

OPTIMASI METODE EKSTRAKSI FUKOIDAN KASAR DARI RUMPUT LAUT COKELAT *Sargassum binderi* SONDER

Optimization of Crude Fucoïdan Extraction Methods from Brown Seaweed Sargassum binderi Sonder

Ellya Sinurat* dan Rinta Kusumawati

Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan,
Badan Riset dan Sumber Daya Manusia Kelautan dan Perikanan
Jl. KS.Tubun Petamburan VI Jakarta Pusat 10260

* Korespondensi Penulis: ellya_sinurat@yahoo.com

Diterima: 4 Juli 2017; Direvisi : 14 Agustus 2017; Disetujui: 23 November 2017

ABSTRAK

Fukoidan merupakan polisakarida sulfat yang berasal dari rumput laut cokelat. Salah satu faktor yang mempengaruhi mutu fukoidan adalah metode ekstraksi. Pada penelitian ini dilakukan optimasi ekstraksi fukoidan kasar dari rumput laut *Sargassum binderi* Sonder untuk mendapatkan rendemen dan mutu paling tinggi. Optimasi tersebut dilakukan dengan empat metode ekstraksi yaitu: HCl 0,1 N pH 4 pada suhu kamar selama 6 jam, HCl 0,1 N pH 4 pada suhu 85 °C selama 4 jam, akuades pada suhu 85 °C selama 4 jam dan larutan CaCl₂ 2% pada suhu 85 °C selama 4 jam. Untuk masing-masing metode dilakukan 3 kali ulangan dengan bahan baku yang sama dan pada waktu berbeda. Parameter mutu fukoidan yang dianalisis meliputi: rendemen, total gula, asam uronat, kadar sulfat dan gugus fungsi polisakarida sulfat dengan FT-IR. Rendemen tertinggi diperoleh dengan metode ekstraksi HCl 0,1 N pH 4 pada suhu 85 °C selama 4 jam sebesar 6,0% dan terendah dengan metode ekstraksi menggunakan larutan CaCl₂ 2% sebesar 2,57%. Kandungan sulfat tertinggi diperoleh dengan metode larutan CaCl₂ 2% selama 4 jam sebesar 8,69%. Metode ekstraksi kasar fukoidan dari *S. binderi* Sonder yang paling optimum menggunakan pelarut air pada suhu 85 °C selama 4 jam dengan rendemen dan kandungan sulfat yaitu 3,36% dan 8,10%.

KATA KUNCI : fukoidan, rumput laut cokelat, polisakarida sulfat, *Sargassum binderi* Sonder

ABSTRACT

Fucoïdan is a sulphate polysaccharide isolated from brown seaweed. One of the factors that affect the quality of fucoïdan is the method of extraction. To obtain the highest yield and highest quality, crude fucoïdan was extracted from Sargassum binderi Sonder using four methods; at room temperature in 0.1 N HCl pH 4 solution for 6 hours, at 85 °C in 0.1 N HCl pH 4 solution for 4 hours, at 85 °C in water for 4 hours and at 85 °C containing 2% CaCl₂ in water for 4 hours. Three replications were performed for each method with the same raw material and different times. The fucoïdan quality parameters analyzed were fucoïdan yield, total sugar, uronic acid, sulphate content and functional groups of the sulphate polysaccharide with FT-IR. The highest yield was obtained by extraction method of 0.1 N HCl at 85 °C, pH 4 for 4 hours (6.0%), whereas extraction by 2% CaCl₂ solution only produced 2.57% fucoïdan. The optimum method of extraction crude fucoïdan from S. binderi Sonder with highest fucoïdan yield (3.36%) and sulphate content (8.10%) of and was achieved by water extraction at 85 °C for 4 hours.

KEYWORDS: fucoïdan, brown seaweed, sulphate polysaccharide, *Sargassum binderi* Sonder

PENDAHULUAN

Fukoidan merupakan polisakarida sulfat yang paling banyak diperoleh dari rumput laut cokelat. Kandungan fukoidan dipengaruhi beberapa hal antara lain: lingkungan tempat tumbuh, spesies, musim, metode ekstraksi dan umur panen. Jenis rumput laut cokelat

sudah banyak diteliti di seluruh dunia. Di Indonesia terdapat kurang lebih 555 jenis dari 8642 spesies rumput laut yang terdapat di dunia (Merdekawati & Susanto, 2009). Sebanyak 400 jenis di antaranya terdiri dari rumput laut coklat *Sargassum*. Di Indonesia jenis rumput laut cokelat yang paling banyak tumbuh adalah jenis *Sargassum* sp. (Sinurat, Peranginangin

& Saepudin, 2015; Talha, 2015). Di Indonesia terdapat 12 jenis *Sargassum* yang sudah diteliti yaitu *Sargassum duplicatum*, *S. hystrix*, *S. echinocarpum*, *S. binderi* Sonder, *S. gracilinum*, *S. crassifolium*, *S. obtusifolium*, *S. Microphyllum*, *S. polycystum*, *S. vulgare*, *S. polyceratium*, *S. aquofilum* (Rahmat, 1999). Rumput laut cokelat dikenal sebagai sumber bahan baku aneka polisakarida yang memiliki banyak bioaktivitas. Ada 3 tipe polisakarida dominan yang terdapat dalam rumput laut cokelat yaitu asam alginat, laminaran dan fukoidan. Kandungan dan struktur polisakarida pada rumput laut berubah selama siklus hidupnya. Asam alginat tersusun dari asam manuronat dan glukuronat. Komponen penyusun laminaran adalah 1,3 β -glukan atau 1,6 β -glukan dengan berat molekul rendah (sekitar 5 kDa). Fukoidan terdiri dari komponen penyusun utamanya yaitu fukosa yang mengandung sulfat dan sedikit monosakarida lain seperti: galaktosa, glukosa atau monosakarida lain (Imbs et al., 2009; Li, Lu, Wei, & Zhao, 2008; Vishchuk, Ermakova & Zvyagintseva, 2011). Fukoidan terdapat pada dinding sel dan bagian intraseluler rumput laut cokelat. Hubungan antara struktur dan aktivitas polisakarida sulit ditetapkan karena strukturnya heterogen, *irregular*, bercabang dengan variasi sulfonat yang besar (Sokolova, Ermakova, Awada, Zvyagintseva, & Kanaan, 2011). Setiap jenis rumput laut cokelat menghasilkan kandungan monosakarida yang berbeda. Saat ini jenis rumput laut penghasil fukoidan yang sudah dikomersilkan ada 3 jenis yaitu *Fucus vesiculosus*, *Macrocystis pyrifera* dan *Undaria pinnatifida*. Komposisi kimia fukoidan dari *Fucus vesiculosus* relatif sederhana (Li et al., 2008; O'Connell, Murray, Piggot, Hennequart, & Tuohy, 2008). Sejauh ini, bioaktivitas fukoidan sudah banyak diteliti, diantaranya sebagai anti tukak lambung, anti koagulan, imunostimulan, antioksidan dan lain-lain (Sinurat, Saepudin, Peranginangin, & Hudiyono, 2016). Fukoidan dari rumput laut cokelat Indonesia yang sudah diuji bioaktivitasnya antara lain jenis *Sargassum* sp. dan *Turbinaria* sp. sebagai anti kanker payudara MCF-7 (Isnansetyo, Lutfia, Nursid, Trijoko & Susidarti, 2017), *S. crassifolium* sebagai anti koagulan (Sinurat, Peranginangin & Saepudin, 2011); dan *S. binderi* Sonder sebagai immunostimulan (Sinurat et al., 2016).

Beberapa faktor yang menyebabkan perbedaan struktur fukoidan adalah lingkungan hidupnya (suhu, arus laut, kedalaman tumbuh, salinitas), masa panen, spesies, tahap pertumbuhan, musim, proses ekstraksi, jenis pelarut ekstraksi, suhu dan waktu ekstraksi (Franck, O'Connell, Spence, Oilean & Teranta, 2004; Sinurat et al., 2015; Skriptsova, Shevchenko, Zvyagintseva & Imbs, 2009).

Metode ekstraksi sangat mempengaruhi rendemen dan mutu fukoidan. Kondisi proses ekstraksi fukoidan

yang sangat mempengaruhi rendemen, antara lain pelarut ekstraksi, suhu, dan lama ekstraksi (Rosa Solange, Lorenzo, & Jose, 2013). Umumnya ekstraksi fukoidan dilakukan melalui metode yang berbeda yaitu menggunakan pelarut asam, air dan garam kalsium. Ekstraksi menggunakan asam encer dimaksudkan untuk memecahkan ikatan antara polisakarida dengan protein di dalam sel. Pada ekstraksi menggunakan air, biasanya divariasikan dengan suhu sehingga dapat memecah interaksi non kovalen antara fukoidan dengan dinding sel. Pada kedua metode tersebut dilakukan penambahan garam kalsium untuk memisahkan alginat dari fukoidan. Beberapa variabel yang mempengaruhi ekstraksi fukoidan antara lain: pelarut (konsentrasi asam dan netral), pH, suhu, lama ekstraksi dan konsentrasi CaCl_2 (Mak, Hamid, Liu, Lu, & White, 2013). Beberapa hasil penelitian ekstraksi fukoidan di antaranya ekstraksi menggunakan pelarut asam seperti asam klorida. Ekstraksi menggunakan cara ini mendapatkan rendemen fukoidan yang tinggi, namun hasil ekstraksinya mengandung banyak asam alginat (Hagiwara, 2010). Pada ekstraksi fukoidan dari *S. crassifolium* menggunakan larutan HCl 0,1N pada suhu ruang selama 6 jam, diperoleh rendemen *crude* fukoidan sebanyak 1,46% dengan komposisi penyusun fukoidan fukosa dan galaktosa 1:1,5 (Sinurat et al., 2011). Ekstraksi fukoidan dari *Undaria pinnatifida* menggunakan larutan CaCl_2 2% pada suhu 85 °C selama 5 jam memperoleh fukoidan dengan komposisi penyusun yang terdiri dari gula netral 52,3%, asam uronat 26,2% dan sulfat ester 7,4% (Kim et al., 2007). Ekstraksi lainnya dengan menggunakan pelarut air destilasi pada suhu ruang, memperoleh komposisi fukoidan yang terdiri dari fukosa 56,6%; sulfat 19% dan asam uronat 3,5% (Duarte, Cardoso, & Nosedo, 2001). Pada penelitian lain yang membandingkan pelarut akuabides dengan larutan CaCl_2 1% pada rumput laut coklat *Laminaria japonica* diperoleh rendemen yang berbeda di mana ekstraksi menggunakan akuabides memperoleh rendemen yang lebih tinggi (22,67%) dibandingkan dengan menggunakan pelarut CaCl_2 1% (4,76%) (Wang & Chen, 2016).

Pada penelitian ini dilakukan optimasi metode ekstraksi menggunakan pelarut air, asam dan larutan CaCl_2 2%. Sebelumnya sudah banyak dilakukan ekstraksi menggunakan variasi asam, CaCl_2 dan waktu terhadap jenis rumput laut cokelat yang berbeda. Namun belum ada penelitian ekstraksi paralel fukoidan dalam waktu yang bersamaan untuk mendapatkan kandungan fukoidan paling optimum khususnya pada rumput laut cokelat *S. binderi* Sonder.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan baku yang digunakan adalah rumput laut coklat *Sargassum binderi* Sonder yang diperoleh dari Binuangeun, Banten. Bahan kimia yang digunakan antara lain: CaCl₂ (Merck), HCl, H₂SO₄ p.a., standar fukoidan yang berasal dari spesies *Fucus vesiculosus* (Sigma Aldrich).

Metode

Metode ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan ada 4 yaitu:

- A. Ekstraksi menggunakan pelarut HCl 0,1N pH 4 pada suhu ruang selama 6 jam (Sinurat et al., 2011) dengan beberapa modifikasi.

Rumput laut basah dibersihkan dengan air bersih dari segala kotoran, kemudian direndam dengan etanol selama 24 jam. Rumput laut disaring lalu dikeringkan di suhu kamar. Rumput laut kering digiling menjadi tepung sampai ukuran > 60 mesh, direndam dalam HCl 0,1 N, ditambahkan akuades sampai pH_≈4 (1:20) (b/v), lalu diaduk selama 6 jam pada suhu ruang. Campuran disaring menggunakan planktonet 500 mesh dan filtrat ditampung. Filtrat dinetralisasi dengan NaOH 0,5 M lalu ditambah larutan CaCl₂ 4M (1:10) sambil diaduk selama 30 menit pada suhu ruang lalu disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit. Filtrat diencerkan dengan penambahan air sampai konsentrasi CaCl₂ 0,5 M lalu ditambah *cetylpyridinium chloride* (CPC) 5% sampai terbentuk endapan. Campuran disentrifugasi 8.000 rpm selama 15 menit. Endapan ditampung lalu dilarutkan dengan akuades. Larutan yang diperoleh ditambah CaCl₂ sampai tercapai larutan CaCl₂ 3 M lalu disentrifugasi 8.000 rpm selama 15 menit. Filtrat ditampung, selanjutnya ditambah etanol (1:2). Hasil endapan yang diperoleh dilarutkan dengan air dan disentrifugasi 8.000 rpm selama 15 menit. Filtrat yang diperoleh didialisis dengan 0,5 M NaCl dan akuabides kemudian dikeringbekukan dengan *freeze dryer* sehingga diperoleh ekstrak fukoidan.

- B. Ekstraksi menggunakan pelarut HCl 0,1 N pada suhu 85 °C selama 4 jam dilakukan dengan cara yang sama seperti pada *point* A di atas.

- C. Ekstraksi menggunakan aquades pada suhu 85 °C.

Tepung rumput laut direndam dalam akuades (1:20) (b/v) lalu diekstraksi sambil diaduk selama 4 jam pada suhu 85 °C. Campuran disaring menggunakan planktonet 500 mesh, filtrat ditampung.

Ke dalam filtrat ditambahkan larutan CaCl₂ 2% (1:20) sambil diaduk selama 30 menit pada suhu ruang lalu disentrifugasi 8.000 rpm selama 15 menit pada suhu 5 °C. Filtrat ditampung dan endapan dibuang, ke dalam filtrat ditambahkan etanol (1:2). Hasil endapan yang diperoleh dilarutkan dengan air sampai larut sempurna dan disentrifugasi 8.000 rpm selama 15 menit (sampai benar-benar larut). Filtrat yang diperoleh didialisis dengan 0,5 M NaCl dan akuabides kemudian dikeringbekukan dengan *freeze dryer* sehingga diperoleh ekstrak fukoidan.

- D. Ekstraksi menggunakan CaCl₂ 2% pada suhu 85 °C.

Tepung rumput laut direndam dalam CaCl₂ 2% (1:20) (b/v) lalu diekstraksi sambil diaduk selama 4 jam pada suhu 85 °C. Penyaringan dilakukan dengan menggunakan planktonet 500 mesh, kemudian filtrat disentrifugasi 8.000 rpm selama 15 menit. Filtrat dipisahkan dari endapannya dan ke dalam filtrat ditambah etanol (1:2). Hasil endapan yang diperoleh dilarutkan dalam air dan disentrifugasi 8.000 rpm selama 15 menit (sampai benar-benar larut). Filtrat yang diperoleh didialisis dengan 0,5 M NaCl dan akuabides sehingga diperoleh ekstrak fukoidan, lalu dikering bekukan.

Pengukuran karakteristik mutu fukoidan kasar

Rendemen fukoidan kasar

Rendemen diperoleh dari perbandingan bobot ekstrak fukoidan dengan bobot bahan rumput laut kering. Besarnya rendemen dapat diperoleh menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak fukoidan}}{\text{Bobot bahan rumput laut kering}} \times 100 \% \dots\dots\dots(1)$$

Penentuan total gula (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956)

Sampel fukoidan kasar (10 mg) dimasukkan ke tabung reaksi, ditambahkan 1 mL akuades dan diaduk. Kandungan total gula diukur dengan menggunakan uji fenol-sulfat; dengan penambahan 2,5 mL H₂SO₄ pekat dibiarkan 20 menit lalu 0,5 mL phenol 5 %, ditambahkan ke sampel dan dibiarkan sampai dingin (direndam dalam air es) selama 30 menit. Sampel diaduk dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm menggunakan spektrofotometer UV-VIS PerkinElmer Lambda 25. Blanko diperlakukan sama dengan sampel. Sebagai standar digunakan L-fukosa.

Penentuan sulfat dengan menggunakan metode $BaCl_2$ -gelatin (Dodgson & Price, 1962)

- a. *Preparasi $BaCl_2$ -gelatin.* Gelatin 2 g dilarutkan dalam 400 mL air panas (60 -70 °C) dan dibiarkan semalam pada suhu 4 °C. Sebanyak 2 g $BaCl_2$ kemudian dilarutkan dalam cairan semigelatin dan larutan keruh yang dihasilkan dibiarkan selama 2-3 jam sebelum digunakan. Kondisi suspensi $BaSO_4$ ini stabil dengan kelebihan $BaCl_2$ jika dicampur TCA 3% dalam perbandingan 1:4 (v/v). Larutan ini dapat disimpan pada suhu 4 °C selama 1 minggu sebelum digunakan.
- b. *Preparasi sampel.* Sampel fukoidan kasar sebanyak 2 mg dilarutkan dalam 2 mL akuades, kemudian ditambahkan TCA 3% sebanyak 30 mL dan $BaCl_2$ -gelatin 0,5% sebanyak 10 mL lalu diaduk secara mekanik, dibiarkan 15 menit kemudian diukur absorbansinya pada $\lambda = 360$ nm. Sebagai standar digunakan K_2SO_4 .

Analisis gugus fungsi

Sebanyak 1 mg sampel digerus dengan 200 mg kalium bromide sampai homogen. Selanjutnya serbuk sampel dibuat tablet tipis dan transparan pada tekanan 7000 Pa, lalu dimasukkan ke dalam *simple pan* untuk dibuat rekaman spektrum infra merahnya pada bilangan gelombang 4000-500 cm^{-1} . Analisis dilakukan dengan menggunakan FT-IR (Perkin-Elmer 577) metode KBr-pellet dan Specord M-80.

Penentuan asam uronat (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973)

Sampel 0,4 mL yang mengandung ekstrak fukoidan 20 μg ditambah 2,4 mL $Na_2B_2O_7 \cdot 10H_2O$ 0,125M

dalam H_2SO_4 p.a lalu didinginkan menggunakan es batu. Sampel divortex dan diinkubasi dalam *waterbath* 100 °C selama 5 menit. Sampel didinginkan menggunakan es sampai suhu ruang. Sampel ditambah carbazole 20 μL , digoyang-goyang dalam keadaan tertutup, lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS di λ 520 nm. Sebagai standar digunakan asam glukuronat.

HASIL DAN BAHASAN

Rendemen

Rumput laut yang digunakan pada penelitian ini adalah spesies *Sargassum binderi* Sonder (Gambar 1). Dilihat dari karakteristik fisiknya warna ekstrak fukoidan terlihat berbeda, di mana ekstraksi dengan menggunakan asam warnanya cenderung lebih putih, sedangkan fukoidan yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut air dan larutan $CaCl_2$ 2% warnanya lebih kecoklatan (Gambar 2). Warna kecoklatan menunjukkan kadar fukoidan yang lebih tinggi. Rendemen yang diperoleh dari *Sargassum binderi* Sonder (Gambar 3) berkisar 2,57-6,00%. Perbedaan jumlah rendemen ini disebabkan perbedaan pelarut ekstraksi yang dilakukan. Rendemen tertinggi dihasilkan dari metode ekstraksi menggunakan pelarut HCl 0,1N dengan pemanasan 85 °C. Tingginya rendemen fukoidan pada metode tersebut dikarenakan kemungkinan alginat ikut terekstraksi.

Polisakarida yang paling banyak dalam rumput laut coklat adalah alginat (30-40 %), sedangkan senyawa lain dalam jumlah kecil di antaranya adalah fukoidan (2-4%) per berat kering rumput laut, laminaran



Gambar 1. *Sargassum binderi* Sonder
Figure 1. *Sargassum binderi* Sonder

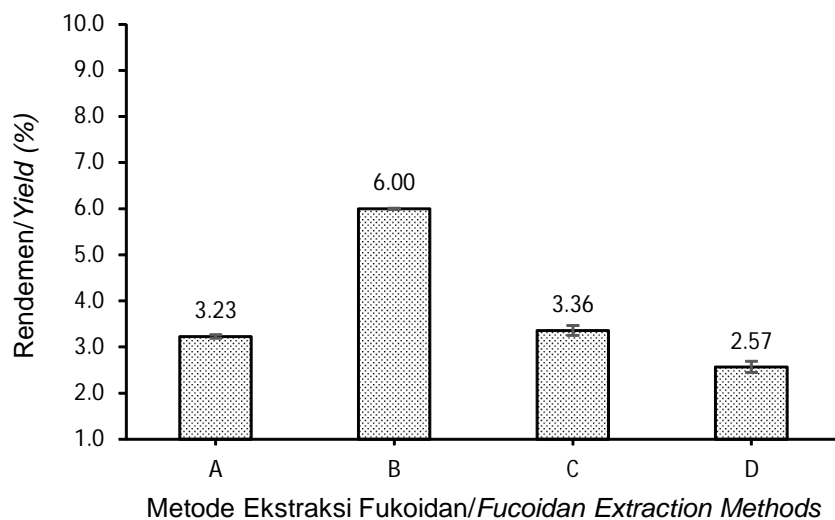


Gambar 2. Produk Kasar Fukoidan
Figure 2. Product of crude fucoidan

sebesar 0-30%, manitol 4-25%, dan senyawa bioaktif lainnya (Ragan & Jensen 1979). Selain itu rumput laut cokelat juga mengandung protein, lemak, serat kasar, vitamin serta mineral. Bentuk alginat pada rumput laut cokelat adalah dalam asam alginat (Yunizal, 2004).

Di dalam jaringan talus/daun, asam alginat mengisi ruangan antar sel sehingga memperkokoh saluran jaringan tersebut. Asam alginat adalah molekul polisakarida linear yang dibentuk oleh β -D manuronat dan α -L- asam glukuronat (Bilan et al., 2009). Selain pengaruh asam, pemanasan juga mempengaruhi jumlah rendemen fukoidan. Hal ini terlihat bila

dibandingkan ekstraksi metode A dan B yang keduanya menggunakan HCl pada konsentrasi yang sama menghasilkan rendemen fukoidan yang berbeda. Pemanasan dapat membantu menghancurkan talus rumput laut cokelat untuk mengeluarkan polisakarida yang berada pada dinding sel (Talha, 2015). Ekstraksi dengan akuades dapat mempertahankan stabilitas dan muatan keseluruhan molekul. Selain itu ekstraksi dengan akuades juga menghasilkan mutu terbaik fukoidan dan membantu mempertahankan mutu bioaktivitasnya (Ragan & Craigie, 1980). Ekstraksi fukoidan dengan asam



Keterangan/Notes :

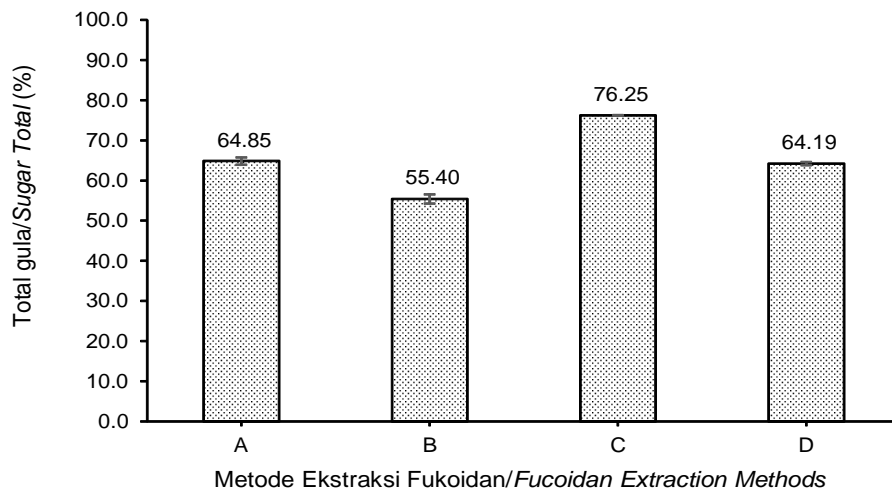
A. HCl 0,1N pH 4 suhu ruang/room temperature t = 6 jam/hours

B. HCl 0,1N suhu 85 °C t = 4 jam/hours

C. Akuades/aquadest T : 85 °C t = 4 jam/hours

D. CaCl₂ 2% T : 85 °C t = 4 jam/hours

Gambar 3. Pengaruh variasi metode ekstraksi terhadap rendemen fukoidan/
Figure 3. Effect varied of extraction methods on yield fucoidan (%)



Keterangan/Notes :

A. HCl 0,1N pH 4 suhu ruang/room temperature t = 6 jam/hours

C. Akuades/aquadest T : 85 °C t = 4 jam/hours

B. HCl 0,1N suhu 85 °C t = 4 jam/hours

D. CaCl₂ 2% T : 85 °C t = 4 jam/hours

Gambar 4. Pengaruh variasi ekstraksi terhadap total gula fukoidan
 Figure 4. Effect varied of extraction methods on total sugar content of fucoidan (%)

secara umum akan menghasilkan rendemen yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan akuades (Li et al., 2008). Namun metode ini memiliki kelemahan yaitu dapat mengekstrak polisakarida lain seperti alginat dan menyebabkan degradasi struktur fukoidan. Penggunaan garam kalsium klorida lebih disarankan untuk menghilangkan komponen yang tidak larut dalam asam dan lebih efektif untuk fukoidan murni, namun menghasilkan rendemen yang lebih kecil (Umeda, Kihara, Ikai, & Kato, 2003). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian ini yang menggunakan pelarut ekstraksi CaCl₂ 2% yaitu memiliki rendemen fukoidan terendah dibandingkan dengan akuades dan asam.

Kandungan Total Gula

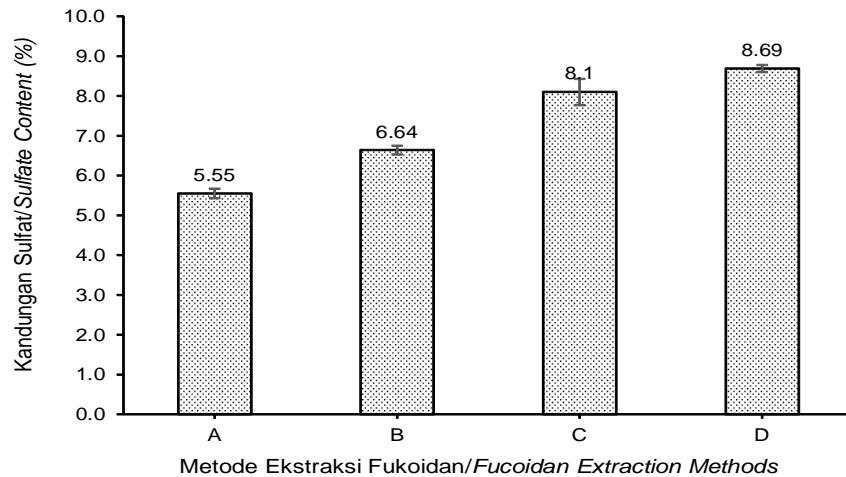
Kandungan total gula (Gambar 4) tertinggi pada ekstrak fukoidan diperoleh dengan menggunakan pelarut akuades yaitu sebesar 76% dan terendah dengan menggunakan pelarut ekstraksi HCl 0,1N dengan pemanasan yaitu sebesar 55,40% pada suhu ruang. Penentuan total gula ini menggunakan metode phenol-asam sulfat sederhana, yang dikenal sensitif dan terpercaya (Dubois et al., 1956). Prinsip dari metode ini yaitu karbohidrat didehidrasi dengan asam sulfat pekat lalu di hidrolisis menghasilkan turunan furfural. Turunan furfural selanjutnya direaksikan dengan phenol menghasilkan larutan berwarna kuning pucat (Rao & Pattabiraman, 1989).

Pada penelitian ini digunakan fukosa sebagai standar dengan alasan bahwa fukosa merupakan

senyawa monomer penyusun fukoidan. Dalam akuades kelarutan polisakarida lebih tinggi dibandingkan dengan asam, hal ini merupakan salah satu penyebab kandungan total polisakarida lebih tinggi pada pengeksrak akuades. Kandungan total gula pada fukoidan dipengaruhi beberapa hal antara lain metode ekstraksi, perbedaan spesies, variasi musim, masa tumbuh/panen, lingkungan tempat tumbuh, dan pelarut (Franck et al., 2004; Sinurat et al., 2015; Skriptsova et al., 2009).

Kandungan Sulfat

Kandungan sulfat pada fukoidan sangat mempengaruhi bioaktivitasnya (Ale, Mikkelsen, & Meyer, 2011). Hal ini dibuktikan dari beberapa hasil penelitian sebelumnya di antaranya pada uji bioaktivitas fukoidan dari *Ecklonia kurome* sebagai anti koagulan bergantung pada kandungan sulfat dan berat molekulnya (Nishino, Aizu & Nagumo, 1991). Kandungan sulfat yang tinggi menghasilkan bioaktivitas yang lebih tinggi sebagai anti koagulan dibandingkan fukoidan dengan kandungan sulfat lebih rendah. Uji bioaktivitas lain yaitu fukoidan sebagai imunostimulan dengan konsentrasi fukoidan yang sama dan kandungan sulfat yang berbeda, menunjukkan bahwa kandungan sulfat yang lebih tinggi memiliki bioaktivitas imunostimulan yang lebih tinggi juga (Sinurat et al., 2016). Pada penelitian ini (Gambar 5) diperoleh kandungan sulfat tertinggi pada ekstraksi fukoidan menggunakan pelarut CaCl₂ 2% (8,69%), sedangkan paling rendah menggunakan pelarut HCl pada suhu ruang (5,55%). Kemungkinan pelarut menggunakan asam selain



Keterangan/Notes :

A. HCl 0,1N pH 4 suhu ruang/room temperature t = 6 jam/hours

B. HCl 0,1N suhu 85 °C t = 4 jam/hours

C. Akuades/aquades T : 85 °C t = 4 jam/hours

D. CaCl₂ 2% T : 85 °C t = 4 jam/hours

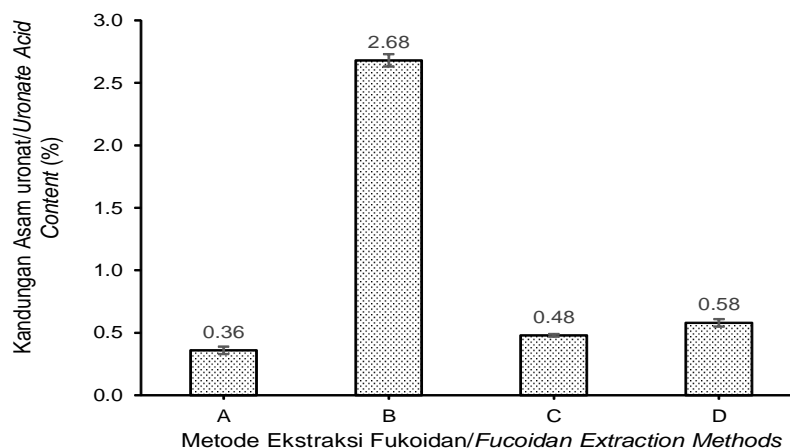
Gambar 5. Pengaruh variasi ekstraksi terhadap kandungan sulfat fukoidan
Figure 5. Effect varied of extraction methods on sulfate content of fucoidan (%)

mengekstrak fukoidan dari rumput laut, juga mendegradasi sulfat yang terikat pada fukoidan. Kandungan sulfat dan posisi sulfat pada struktur monosakaridanya dapat mempengaruhi bioaktivitas fukoidan. Selain kandungan sulfat pada fukoidan, habitat dan musim panen juga dapat mempengaruhi bioaktivitasnya (Skriptsova et al., 2009).

Asam Uronat

Asam uronat adalah indikasi adanya asam alginat yang merupakan senyawa penyusun polimer alginat.

Berdasarkan hasil analisis yang diperoleh, pada semua perlakuan masih terdapat asam uronat. Hal ini menunjukkan bahwa fukoidan yang diperoleh masih memiliki kontaminan polisakarida lain. Pada rumput laut cokelat, alginat merupakan polisakarida paling dominan, sehingga perlu dilakukan tahap lanjutan agar mendapatkan fukoidan lebih murni. Hasil penelitian menunjukkan kandungan asam uronat (Gambar 6) paling tinggi diperoleh dengan perlakuan ekstraksi menggunakan HCl suhu 85 °C yaitu sebesar 2,68%. Sedangkan kandungan asam uronat terendah



Keterangan/Notes :

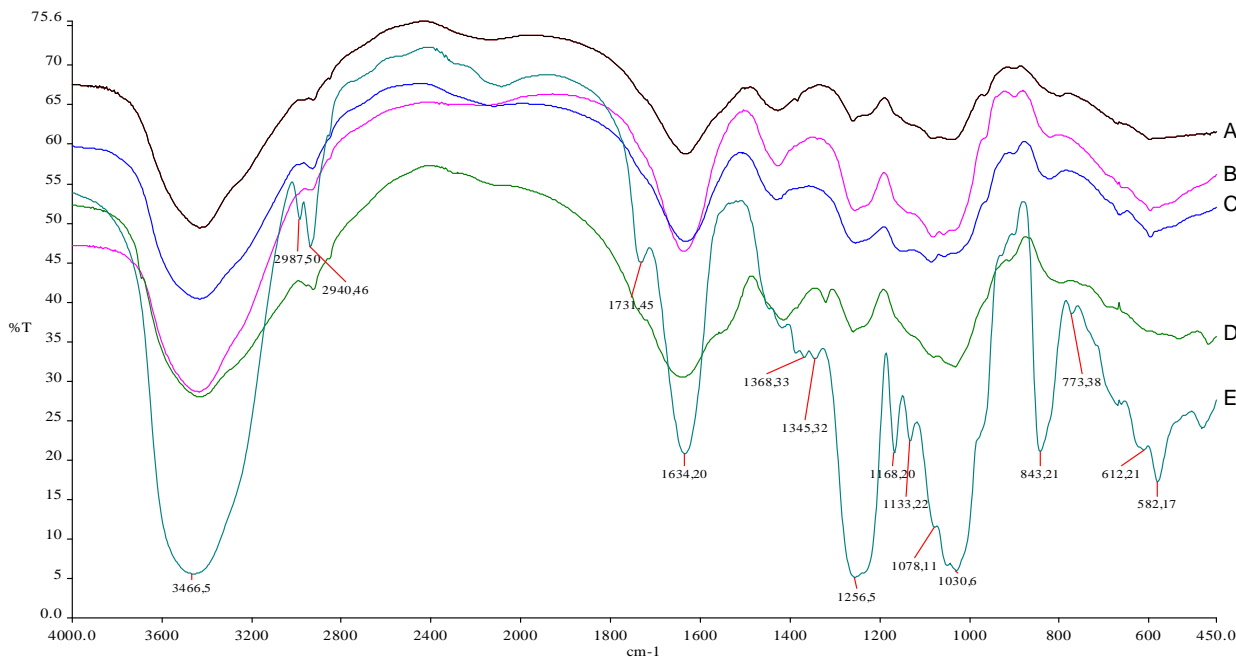
A. HCl 0,1N pH 4 suhu ruang/room temperature t = 6 jam/hours

B. HCl 0,1N suhu 85 °C t = 4 jam/hours

C. Akuades/aquades T : 85 °C t = 4 jam/hours

D. CaCl₂ 2% T : 85 °C t = 4 jam/hours

Gambar 6. Pengaruh variasi ekstraksi terhadap kandungan asam uronat fukoidan
Figure 6. Effect varied of extraction methods on uronate acid content of fucoidan (%)



Keterangan/Notes :

- A. HCl 0,1N pH 4 suhu ruang/room temperature t = 6 jam/hours
- B. HCl 0,1N suhu 85 °C t = 4 jam/hours
- C. Akuades/aquades T : 85 °C t = 4 jam/hours
- D. CaCl₂ 2% T : 85 °C t = 4 jam/hours
- E. Fukoidan Komersil dari *Fucus vesiculosus*/Commercial fucoidan from *Fucus vesiculosus*

Gambar 7. Spektra FT-IR fukoidan dari variasi metode ekstraksi
 Figure 7. FT-IR spectra of fucoidan from varied extraction methods

menggunakan HCl tanpa pemanasan yaitu sebesar 0,36%. Kemungkinan ekstraksi asam alginat dipengaruhi oleh suhu atau pemanasan. Tingginya kandungan asam uronat menunjukkan tingginya asam alginat yang terkandung di dalamnya (Hagiwara, 2010).

Secara keseluruhan bila dilihat dari kandungan total karbohidrat dan sulfat, ekstraksi dengan menggunakan pelarut akuades dan CaCl₂ 2% lebih tinggi bila dibandingkan dengan menggunakan pelarut asam. Sebaliknya kandungan asam uronat pada metode ekstraksi menggunakan akuades dan CaCl₂ 2%, lebih rendah bila dibandingkan dengan menggunakan pelarut asam. Menurut Ale et al. (2011) penggunaan asam dalam ekstraksi fukoidan menyebabkan degradasi pada rantai polimernya. Pada ekstraksi fukoidan menggunakan pelarut akuades diperoleh hasil kandungan total karbohidrat dan sulfat yang lebih tinggi dibandingkan ekstraksi menggunakan asam, sehingga untuk mendapatkan kandungan sulfat dan total karbohidrat lebih baik dilakukan ekstraksi fukoidan menggunakan akuades. Pada ekstrak fukoidan yang diperoleh dari pelarut asam berwarna sedikit putih, hal ini mengindikasikan masih banyak garam dan monomer lain yang tercampur, sedangkan

ekstrak dari akuades dan CaCl₂ 2% warnanya lebih coklat yang menunjukkan bahwa polimer fukoidan lebih dominan. Larutan CaCl₂ digunakan untuk mengendapkan alginat dan menambah kemurnian fukoidan tetapi larutan ini dapat mengurangi rendemennya (Rioux, Turgeon & Beaulieu, 2007).

Hasil analisis gugus fungsi

Hasil pengukuran spektra FTIR yang dilakukan pada bilangan gelombang 4000–450 cm⁻¹ tertera pada Gambar 7. Spektra FTIR pada 1200-800 cm⁻¹ merupakan rentang informasi tentang adanya polisakarida mayor dalam campuran polisakarida kompleks (Kacurakova, et al., 2000). Puncak-puncak pada serapan di 1620 cm⁻¹ yang terdapat pada masing-masing spektrum fukoidan, diindikasikan asimetrik merupakan vibrasi karboksilat (RCOO⁻).

Puncak serapan disekitar 1253-1220 cm⁻¹ menurut Pereira, Amado, Critchley, van de Velde, & Ribeiro-Claro, P. J. A (2009) bahwa puncak tersebut adalah primer dan sekunder dari golongan O-sulfat, yaitu merupakan karakteristik komponen fukoidan dan polisakarida sulfat pada rumput laut. Hal yang sama juga sudah dilaporkan bahwa pada fraksi polisakarida dari *S. stenophyllum* diperoleh pita serapan pada 837

cm⁻¹ yang merupakan indikasi golongan sulfat di posisi C-4 struktur monomernya (Pereira, Saly, & Paulo, 2013). Lebih lanjut Maciel et al., (2008) mengatakan pita serapan 840-820 cm⁻¹ (C-O-S) diindikasikan substitusi dari 4-sulfat dan 6-sulfat pada unit monosakarida. Pada semua perlakuan ekstraksi fukoidan diperoleh adanya pita serapan di 1250-an dan 840-an yang mengindikasikan adanya sulfat pada polisakarida. Perbedaan posisi sulfat pada struktur monomernya kemungkinan besar lebih disebabkan karena perbedaan jenis rumput laut yang digunakan sebagai bahan baku yang selanjutnya akan mempengaruhi jumlah kandungan sulfat yang terdapat pada spesies rumput laut coklat tersebut. Ciri khas fukoidan dilihat dari spektra FTIR dibuktikan dengan adanya serapan di bilangan 1200-an cm⁻¹ yang menunjukkan polisakarida sulfat dan diperkuat gelombang 800-an cm⁻¹ (C-O-S) untuk menyatakan posisi sulfat ekuatorial atau aksial.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian tentang metode optimum untuk ekstraksi fukoidan kasar dari rumput laut coklat *Sargassum binderi* Sonder diperoleh kesimpulan, yaitu:

1. Ekstraksi menggunakan HCl dan suhu 85 °C menghasilkan rendemen fukoidan dan kandungan asam uronat tertinggi.
2. Ekstraksi menggunakan asam dapat mendegradasi sulfat yang terikat pada fukoidan.
3. Ekstraksi optimum fukoidan untuk menghasilkan rendemen dan kandungan sulfat yang lebih tinggi, menggunakan metode ekstraksi pelarut akuades dan suhu 85 °C selama 4 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2011). Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine Drugs*, 9, 2106-2130.
- Bilan, M. I., Grachev, A. A., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E., & Usov, A. I., (2009). Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. *Carbohydrate Res.*, 341, 238-45.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54, 484-489.
- Dodgson, K. S. (1961). Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatic and non-enzymatic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochemical Journal*, 78(2), 312-319.
- Dodgson, K. S., & Price, R. G. (1962). A Note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemistry*, 84, 106-110.
- Duarte, M., Cardoso, M., & Nosedá, M. (2001). Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research*, 333, 281-293.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith F., (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*, 28,350-6.
- Franck, H., O'connell, E., Spence, J., Oilean, M. G. T., Teranta, G. (2004). Aqua feed: formulation and beyond, 1(4), 1-5.
- Hagiwara, H. (2010). La Jolla, CA, US Patent No. *Patentdocs: H. Foundation*.
- Imbs, N., Shevchenko, M., Sukhoverkhov, S. V., Semenova, T. L., Skriptsova, A. V., & Zvyagintseva, T. N. (2009). Seasonal variations of the composition and structural characteristics of polysaccharides from the brown alga *Costaria costata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(6),786-791.
- Isnansetyo, A., Lutfia, F. N. L., Nursid, M., Trijoko, & Susidarti, R. A. (2017). Cytotoxicity of fucoidan from three tropical brown algae against breast and colon cancer cell lines. *Pharmacogn Journal*, 9(1), 14-20.DOI: 10.5530/pj.2017.1.3
- Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N., & Ebringerova, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr Polym*, 43, 195-203.
- Kim, W. J., Kim, S. M., Kim H. G., Oh, H. R., Lee., K. B., Lee, Y. K., & Park, Y. I. (2007). Purification and anticoagulant activity of a Fucoïdan from Korean *Undaria pinnatifida* Sporophyll, *Alga*, 22(3), 247-252.
- Li, B., Lu F., Wei, X., & Zhao, R. (2008). Fucoïdan: sStructure and bioactivity. *Molecules*, 13, 1671-1695.
- Mak, W., Hamid, N., Liu, T., Lu, J., White, W. L. (2013). Fucoïdan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: monthly variations and determination of antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 95, 606-614.
- Merdekawati, W. & Susanto, A. B. (2009). Kandungan dan komposisi pigmen rumput laut serta potensinya untuk kesehatan. *Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Post harvest & Biotechnology*, 4(2), 41-47.
- Nishino, T., Aizu, Y., & Nagumo, T. (1991). The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. *Thrombosis Research*, 64, 723-731.
- O'Connell, E., Murray, P., Piggot, C., Hennequart, F., & Tuohy, M. (2008). Purification and characterization of a N-acetylglucosaminidase produced by *Talaromyce emersonii* during growth on algal fucoidan. *Journal of Applied Phycology*, 20, 557-565.
- Pereira, L., Amando, A. M., Critchley, A. T., van de Velde, F., & Ribeiro-Claro, P. J. A. (2009). Identification of selected seaweed polysaccharides (*phycocolloids*) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloids*, 23,1903-1909.
- Pereira, L., Saly, F. G., & Paulo, J. A. R. (2013). Research article analysis by vibrational spectroscopy polysaccharides with potential use ini food, pharmaceutical and cosmetic industries. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 7.

- Ragan, M. A. & Craige J., (1980). Quantitive studies on brown algal phenols IV Ultraviolet Spectrophotometry of extracted polyphenols and implications for measuring dissolved organic matter in sea water. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 46 (20), 231-239.
- Rahmat, R. (1999). Kandungan dan Karakteristik fisikokimia alginat dari *Sargassum* sp. Yang dikumpulkan dari perairan Indonesia. Jakarta. Laboratorium Produk Alam Laut. Puslitbang Oseanologi LIPI.
- Rao, P. & Pattabiraman, T. N. (1989). Reevaluation of the phenol-sulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. *Analytical Biochemical*, 181(1), 18-22.
- Rioux, L. E., Turgeon, S. L., & Beaulieu, M. (2007). Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate Polymers*, 69, 530-537.
- Rosa, M. R., Solange, I. M., Lorenzo, P., & Jose, A. T. (2013). Extraction of sulfated by polysaccharides by autohydrolysis of Brown Seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 31-39.
- Sinurat, E., Rosmawaty P., & Saepudin E. (2011). Ekstraksi dan uji aktivitas fukoidan dari rumput laut cokelat (*Sargassum crassifolium*) sebagai antikoagulan. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 6 (2),131-138.
- Sinurat, E., Peranginangin, R., & Saepudin, E. (2015). Purification and characterization of fucoidan from the brown seaweed *Sargassum binderi* Sonder. *Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Post harvest & Biotechnology*, 10 (2), 79-87.
- Sinurat, E., Saepudin, E., Peranginangin, R., & Hudiyo, S. (2016). Immunostimulatory activity of brown seaweed-derived fucoidans at different molecular weights and purity levels towards *white spot syndrome virus* (WSSV) in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(10), 082-091 doi: 10.7324/JAPS.2016.601011
- Skriptsova, A. V., Shevchenko, N. M., Zvyagintseva, T. N., & Imbs, T. I. (2009). Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta). *Journal of Applied Phycology*, 22, 79-86
- Sokolova, R. V., Ermakova, S. M., Awada, T. N., Zvyagintseva, H. M., & Kanaan (2011). Composition, structural characteristics, and antitumor properties of polysaccharides from the brown alga *Dictyopteria polypodioides* and *Sargassum* sp., *Chemistry of Natural Compounds*, 47(3), 329-334.
- Talha, B. S. A. (2015). Methods for quantification and extraction of fucoidan, and quantification of the release of total carbohydrate and fucoidan from the brown algae *Laminaria hyperborea*. Norwegian University of Science and Technology. Thesis: 109.
- Umeda, Y., Kihara, H., Ikai, K., & Kato, I., (2003). Food or beverage additives containing fucoidan and food beverage containing fucoidan. US Patents :6573250
- Vishchuk, S. O., Ermakova, P. S., & Zvyagintseva, T. N. (2011). Sulfated polisaccharides from seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydrate Research*, 346, 2769-2776.
- Wang, C. Y, & Chen, C. Y. (2016). Extraction and characterization of fucoidan from six brown macroalgae. *Journal of Marine Science and Technology*, 24(2), 319-328. doi: 10.6119/JMST-015-0521-3.
- Yunizal, (2004). Teknologi pengolahan Alginat, Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan, Jakarta. ISBN : 979-97355-9-9, 6-12