

Isolasi Lutein dari Bunga Kenikir (*Tagetes erecta* L.) dan Identifikasi Menggunakan *Fourier Transformed Infra Red* dan Kromatografi Cair Spektrometri Massa

(Isolation of Lutein from Kenikir Flowers (*Tagetes erecta* L.) and Identification by *Fourier Transformed Infra Red* and Liquid Chromatography Mass Spectrometry)

KUSMIATI^{1*}, SWASONO R. TAMAT², TRIA AJENG ILMIARTI²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911.

²Fakultas Farmasi-Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa Jakarta 12640.

Diterima 2 April 2015, Disetujui 26 Juni 2015

Abstrak: Lutein merupakan karotenoid golongan xantofil yang digunakan untuk pewarna alami dan bersifat antioksidan yang mampu mencegah berbagai penyakit termasuk kanker. Senyawa ini ditemukan dalam jumlah besar pada bunga kenikir (*Tagetes erecta* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi lutein dari bunga kenikir jenis lokal. Serbuk kering bunga kenikir dimaserasi dengan *n*-heksan, kemudian maserat didigesti dengan isopropanol dan disaponifikasi menggunakan larutan NaOH 50% hingga terbentuk semisolid. Selanjutnya, dilarutkan dengan air hingga terbentuk endapan halus dan disentrifus. Residu yang dihasilkan difraksinasi dengan kromatografi kolom silika gel dengan fase gerak *n*-heksan-kloroform-aseton (6:2:2) secara isokratik menghasilkan fraksi 3 dan 4 yang mempunyai nilai R_f pada KLT mirip dengan lutein BP (0,39-0,40). Identifikasi dengan spektrofotometri cahaya tampak menunjukkan panjang gelombang serapan maksimum pada 447 nm, dengan spektrofotometri FT-IR menunjukkan adanya gugus fungsi C-H tekuk, C-H ulur, C=C, serta –OH. Analisis KCKT dengan kolom C₁₈ dan eluen metanol-diklorometan-asetonitril (67,5 : 22,5 : 10 v/v) menunjukkan waktu retensi sama dengan lutein BP (3,48-3,53 menit), dan analisis KG-SM menunjukkan berat molekul 568 serta fragmentasi sama dengan lutein BP. Penelitian menyimpulkan bahwa lutein dapat diisolasi dari bunga kenikir dengan rendemen sebesar 5,26% dan lutein kasar sebanyak 32,23%.

Kata kunci: Lutein, kenikir, *Tagetes erecta* L., FTIR, KC/SM.

Abstract: Luteins belong to xantofil group of carotenoid which is used as natural dyes and antioxidants that can prevent people from having diseases including cancer. This compound is found in large quantities in marigold flower (*Tagetes erecta* L.). This study was aimed to isolate and identify the lutein contained in the local marigold species. Dry powder of marigold flowers was macerated with *n*-hexane, then the maserat was digested with isopropanol, saponified using NaOH 50% to form a semisolid, then diluted with water to form a smooth deposition and centrifuged. The residue resulted was fractionated by silica gel column chromatography with a mobile phase of *n*-hexane-chloroform- acetone (6:2:2) in isocratic to yield fractions 3 and 4 with R_f values on TLC plate was similar to the lutein reference standard (0.39-0,40). Identification with visible light spectrophotometry showed a wavelength of maximum absorption at 447 nm; with FT- IR spectrophotometry showed the absorption of C-H bend, C-H stretch, C=C and –OH. HPLC analysis with a C₁₈ stationary phase and methanol-dichloromethan-acetonitrile (67,5 : 22,5 : 10 v/v) as mobile phase showed retention time similar with the lutein reference standard (3.48-3.53 minutes) and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) analysis showed a molecular weight of 568 and fragmentation similar with the lutein reference standard. The study concludes that lutein can be isolated from marigold flowers with 5.26% yield and 32,23% of crude lutein.

Keywords: Lutein, marigold flower, *Tagetes erecta* L., FT-IR, LC-MS.

* Penulis korespondensi, Hp. 08129506580
e-mail: kusmiati02@yahoo.com

PENDAHULUAN

LUTEIN (xantofil, β, ϵ -carotene-3,3'-diol) merupakan karotenoid yang dominan pada retina mata yang berperan sebagai fotoprotektan⁽¹⁾. Lutein digunakan untuk pewarnaan jaringan hewan dan produknya, selain itu sebagai pewarna makanan, minuman dan kosmetik⁽²⁾. Lutein telah dilaporkan mempunyai aktifitas antioksidan dan mampu menghambat berbagai penyakit seperti penyakit kardiovaskular⁽¹⁾. Lutein dapat menstimulasi respon imun⁽³⁾, mampu menghambat perkembangan katarak, perkembangan awal aterosklerosis^(4,5), juga menghambat terjadinya kebutaan atau menurunnya penglihatan yang disebabkan faktor bertambahnya usia (*age macular degeneration/ AMD*). Lutein dan zeaxantin dilaporkan juga memiliki kemampuan untuk menyerap sinar biru yang merusak retina dan mampu meningkatkan daya antioksidatif^(6,7).

Sinar biru merupakan sinar dengan panjang gelombang (λ) antara 400-500 nm yang masih dapat diterima oleh mata dan bisa mencapai retina sehingga menyebabkan kerusakan mata. Pada anak-anak usia hingga 10 tahun, sinar biru sangat mudah diterima oleh retina mata sehingga berpotensi menimbulkan luka fotokimia dan bisa menyebabkan degenerasi makula yang akan muncul pada saat dewasa atau yang disebut AMD⁽⁸⁾. Dalam jangka pendek, sinar biru dapat mengganggu kerja retina sehingga bersifat merusak karena menghasilkan radikal bebas oksigen. Oleh karena itu, perlindungan terhadap bahaya sinar biru harus dilakukan sedini mungkin, salah satunya dengan mengkonsumsi lutein⁽⁸⁾.

Dalam tubuh manusia, lutein ditemukan berakumulasi di bagian retina mata yang berwarna lebih kuning dari sekitarnya yang disebut *macula lutea* (bintik kuning). Bagian ini merupakan tempat penerima rangsang penglihatan yang terbaik, sehingga diketahui lutein mempunyai peranan penting untuk kesehatan mata⁽⁹⁾. Lutein juga terakumulasi pada serum/plasma manusia dan dalam air susu ibu (ASI)^(10,11,12).

Sayur-sayuran berubah warna dari hijau menjadi kuning ketika terjadi proses penuaan, karena pengaruh kandungan lutein. Pada proses penuaan tersebut, pigmen hijau klorofil mengalami degradasi sehingga pigmen yang lain seperti lutein menjadi mudah terlihat. Tubuh manusia tidak dapat mensintesis lutein sehingga lutein hanya diperoleh melalui makanan seperti buah-buahan, sayuran hijau dan kuning telur^(10,11,12). Lutein dapat digunakan sebagai suplemen untuk kesehatan. Pada kondisi stres oksidatif, suplementasi lutein dapat dijadikan salah satu jalan keluar. Menurut penelitian Hadden *et al.*,

lutein dalam bentuk ekstrak bunga kenikir (*marigold*) aman dikonsumsi sebagai suplemen⁽¹³⁾.

Bunga kenikir merupakan tanaman dari keluarga Asteraceae yang tersebar luas di seluruh dunia dengan berbagai spesies dan biasa digunakan sebagai tanaman hias. Bunga kenikir (*Tagetes erecta* L.) diketahui mengandung senyawa karotenoid seperti lutein, beta-karoten, alfa-karoten, zeaxantin, antraxantin dan alfa-kriptoxantin⁽¹⁴⁾. Bunganya berwarna kuning diduga mengandung lutein dalam jumlah besar karena lutein merupakan pigmen berwarna kuning⁽¹⁵⁾, namun senyawa karotenoid yang terdapat dalam tumbuhan masih berupa karotenoid ester^(8,15).

Penelitian ini mengacu pada hasil penelitian Madhavi *et al.* yang telah melakukan isolasi karotenoid dari tanaman kenikir (*Tagetes erecta* L.) dan penelitian Kusmiati dkk. (2010), namun dilakukan berbagai modifikasi pada metode ekstraksinya dan dilakukan terhadap bunga kenikir jenis lokal^(14,16). Lutein kasar yang diperoleh dimurnikan menggunakan kromatografi kolom. Hasil isolasi diidentifikasi dengan *Fourier Transformed Infra Red* (FTIR), spektrofotometri ultraviolet cahaya tampak. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan metode modifikasi Li Hua Bin *et al.*⁽¹⁷⁾, serta metode Kromatografi Cair Spektrometri Massa (KC-SM).

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bunga kenikir, *n*-heksan, isopropanol, NaOH, kloroform, aseton, metanol, diklorometan, asetonitril, plat silika gel 60 GF²⁵⁴.

METODE. Penyiapan Bunga Kenikir (*Tagetes erecta* L.). Bunga kenikir berasal dari Taman Bunga Nusantara, Cipanas, Jawa Barat. Tanaman dideterminasi di bagian Botani, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Bagian mahkota bunga yang sudah mekar dikeringkan kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan saringan berdiameter 40 μ m.

Penetapan Kadar Air. Kadar air ditetapkan menggunakan *moisture meter* dengan metode Karl Fisher. Sebanyak 4,44 mg serbuk kering bunga kenikir dimasukkan ke dalam 5 mL pereaksi Karl Fisher, selanjutnya *moisture meter* dioperasikan sesuai prosedur dan hasil kadar air dapat diketahui.

Identifikasi Golongan Triterpenoid. Sebanyak 1,0 gram serbuk kering bunga kenikir dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam (dalam wadah dengan penutup rapat) disaring dan diambil filtratnya 5 mL. Filtrat tersebut diuapkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu. Residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann-Buchard). Warna merah,

ungu menunjukkan adanya senyawa golongan triterpenoid⁽¹⁸⁾.

Ekstraksi Lutein dari Mahkota Bunga Kenikir (*Tagetes erecta* L.) (Modifikasi Metode Madhavi)⁽¹⁴⁾. Sejumlah 10 g serbuk kering bunga kenikir dimaserasi dengan 200 mL heksan selama 24 jam. Heksan selanjutnya diuapkan di penangas air hingga diperoleh ekstrak heksan. Ekstrak didigesti dengan 15 mL isopropanol kemudian dipanaskan pada suhu 50 °C sambil diaduk homogen dengan pengaduk magnet selama 1 jam. Selanjutnya disaponifikasi dengan 22,5 mL larutan NaOH 50% dan diaduk homogen hingga terbentuk semisolid dan didinginkan pada suhu ruang. Campuran semisolid ditambah 37,5 mL air dan diaduk homogen sampai lutein dan karotenoid lainnya terpisah ditandai dengan adanya endapan berwarna kuning yang halus. Endapan dikumpulkan dengan disentrifuga dan dicuci dengan campuran isopropanol-air (1:14) sampai supernatan tidak berwarna dan selanjutnya di oven vakum 40 °C sehingga terbentuk ekstrak lutein kasar kering dan ditimbang.

Analisis Kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Analisis lutein secara kualitatif menggunakan KLT dilakukan dengan menotolkan 20 µL ekstrak lutein kasar pada lempeng silika gel 60 GF₂₅₄. Sampel diekspansi dengan larutan campuran heksan-kloroform-aseton (6:2:2)⁽¹⁴⁾. Pola bercak lutein diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang (λ) 366 nm.

Pemurnian dengan Kromatografi Kolom. Kromatografi kolom dilakukan untuk memperoleh fraksi-fraksi mengandung lutein yang lebih murni. Pemurnian dilakukan pada kolom berisi silika gel 60 (70-230 mesh). Ekstrak lutein kasar 1000 bpj dihomogenkan dengan Cellite 545 sampai mengental kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan diekspansi dengan heksan-kloroform-aseton (6:2:2). Larutan fraksi ditampung dalam vial masing-masing 4 mL. Tiap fraksi diperiksa dengan KLT dibandingkan dengan baku pembanding lutein⁽¹⁹⁾.

Analisis Spektrofotometri Cahaya Tampak. Spektrum serapan lutein dalam pelarut heksan diamati pada spektrofotometer cahaya tampak pada panjang gelombang (λ) antara 360-550 nm.

Analisis Spektrofotometri FT-IR. Sebanyak 1 mg kristal lutein digerus dengan 100 mg kalium bromida kering sampai homogen halus, kemudian dimasukkan ke dalam cetakan sampai permukaan rata dan dikempa. Spektrum serapan pada cahaya IR dibuat dan dilakukan identifikasi gugus fungsi senyawa.

Analisis KCKT. Analisis dilakukan menggunakan kolom C₁₈ (250×4,6 mm, i.d. 5 µm) (Shim-pack UP-005), fase gerak metanol-diklorometan-asetonitril (67,5 : 22,5 : 10 v/v), laju alir : 1,0 mL/menit, detektor

visible pada λ 447 nm (λ_{maks} lutein= 447 nm). Injeksi 20 µL sampel masing-masing dari fraksi hasil kolom, kristal lutein kasar dan baku pembanding lutein larutan dalam heksan. Sampel disaring dengan filter membran 0,2 µm. Hasil kromatogram sampel dibandingkan dengan baku pembanding lutein.

Analisis Kromatografi Cair-Spektrometri Massa (KC-SM). Analisis KC-SM dilakukan menggunakan kolom C₁₈ (50×2,1 mm, i.d. 5 µm) (X Terra MS), fase gerak campuran asam format 0,1% - asetonitril (20:80) isokratis, laju alir 0,3 mL/menit, detektor *Photodiode Array Detector* (Waters 2695), metode spektrometri ESI-MS. Injeksi 5 µL sampel masing-masing dari fraksi hasil kolom dan lutein hasil kristalisasi dalam asetonitril. Hasil analisis dengan kromatografi cair spektrometri massa berupa spektrogram massa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman. Hasil determinasi sampel menunjukkan bahwa bunga tersebut adalah bunga kenikir (*Tagetes erecta* L.) suku Asteraceae.

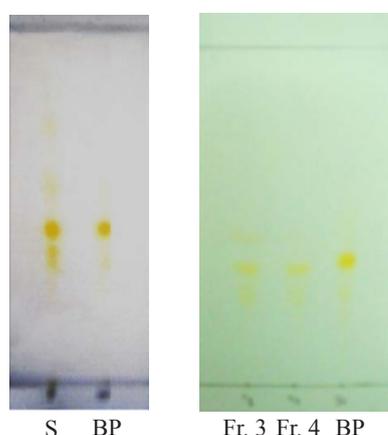
Kadar Air. Penentuan kadar air dilakukan menggunakan metode Karl Fisher. Serbuk bunga kenikir kering memiliki kadar air sebesar 8,234%. Ketentuan dalam *Materia Medica Indonesia* menyatakan bahwa sampel bahan alam yang digunakan telah memenuhi syarat standar sebagai bahan obat alam, apabila kadar air simplisia tidak melebihi dari 10%⁽¹⁸⁾.

Identifikasi Golongan Triterpenoid. Hasil uji identifikasi menunjukkan bahwa serbuk kering bunga kenikir memiliki kandungan metabolit sekunder golongan dari senyawa triterpenoid sehingga dimungkinkan terdapat senyawa lutein. Hal ini ditunjukkan dengan penambahan larutan Liebermann-Burchard terbentuk warna merah ungu menunjukkan sampel mengandung triterpenoid positif, dan larutan tidak terbentuk warna hijau menunjukkan Steroid negatif.

Ekstraksi Lutein dari Bunga Kenikir. Proses maserasi bunga kenikir menghasilkan rendemen ekstrak *n*-heksan sebanyak 5,26%. Ekstrak *n*-heksan yang dihasilkan setelah dilakukan saponifikasi dan pencucian berkali-kali dengan isopropanol-air (1:14) diperoleh ekstrak lutein kasar sebanyak 32,23% dihitung dari berat ekstrak *n*-heksan. Secara fisik, ekstrak lutein kasar yang dihasilkan sangat lengket dan kental. Hal ini mungkin terjadi saat pembebasan lutein pada tahap hidrolisis atau pada penambahan alkali dan dilepaskannya berbagai produk samping, dan mendapatkan kristal lutein yang sangat sedikit. Pada saat memisahkan endapan dari filtrat nampak

larutannya berbusa, sehingga sangat sulit untuk memisahkan seluruh endapan kristal lutein dari ekstrak kentalnya.

Analisis Kualitatif dengan KLT. Ekstrak lutein kasar yang diperoleh selanjutnya dianalisis KLT menggunakan fase gerak yang telah diteliti sebelumnya, yaitu campuran pelarut *n*-heksan-kloroform-aseton (6:2:2), fase diam silika gel GF₂₅₄, jarak rambat 80 mm⁽¹⁶⁾. Hasil analisis dapat diketahui pola bercak dan teridentifikasi senyawa lutein. Pemisahan menghasilkan bercak yang baik yaitu bulat tidak berekor mempunyai nilai Rf 0,40 dan sejajar dengan bercak baku pembanding lutein (Gambar 1). Kromatogram pada cahaya matahari maupun sinar UV 366 nm menunjukkan senyawa lutein yang tidak berfluorosensi dan masih mengandung senyawa lain yang perlu dipisahkan lebih lanjut.

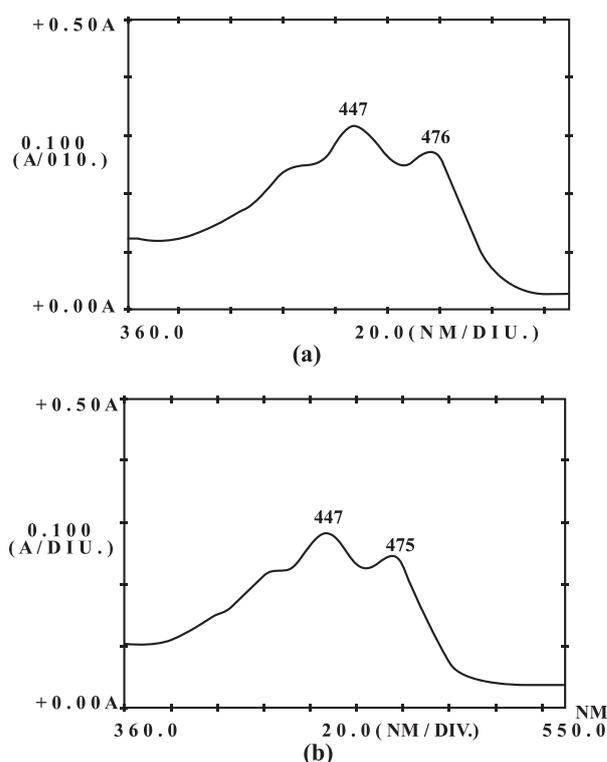


Gambar 1. Kromatogram KLT pada cahaya tampak.
S: Ekstrak lutein kasar; BP: baku pembanding lutein;
Fr.3 = fraksi 3, Fr. 4= fraksi 4.

Fraksinasi Ekstrak dengan Kromatografi Kolom. Ekstrak lutein selanjutnya difraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan kolom silika gel 60 (70-230 mesh) berdiameter 1 cm dan fase gerak campuran pelarut *n*-heksan-kloroform-aseton (6:2:2). Fraksinasi ekstrak lutein kasar masing-masing ditampung sebanyak 4 mL. Kemudian dilakukan analisis KLT untuk melihat pola kromatogram yang dihasilkan dari tiap fraksi dan dibandingkan terhadap baku pembanding lutein. Hasil yang diperoleh pada fraksi 3 dan 4 memiliki bercak yang hampir sama dengan baku pembanding lutein dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil kromatogram menunjukkan bahwa fraksi 3 dan fraksi 4 mempunyai bercak yang sama masing-masing dengan nilai Rf 0,395, namun ada bercak lain yang samar muncul diduga terjadi peruraian selama penyimpanan sampel. Nilai Rf ini mendekati nilai Rf baku pembanding lutein yaitu 0,40.

Identifikasi dengan Spektrofotometri Cahaya Tampak. Fraksi 3 dan 4 yang mengandung

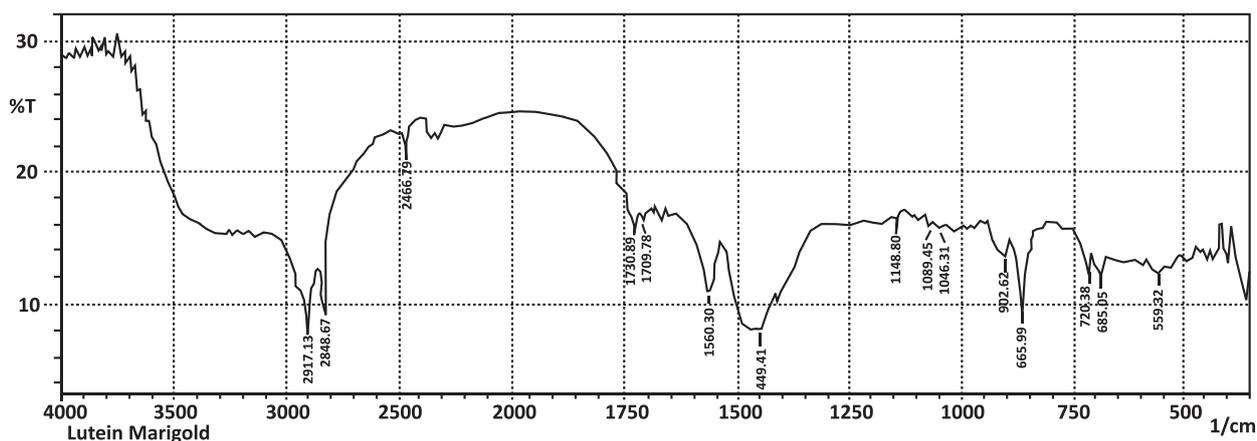
lutein, selanjutnya dilakukan identifikasi dengan menggunakan spektrofotometri cahaya tampak pada rentang panjang gelombang (λ) 360-550 nm. Spektrum serapan cahaya tampak yang dihasilkan dari fraksi 3 dan 4 diperlihatkan pada Gambar 2 dan hasil analisisnya pada Tabel 1. Fraksi 3 dan 4 menunjukkan pola spektrum serapan pada cahaya tampak yang sama dengan serapan tertinggi (0,279 dan 0,231) pada λ 447 nm. Spektrum yang dihasilkan menunjukkan 3 puncak yang disebabkan terjadi eksitasi elektron molekuler. Gambar 2 menunjukkan pita-pita serapan elektron. Pada molekul ini ada 3 sistem elektronik untuk mengeksitasi perlu energi yang diserap⁽²⁰⁾. Panjang gelombang serapan maksimum menunjukkan ciri adanya gugus kromofor dan gugus auksokrom, seperti -OH. Hasil sama dengan yang dilaporkan Davies bahwa lutein dalam *n*-heksan mempunyai panjang gelombang serapan maksimum (λ_{maks}) pada 447 nm, 476 nm dan terdapat puncak tambahan sebelum



Gambar 2. Spektrum serapan lutein (a) fraksi 3 dan (b) fraksi 4 menggunakan spektrofotometer UV-VIS.

Tabel 1. Hasil pengukuran serapan sampel lutein fraksi 3 dan fraksi 4 menggunakan spektrofotometer.

Panjang gelombang (nm)	Serapan	
	Fraksi-3	Fraksi-4
408	0,214	0,178
447	0,279	0,231
476	0,237	0,196



Gambar 3. Spektrum serapan lutein pada FT-IR.

Tabel 2. Hasil analisis spektrum serapan IFT-IR senyawa lutein.

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Rentang bilangan gelombang (cm ⁻¹) ⁽²¹⁾	Tipe ikatan	Tipe senyawa ⁽²¹⁾
685,65	675–995	C – H tekuk	C = C Alkena
720,36			
865,98			
902,62			
1449,41	1340–1470	C – H ulur	Alkana
1560,3	1500–1600	C = C	Alkena
2848,67	2850–2970	C – H	Alkana
2917,13			
3100-3500	3200–3600	O – H	Hidroksida atau hydrogen bonding

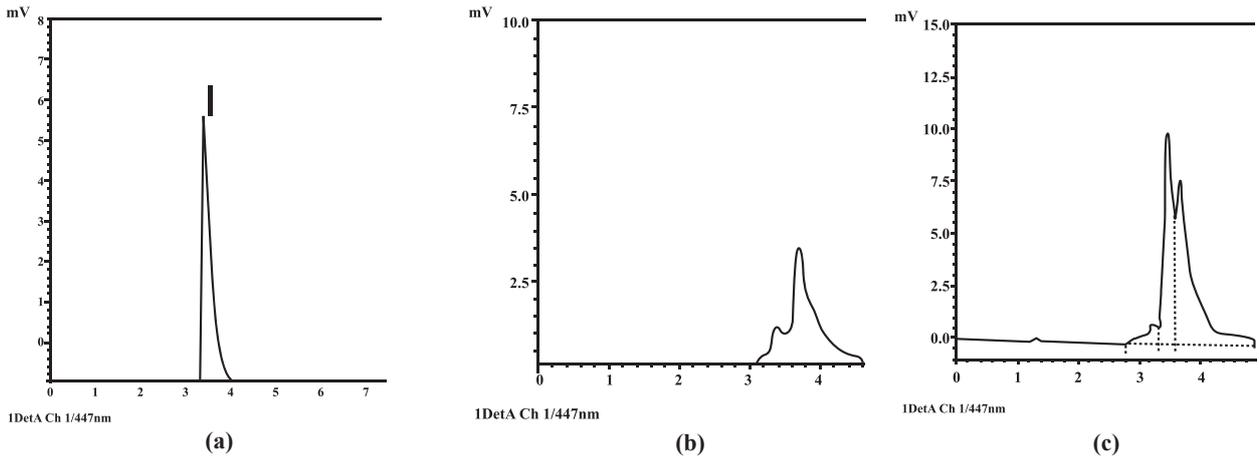
puncak 447 nm⁽¹⁵⁾. Hasil analisis serapan maksimum dengan spektrofotometer mengindikasikan bahwa dalam bunga kenikir mengandung senyawa lutein.

Analisis gugus fungsi dengan Spektrofotometer FT-IR. Analisis FT-IR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi senyawa yang terdapat dalam kristal lutein. Spektrum serapan inframerah dari hasil kristalisasi dapat dilihat pada Gambar 3 dan hasil analisisnya dapat dilihat pada Tabel 2. Bilangan gelombang yang melebar dari 3100-3500 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus OH yang terlihat jelas pada spektra. Ciri-ciri gugus fungsi yang dihasilkan mempunyai kemiripan dengan struktur molekul dari senyawa lutein yaitu gugus alkana, gugus alkena dan gugus hidroksida.

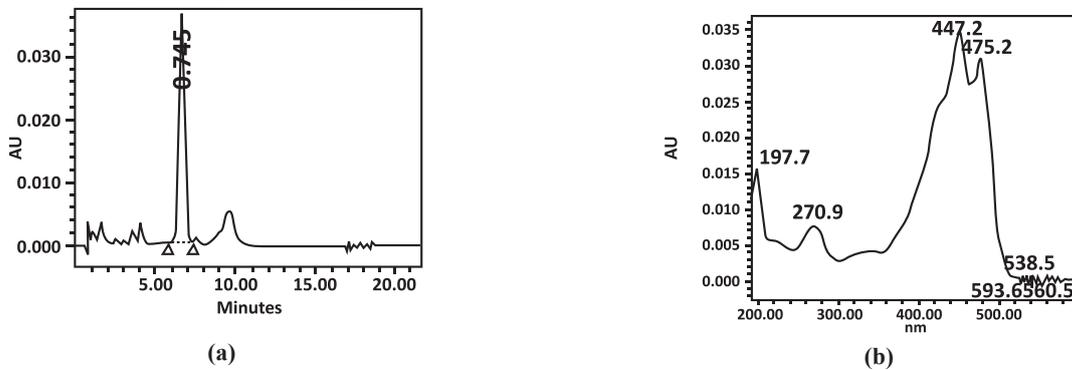
Analisis dengan KCKT. Analisis KCKT dilakukan menggunakan campuran pelarut yang telah dimodifikasi dari metode Li Hua bin *et al.*, 2002⁽¹⁷⁾ antara lain, metanol-diklorometan-asetonitril (67,5:22,5:10) sebagai fase gerak. Kromatogram KCKT baku pembanding lutein, fraksi dan hasil kristalisasi dibandingkan. Hasil pemeriksaan masing-masing sampel dengan KCKT menunjukkan bahwa setiap

sampel masih mengandung senyawa lain sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 4. Kromatogram hasil kristalisasi menunjukkan kemurnian lebih tinggi dibandingkan pada hasil dari fraksinasi. Waktu retensi hasil kristalisasi maupun sampel fraksi mirip waktu retensi dari baku pembanding lutein yaitu dengan waktu retensi 3,50 menit. Hal ini membuktikan bahwa terdapat senyawa lutein di dalam sampel hasil fraksi maupun hasil kristalisasi tetapi belum murni.

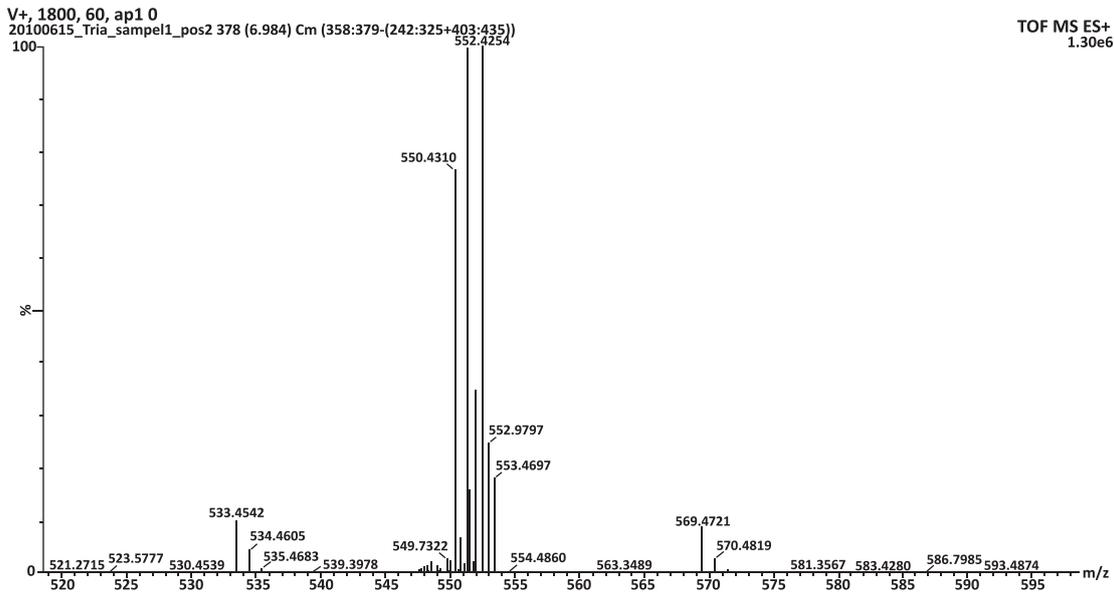
Analisis dengan Kromatografi Cair – Spektrometri Massa (KC-SM). Senyawa hasil kristalisasi dipisahkan terlebih dahulu menggunakan KCKT untuk melihat kandungan senyawa yang lebih dominan pada panjang gelombang serapan maksimum di 447 nm. Selanjutnya dilakukan analisis berat molekul terhadap senyawa yang lebih dominan tersebut. Hasil kromatogram dapat dilihat pada Gambar 5. Hasil dari pemisahan yang terlihat pada Gambar 5(a) menunjukkan senyawa yang dominan muncul pada waktu retensi 6,745 menit. Selanjutnya senyawa pada waktu 6,745 menit diamati spektrum serapan UV-Vis dengan hasil tertera pada Gambar 5(b) yang menunjukkan panjang gelombang



Gambar 4. Kromatogram KCKT dengan waktu retensi (a) baku pembanding lutein 3,534 menit; (b) lutein fraksi 3,482 menit dan (c) lutein kristalisasi 3,467 menit.



Gambar 5. Kromatogram dari KC-SM lutein hasil kristalisasi dengan (a) waktu retensi 6,745 menit; (b) spektrum serapan UV-VIS dan λ_{max} 447,2 nm.

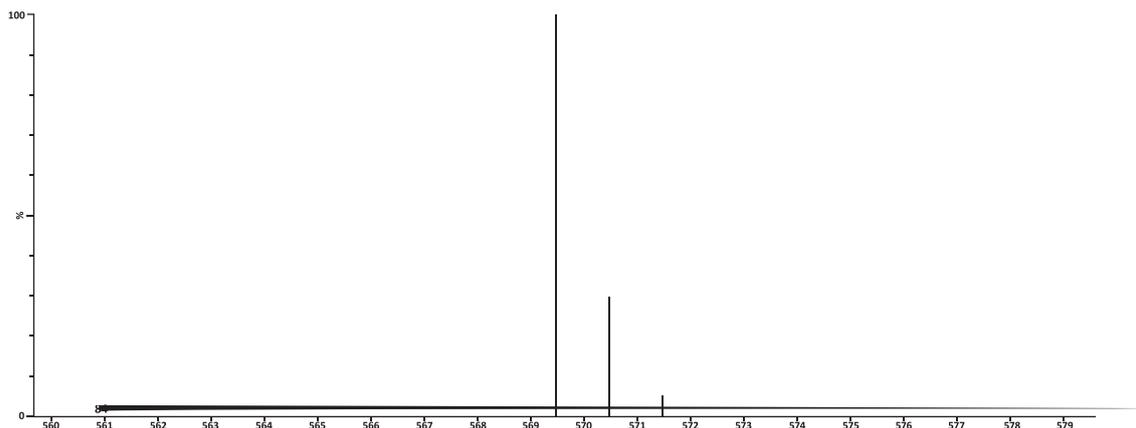


Gambar 6. Spektrum masa (menggunakan KC-SM) dari senyawa Rt 6,745 lutein hasil kristalisasi.

maksimum sebesar 447,2 nm. Hasil pengamatan tersebut sesuai dengan panjang gelombang serapan maksimum senyawa lutein⁽¹⁵⁾. Senyawa yang muncul pada 6,745 menit tersebut kemudian dianalisis dengan spektrometer massa. Hasil dapat dilihat pada Gambar

6 dan 7.

Alat LC/MS telah dikalibrasi dan menunjukkan massa unsur C adalah 12,0000, massa H adalah 1,0078, dan massa O adalah 15,9949. Dengan demikian, senyawa lutein yang mempunyai rumus molekul



Gambar 7. Spektrum masa (menggunakan KC-SM) dari senyawa Rt 6,745 lutein hasil kristalisasi (dengan pembesaran pada m/z 560 sampai m/z 580).

$C_{40}H_{56}O_2$ diharapkan mempunyai berat massa sebesar 568,4266. Gambar 7 menunjukkan terdapat fragmen dengan $m/z = 552$ yang sangat stabil, mungkin berasal dari hilangnya oksigen dari molekul. Pada Gambar 7 menunjukkan bahwa pasangan ion molekul, seperti $[M+H]^+ = 569$; $[M+2H]^+ = 570$. Hasil ini mengkonfirmasi adanya lutein dalam kristal.

SIMPULAN

Senyawa lutein berhasil diisolasi dari bunga kenikir lokal (*Tagetes erecta* L.) dengan rendemen sebesar 5,26% dan ekstrak lutein sebanyak 32,23%. Uji pendahuluan menunjukkan bahwa bunga kenikir mengandung senyawa triterpenoid. Identifikasi ekstrak *n*-heksan dengan KLT menunjukkan bercak yang mirip baku pembanding lutein dengan Rf (0,39-0,40). Analisis dengan spektrofotometer cahaya tampak menunjukkan adanya gugus kromofor terkonjugasi dengan λ_{max} pada 447nm. Identifikasi dengan spektrofotometri FTIR menunjukkan bahwa isolat mengandung gugus C-H tekuk, C-H ulur, C=C, dan gugus -OH, sedangkan hasil analisis KCKT menunjukkan waktu retensi ($3,50 \pm 0,02$ menit) dan puncak serapan cahaya UV-VIS (447 nm dan 476 nm yang mirip dengan baku pembanding lutein. Analisis ekstrak *n*-heksan dengan KC-SM menunjukkan berat molekul lutein 568 dengan pasangan ion $[M+H]^+ = 569$ dan $[M+2H]^+ = 570$ dan fragmen molekul yang stabil m/z 552.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lei L, Jian Q, Shi-an Y, Guangwen T. Effects of mobile phase ratios on the separation of plant carotenoids by HPLC with a C^{30} column. *Chromatographia*. 2007. 65(1/2):91-4.
2. Klau H. Industrial and commercial uses of carotenoid. In: Britton G, Goodwin TW, editors. *Carotenoid chemistry and biochemistry*. Oxford: Pergamon Press; 1982. 309-28.
3. Kim HW, Chew BP, Wong TS, Park JS, Weng BB, Byrne KM, Katek MG, Reinhart GA. Dietary lutein stimulates immune response in the canine. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000. 74:315-27.
4. Krinsky NI, Landrum JT, Bone RA. Biological mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annual Rev Nutrition*. 2003. 23:171-201.
5. Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Vacuero M. Lutein but not α -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: 2-y double-blind. *Nutrition*. 2003. 19:21-4.
6. Landrum JT, Bone RA. Lutein, zeaxanthin and the macular pigment. *Arch Biochem Biophys*. 2001. 385:28-40.
7. Breithaupt DE, Schlatterer J. Lutein and zeaxanthin in new dietary supplements analysis and quantification. *Eur Food Res Technol*. 2005. 220:648-52.
8. Allen OJ, Krinsky NI. Introduction: The colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulator. *FASEB J*. 1995. 9(15):1547
9. Bhosale P, Li B, Sharifzadeh M, Gellermann W, Frederick JM, Tsuchida K, *et al*. Purification partial characterization of a lutein-binding protein from human retina. *Biochemistry [serial online]*. 2009. Diambil dari <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi9004478>. Diakses 6 april 2009.
10. Khachik F, Beecher GR, Goli MB, Lusby WR. Separation, identification and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure Appl Chem*. 1991. 63(1):71-80.
11. Moros EE, Darnoko D, Cheryan M, Perkins EG, Jerrell J. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. *J Agric Food Chem*. 2002. 50(21):5787-90.
12. Lee HS. Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (cara-cara). *J Agric Food Chem*. 2001. 49:2563-8.

13. Hadden WL, Watkins RH, Levy LW, Regalado E, Rivadeneira DM, Breemen Van, et al. Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *J Agric Food Chem.* 1999. 47(10):4189-94.
14. Madhavi DL, Kagan DI. Process for the isolation of mixed carotenoids from plants. Diambil dari: http://www.patentlens.net/patentlens/simple.cgi?patnum=US_6380442#show. Diakses 19 juni, 2009
15. Harbone JB. Metode fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. Edisi 2. Diterjemahkan oleh Padmawinata K, Soediro I. Bandung: Penerbit ITB; 1996. 158-9, 162-8.
16. Kusmiati, Agustini NWS, Tamat SR, Irawati M. Ekstraksi dan purifikasi senyawa lutein dari mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* galur lokal Ink. *Jurnal Kimia Indonesia.* 2010. 5(1): 30-4.
17. Li HB, Jiang Y, Chen F. Isolation and purification of lutein from microalga *Chlorella vulgaris* by extraction after saponification. *J Agric Food Chem.* 2002. 50(5):1070-2.
18. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Materia Medika Indonesia.* Jilid VI. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawas Obat dan Makanan; 1995. XIV.
19. Fessenden RJ, Fessenden JS. *Kimia Organik.* Edisi 3. Jilid 2. Diterjemahkan oleh Pudjaatmaka AH. Jakarta: Penerbit Erlangga; 1999. 407-19.
20. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric identification of organic compounds.* 7th edition. New York: John Wiley & Sons, Inc; 2005. 1-3, 78-104.
21. Skoog *et al.* *Principles of instrumental analysis.* 6th ed. Thomson Brooks /Cole. 2007. 349-51.