang 502 nm (Tabel 3). Berdasarkan hasil penelitian total purata bixin yang diperoleh adalah 75±3%. Hasil penelitian yang diperoleh sesuai dengan hasil literatur, dimana besar persen kadar pigmen bixin pada literatur yaitu ± 80% [12, 13].

### Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan diukur menggunakan metode DPPH yang hasilnya disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 4. Tabel 4 dan Gambar 4 menunjukkan bahwa IC<sub>50</sub> untuk bixin adalah 548 ± 20 ppm sedangkan untuk betakaroten diperoleh hasil 551 ± 14 ppm. Atoui dkk. [18] menyatakan bahwa semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> semakin besar aktivitas antioksidannya. Penelitian kali ini dilakukan untuk membandingkan IC<sub>50</sub> dari pigmen murni bixin dengan pigmen murni betakaroten. IC<sub>50</sub> yang dihasilkan bixin tidak berbeda jauh dengan betakaroten, sehingga dapat disimpulkan bahwa pigmen bixin juga berpotensi sebagai antioksidan alami seperti halnya betakaroten.

Bixin dan betakaroten termasuk dalam kelompok karotenoid sehingga mekanisme kerja antioksidan kedua pigmen tersebut hampir sama. Secara umum mekanisme kerja karotenoid sebagai antioksidan adalah sebagai berikut:



Karotenoid dapat berfungsi sebagai pemadam (*quencher*) singlet oksigen [19-22] dengan cara memadamkan potensi berbahaya singlet oksigen dan mengubahnya menjadi triplet oksigen. Karotenoid yang tereksitasi tersebut akan melepaskan panas kemudian kembali menjadi karotenoid yang stabil. Gordon [23] mengatakan bahwa antioksidan sekunder bekerja dengan cara mengikat singlet oksigen dan mengubahnya ke bentuk triplet oksigen. Dari mekanisme kerja antioksidan karotenoid di atas maka karotenoid bixin dapat digolongkan ke dalam antioksidan sekunder.

**Tabel 5.** Data hasil diameter daerah hambatan pigmen bixin terhadap bakteri *E. coli* fnc 0095 dan *S. aureus* fnc 0047

| Bakteri          | Diameter daerah hambatan (mm) |          |           |
|------------------|-------------------------------|----------|-----------|
|                  | 500 (µg)                      | 750 (µg) | 1500 (µg) |
|                  | $\bar{\chi} \pm \text{SE}$    |          |           |
| <i>E. coli</i>   | 7,2±0,2                       | 8,0±0,2  | 9,1±0,2   |
| <i>S. aureus</i> | 7,2±0,2                       | 8,4±0,1  | 9,4±0,1   |

Jika dilihat dari fungsinya, karotenoid juga dapat digolongkan sebagai antioksidan tersier karena dapat memperbaiki kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas [19, 20]. Hal ini sesuai dengan literatur yang mengatakan bahwa antioksidan tersier berperan untuk memperbaiki kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas [24].

### Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri bixin dilakukan dengan mengukur diameter daerah hambatan (DDH) dengan metode difusi agar. Hasil DDH untuk bakteri *E. coli* FNCC 0095 dan *S. aureus* FNCC 0047 tampak pada Gambar 5 dan Tabel 5.

Gambar di atas memperlihatkan adanya penghambatan terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dengan melihat adanya daerah hambatan di sekitar cawan kertas. Hasil tersebut menandakan bahwa pigmen bixin berpotensi sebagai senyawa antibakteri. Tabel 5 dan Gambar 5 menunjukkan bahwa peningkatan DDH seiring dengan peningkatan konsentrasi sampel yang dimasukkan ke dalam cakram. Semakin pekat suatu sampel maka semakin besar DDH yang dihasilkan.

Mekanisme kerja senyawa antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah dengan merusak dinding sel dari bakteri. Bila dinding sel bakteri tersebut rusak, maka dapat merubah permeabilitas sel, merubah molekul protein dan asam nukleat, serta menghambat kerja enzim, sintesis asam nukleat dan protein dari sel bakteri tersebut, sehingga menyebabkan kematian bakteri [25].

Berdasarkan pengklasifikasian sifat antibakteri dari Proestos dkk [26] penghambatan pigmen bixin terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* pada konsentrasi 500-750 µg tergolong dalam kelompok yang memiliki aktivitas antibakteri lemah, dan pada konsentrasi 1500 µg tergolong dalam kelompok yang memiliki aktivitas antibakteri sedang.

### KESIMPULAN

Fraksi 5 hasil isolasi ekstrak pigmen selaput biji *B. orellana* teridentifikasi sebagai pigmen bixin dengan persen kadar sebesar 75±3%. Pigmen bixin

mempunyai aktivitas antioksidan berdasarkan IC<sub>50</sub> sebesar 548,5±20,0 ppm. Pada konsentrasi 500-750 µg bixin memiliki aktivitas antibakteri yang lemah sedangkan pada konsentrasi 1500 µg memiliki aktivitas antibakteri sedang terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung dengan dana penelitian yang diperoleh Leenawaty Limantara dari The Academy of Sciences for the Developing World (TWAS) Italy dan Alexander van Humboldt, Jerman.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Djarismawati, Sugiharti, and Naingolan, 2004, *Jurnal Ekologi Kesehatan.*, 3, 7-12
- Mckeown, G.G., 1963, *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 46(5), 6-790
- Wurts, M.L and Torreblanca, R.A., 1983, *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 33(3), 19-606
- Francis, F.J., 2000, *Cereal Foods World*, 45, 198-203
- Patil, J. and Balasubramanian, V., 2001, *Int. J. of Pharma. Excipients*, 3(4), 89-93
- Nishizawa, M., Chonan, T., Sekijo, I., and Suggi, T., 1983, *Hokkaidoritsu Eisei kenkyushoho*, 33, 28-34
- Hirata, K., Hirokado, M., Uematsu, Y., Nakajima, K., and Kazama, M., 1989, *Tokyo-toritsu Eisei Kenkyusho kenkyu Nenpo*, 40, 82-178
- Tricard, C., Cazabeil, J.M., and Bernard, 1998, *Sciences des Aliments*, 18(1), 25-40
- Gulrajani, M.L., Gupta, D., and Maulik, S.R., 1999, *Ind. J. Fibre & Textile Res.*, 24(2), 131-135
- Levy, L.W. and Rivadeneira, D.M., 2000, *Annatto, IFT Basic Symposium Series*, 14, 115-152
- Tan, Y., 1987, Bixin, *Shipin Kexue*, 86, 6-8
- Alves, R.W., Jauregi P., Ulson de Souza A.A., and Ulson de Souza S.M.A.G., 2005, *Recovery of norbixin using colloidal gas aphrons (CGAS)*, 2<sup>nd</sup> Merosur Congress on Chemical Engineering dan 4<sup>nd</sup> Merosur Congress on Process Engineering, (1-9).
- Toledo De Oliveira T., Nagem T.J., Rocha Da Costa M., Marciano Da costa L., Magalhaes N.M., Stringheta P.C., Queiroga De Lima E., Kling De Moraes G.H., and Da Silva H., 2004, *Ars Pharma.*, 45(1), 5-20
- Galindo-Cuspina, Giusti, M.M., and Rankin, S.A., 2003, *Bioautography and Characterization of the Antimicrobial Compounds Present in commercial Annatto Extracts*, Food Chemistry: Enzymes, vitamins and plant pigments, Session 92A-2.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., 1982, *Carotenoids: Isolation and Analysis*, Birkhäuser Verlag Basel. Boston. Berlin, 1A. 93-94.
- JECFA, 1992, *Annatto Extracts*, FNP 25 dan FNP 52.
- Panovska, T., Kulevanova, S., and Stefova, M., 2005, *Acta Pharm.*, 55, 207-214
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G. and Kefalas, P., 2005, *J. Food Chem.*, 8, 27-36
- Krinsky, N.I., 1979, *Pure appl. Chem.*, 51, 649-660.
- Krinsky, N.I., 1989, *Beta-carotene: Function*, In New Protective Roles for Selected Nutrients, G.A. Spiller dan J. Scala, eds. Alan R. Liss. New York. Pp. 1-5.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V., 2001. 3: *Inhibiting Oxidation*, Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC. 22-70, in Pokorny, J., Yanishlieva, N., dan Gordon, M., 2003, *Antioxidant in Food Practical application*, Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC.
- Trilaksana, W., 2003, *Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran terhadap Kesehatan*, Term paper, Intoductory Science Phylosophy (PPS702), Graduate Program/S3, Institut Pertanian Bogor.
- Gordon, M.H., 1990, *The Mechanism of Antioxidants Action In Vitro*, in : B.J.F. Hudson, aditor. Food Antioxidant, Elsvier Applied Science, London.
- Karyadi, E., 1997, *Antioksidan Resep Sehat dan Umur Panjang*, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Plectzar, J.M. and Chan, E.C.S., 1998, *Dasar-dasar Mikrobiologi, Edisi kedua*, Universitas Indonesia Press, Jakarta
- Proestos, C., Dozarus, I.S., Nychar, G.J.E., and Komaitis, M., 2005, *J. Food Chem.*, 95, 664-671