

## EXTRACTION AND IDENTIFICATION OF SULFATED POLYSACCHARIDE FROM *Gracilaria sp.*

### Ekstraksi dan Identifikasi Polisakarida Bersulfat Dari Sayur Karang *Gracilaria sp*

Dominggus Malle<sup>1\*</sup>, Eirene Grace Fransina<sup>2</sup>, Feky Jansen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture Pattimura University, Kampus Poka, Jl. Ir. M. Putuhena, Ambon 97134

<sup>2</sup>Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences Pattimura University, Kampus Poka, Jl. Ir. M. Putuhena, Ambon 97134

\*E-mail: d.malle@faperta.unpatti.ac.id

Received: October 2013 Published: January 2014

#### ABSTRACT

Polysaccharide from *Gracilaria sp* (locally known as “Sayur Karang”) was extracted using hot alkaline solutions (NaOH and KOH). Fractionation using DEAE-Sepharose Fast Flow column showed that the polysaccharide discharged after being eluted with 0.5 – 1.0 M NaCl. Spectroscopic analysis using FTIR showed that the polysaccharide contained hydroxyl ( $3420\text{ cm}^{-1}$  (NaOH fraction) dan  $3446\text{ cm}^{-1}$  (KOH fraction)), carbonyl ( $1642\text{ cm}^{-1}$  (NaOH fraction) and  $1644\text{ cm}^{-1}$  (KOH fraction)) and sulphate ( $1271\text{ cm}^{-1}$  (NaOH fraction) and  $1262\text{ cm}^{-1}$  (KOH fraction)) groups proving that the polysaccharide is a sulphated polysaccharide. A further study is needed to elucidate the structure of the sulphated polysaccharide as well as physiochemical properties of the polysaccharide.

**Keywords:** Extraction, Sulphated polysaccharide, *Gracilaria*, FTIR

#### PENDAHULUAN

Indonesia sebagai negara kepulauan dengan panjang garis pantai 81.000 km merupakan kawasan pesisir dan lautan yang memiliki berbagai sumberdaya hayati yang sangat besar dan beragam. Berbagai sumberdaya hayati tersebut merupakan potensi pembangunan yang sangat penting sebagai sumber-sumber pertumbuhan ekonomi baru (Dahuri, 2000).

Rumput laut sebagai salah satu komoditas ekspor merupakan sumber devisa bagi negara dan budidayanya merupakan sumber pendapatan nelayan, dapat menyerap tenaga kerja, serta mampu memanfaatkan lahan perairan pantai di kepulauan Indonesia yang sangat potensial. Sebagai negara kepulauan, maka pengembangan rumput laut di Indonesia dapat dilakukan secara luas oleh para petani/nelayan. Sebagai dasar hukum dalam mendorong kegiatan usaha budidaya laut maka pemerintah telah mengeluarkan Keppres No. 23 tahun 1982 tentang Pengembangan Budidaya Laut di perairan Indonesia (Samsuari, 2006).

Perkembangan penelitian rumput laut di Indonesia telah dimulai sejak *Ekspedisi Siboga* yang dilakukan antara tahun 1899 - 1900. Penelitian selanjutnya *van Bosse* tahun 1913 - 1928 telah berhasil mengoleksi jenis rumput laut yang tumbuh di perairan Indonesia sebanyak 555 jenis. Pada penelitian *van Bosse* tahun 1914 - 1916 di Kepulauan Kai pada *Ekspedisi Danish* menemukan sebanyak 25 jenis alga merah, 28 jenis alga hijau, dan 11 jenis alga coklat. Penelitian identifikasi jenis rumput laut berlanjut pada penelitian *Snellius-II* tahun 1985 yang menemukan 41 jenis alga merah, 59 jenis alga hijau, dan 9 jenis alga coklat, sedangkan pada penelitian *Buginesia-III* pada tahun 1988 – 1990 ditemukan sebanyak 118 jenis alga merah, 80 jenis alga hijau, dan 36 jenis alga coklat (Basmal, 2001).

Di bidang industri, ternyata pengolahan rumput laut sudah cukup lama dikenal di Indonesia, meskipun dengan teknologi proses dan peralatan yang sederhana. Rumput laut telah diolah menjadi beragam jenis makanan, di antaranya kue, puding, dodol, dan agar.

Hidroklorid yang terkandung di dalam rumput laut merupakan alasan utama untuk menjadikannya sebagai bahan baku industri kosmetik, farmasi, cat, tekstil, pakan ternak, dan industri lainnya (Anggadiredja dkk, 2008).

Sebagian besar rumput laut di Indonesia diekspor dalam bentuk kering (Suwandi, 1992). Bila ditinjau dari segi ekonomi, harga hasil olahan rumput laut seperti polisakarida bersulfat lebih tinggi dari pada rumput laut kering. Oleh karena itu, untuk meningkatkan nilai tambah dari rumput laut dan mengurangi impor akan hasil-hasil olahannya, maka pengolahan rumput laut menjadi produk polisakarida bersulfat di dalam negeri perlu dikembangkan (Istini & Suhaimi, 1998).

Polimer karbohidrat bersulfat alam dari berbagai sumber dapat memiliki banyak aktivitas fisiologis. Dalam beberapa tahun terakhir, tes skrining aktivitas antivirus dari ekstrak sejumlah ganggang laut telah mengarah pada identifikasi sejumlah polimer karbohidrat yang memiliki efek penghambatan terhadap potensi virus herpes simpleks (HSV) tipe 1 dan 2, sitomegalovirus manusia, virus defisiensi kekebalan tubuh manusia tipe 1, virus pernapasan, dan virus influenza. Polisakarida ini termasuk fukoidan, galaktosa bersulfat, ulvans, dan mannans. Dengan demikian, potensi antivirus ekstrak polisakarida bersulfat dari alga menjadi sangat menarik, walaupun ada kekurangan informasi tentang struktur kimia dan aktivitas fisiologis (Mazumber dkk, 2002; Manoj dkk, 2013).

Alga merah memiliki potensi beragam mulai dari produksi pangan sampai pada pemanfaatannya dalam bidang medis. Al-Fath (2011) telah melakukan penelitian terhadap alga merah jenis *Eucheuma alvarezii* Doty. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Eucheuma alvarezii* Doty mengandung polisakarida bersulfat kasar (rendemen 58,90%), polisakarida bersulfat murni (rendemen 54,36%), polisakarida bersulfat fraksi larut dalam KCl 2,5% (rendemen 60,34%), dan polisakarida bersulfat tidak larut dalam KCl 2,5% (rendemen 34,53%).

Alga merah jenis *Gracilaria sp* yang dikenal dengan nama sayur karang juga mengandung polisakarida sulfat. Tetapi penelitian tentang kandungan polisakarida sulfat dalam sayur karang ini belum pernah dilakukan. Sayur karang adalah salah satu spesies alga merah yang ditemukan di Ambon dan sekitarnya. Sesuai dengan namanya, sayur karang biasanya

dimanfaatkan sebagai sayuran oleh masyarakat setempat. Pemanfaatan sayur karang masih terbatas, dibandingkan potensinya di bidang farmasi dan industri lainnya. Oleh karena itu analisis kandungan karbohidrat bersulfat pada “sayur karang” sangat penting dilakukan untuk mendapatkan informasi ilmiah tentang manfaat fungsional yang dimiliki oleh “sayur karang” dan potensi pengembangannya sebagai salah satu sumber pangan fungsional.

## METODOLOGI

### Prosedur Penelitian

#### 1. Ekstraksi karbohidrat bersulfat dengan larutan alkali

Ekstraksipolisakarida bersulfat mengikuti prosedur Okajima-Kaneko dkk, (2007) dengan sedikit modifikasi. Sampel kering sebanyak 5 g dicuci dengan air hingga bersih, dikeringkan, dipotong kecil-kecil dan kemudian dicuci dengan etanol sebanyak 3 kali. Setelah itu direndam masing-masing dalam larutan NaOH 4%, 6%, dan 8% sebanyak 100 mL. Campuran selanjutnya dipanaskan pada suhu 75°C selama 3 jam dan kemudian dinginkan dan selanjutnya didialisis semalam. Hasil dialisis disaring lalu disentrifus pada 3100 rpm selama 15 menit. Hasil filtratnya diambil kemudian dirotavap pada 105 rpm dengan suhu air 60°C. Hasilnya dimasukkan ke dalam etanol dingin (hasil rotavap 25 mL dituangkan perlahan-lahan ke dalam wadah berisikan 100 mL etanol dingin). Akan muncul seperti benang-benang dalam larutan etanol. Larutan disaring dan diambil endapan/benang-benang tersebut dan kemudian larutkan dalam air. Perlakuan diatas dilakukan pada sampel lain dengan menggunakan larutan KOH.

#### 2. Pemurnian dengan kromatografi penukar anion

Hasil ekstraksi ini kemudian dilarutkan dalam air dan dimasukkan ke dalam kolom pertukaran ion (DEAE-Sepharose) yang telah diekuilibrasi dengan air. Elusi dilakukan dengan air dan larutan NaCl 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M, 1,0 M, 1,5 M, dan 2,0 M (Mohsen dkk, 2007). Setiap fraksi yang dikumpulkan diuji dengan metode  $\alpha$ -naftol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Selanjutnya fraksi yang positif akan dilakukan uji dengan metode FTIR untuk menentukan gugus fungsi.

### II.3. Analisis FTIR

Fraksi DEAE-Sepharose dari ekstraksi dengan larutan NaOH dan KOH yang memberikan hasil positif terbaik dengan uji  $\alpha$ -naftol- $H_2SO_4$  (dari elusi dengan konsentrasi eluen yang sama) dianalisis dengan menggunakan metode *Spread on NaCl Window* pada bilangan gelombang 4000 – 600  $cm^{-1}$  dan mengacu pada standar uji ASTM E1252 (*Standard Practice for General Techniques for Obtaining Infrared Spectra of Organic Compound for Qualitative Analysis*).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Ekstraksi Polisakarida Bersulfat.

Sampel rumput laut *Gracilaria* sp. yang secara lokal dikenal dengan nama “Sayur Karang” diperoleh dari perairan Hukurila, Kecamatan Leitimur Selatan, Kota Ambon (Gambar 1). Sampel basah dijemur hingga kering. Selanjutnya sampel dibersihkan dengan air tawar untuk menghilangkan garam dan kotoran yang melekat. Perlakuan selanjutnya adalah perendaman sampel dengan larutan etanol 96% sebanyak 3 kali. Hal ini dimaksudkan untuk melarutkan komponen lemak dan menghilangkan pigment dalam sampel sehingga tidak mengganggu proses pemurnian.



Gambar 1. Sayur karang *Gracilaria* sp.

Ekstraksi polisakarida dari sampel dilakukan secara alkalis dengan menggunakan natrium hidroksida (NaOH) dan kalium hidroksida (KOH) dengan variasi konsentrasi masing-masing 4%, 6% dan 8% pada suhu 75 °C selama 3 jam. Ekstraksi polisakarida secara alkalis merupakan salah satu metode yang umum (Okajima-Kaneko *et al.*, 2007). Untuk

memisahkan molekul-molekul kecil dan menetralkan pH sampel maka sampel hasil ekstraksi didialisis terhadap air dengan membran selulosa dengan *Molecular Weight Cut-off* (MWCO) sebesar 14.000 Dalton. Hasil dialisis disentrifus kemudian dikonsentrasikan dengan dirotavap pada suhu 40°C. Hasil rotavap merupakan sampel yang terkonsentrasi dilarutkan dalam etanol dingin dan terbentuk benang-benang putih yang adalah polisakarida. Cara pengengapan dalam etanol dingin merupakan metode yang lazim dalam proses isolasi karbohidrat bersulfat (Boulhal *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011).

### 2. Pemurnian Polisakarida dengan Kromatografi Penukar Ion

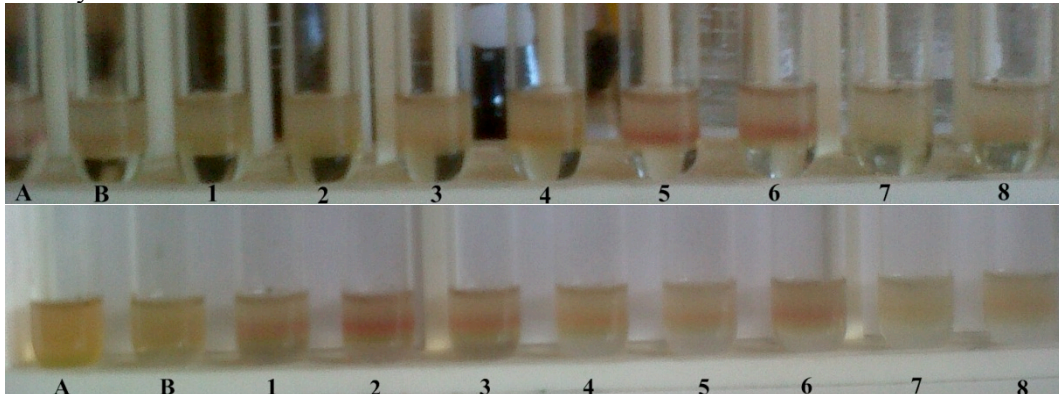
Sampel hasil dialisis selanjutnya difraksinasi dengan kolom pertukaran ion DEAE-Sepharose Fast Flow. Sampel difraksinasi dengan menggunakan konsentrasi NaCl 0,1 M; 0,2 M; 0,3 M; 0,4 M; 0,5 M; 1,0 M; 1,5 M dan 2,0 M. Analisis kualitatif dengan uji fenol- $H_2SO_4$  (Uji Molisch) dari hasil fraksinasi menunjukkan adanya cincin warna ungu antar fasa (gambar 3 dan 4). Terbentuknya cincin furfural ungu mengindikasikan adanya karbohidrat (polisakarida) dalam sampel. Pemurnian polisakarida bersulfat umumnya dilakukan dengan kolom kromatografi penukar ion seperti DEAE-cellulose (Viana *et al.*, 2002). Matriks penukar ion ini memiliki muatan positif yang akan mengikat gugus sulfat (muatan negatif) dari polisakarida bersulfat. Elusi senyawa polisakarida bersulfat dari matriks penukar ion dilakukan dengan menggunakan ion konter (*counter ion*) seperti  $Cl^-$  yang ditambahkan ke dalam larutan pengelusi.

### 3. Analisis Polisakarida dengan Spektroskopi FT-IR

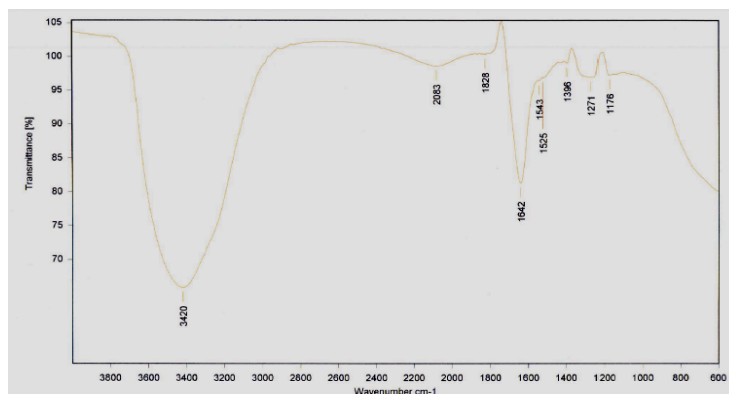
Pengujian dengan FT-IR dilakukan untuk membuktikan adanya polisakarida bersulfat. Spektra IR dari sampel yang diekstraksi dengan NaOH dan KOH memiliki bilangan gelombang yang cukup khas untuk polisakarida bersulfat (gambar 3 dan 4).

Signal pada 1271  $cm^{-1}$  (fraksi NaOH) dan 1262  $cm^{-1}$  (fraksi KOH) menunjukkan uluran S=O asimetrik. Signal ini mendekati nilai 1258  $cm^{-1}$  (Zhang *et al.*, 2011) dan 1260  $cm^{-1}$  (Moshen

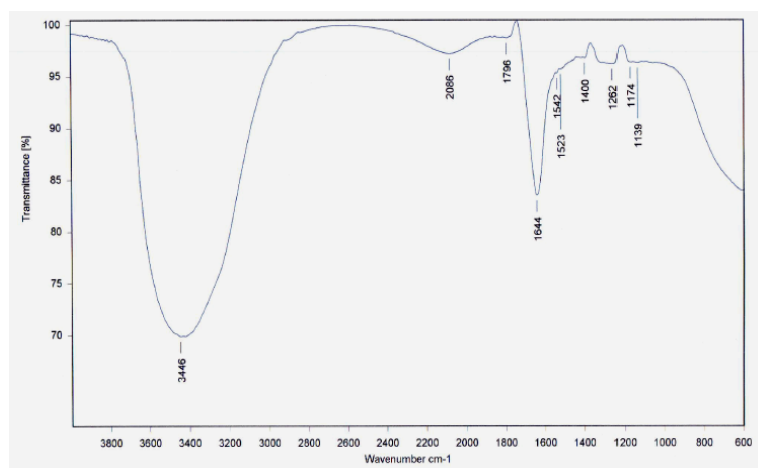
et al., 2007) dan berada dalam kisaran 1250 – (fraksi NaOH) dan 3446  $\text{cm}^{-1}$  (fraksi KOH) 1370  $\text{cm}^{-1}$  yaitu untuk



Gambar 2.. Hasil uji Molisch terhadap fraksi-fraksi dari sampel yang diekstraksi dengan NaOH (atas) dan KOH (bawah) (Keterangan: A= Bilas; B= *Unbound*; 1= 0,1 M; 2= 0,2 M; 3= 0,3 M; 4= 0,4 M; 5= 0,5 M; 6= 1,0 M; 7= 1,5 M; dan 8= 2,0 M NaCl).



Gambar 3. Spektra FTIR sampel yang diekstraksi dengan larutan



Gambar 4. Spektra FTIR sampel yang diekstraksi dengan larutan KOH

vibrasi uluran  $\text{-S=O}$  asimetrik dari ester sulfat (Bouhlal et al., 2011). Sedangkan puncak 1642  $\text{cm}^{-1}$  (fraksi NaOH) dan 1644  $\text{cm}^{-1}$  (fraksi KOH) merupakan uluran vibrasi  $\text{-C-O}$  dari asam uronat, salah satu komponen polisakarida bersulfat. Selanjutnya signal pada 3420  $\text{cm}^{-1}$

merupakan indikasi gugus fungsi  $\text{R-OH}$  (Ale et al., 2011).

Hasil ini menunjukkan bahwa “sayur karang (*Gracilaria* sp) mengandung karbohidrat bersulfat. Ini berarti “sayur karang” dapat dijadikan sebagai sumber polisakarida bersulfat.

DAFTAR PUSTAKA

- Ale, M.T., Maruyama, H., Tamauchi, H., Mikkelsen, J.D. and Meyer, A.S. 2011. Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds Inhibit Proliferation of Melanoma Cells and Induce Apoptosis by Activation of Caspase-3 *in Vitro*. *Mar. Drug.* 9: 2605-2621.
- Al-Fath, H.N. 2011. Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi Polisakarida Sulfat pada Rumput Laut Jenis *Euclima alvarezii* Doty dari Teluk Waworada Kabupaten Bima. *Skripsi*, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Malang.
- Anggadireja, J.T., Zalnika, A., Purwoto, H., & Istini, S., 2008. *Rumput Laut*. Penerbit Penebar Swadaya, Jakarta
- Basmal J. 2001. *Perkembangan Teknologi Riset Penanganan Pasca Panen dan Industri Rumput Laut*. Forum Rumput Laut. Jakarta: Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan. Departemen Kelautan dan Perikanan. hlm 16-22.
- Boulhal, R., Haslin, C., Chermann, J.C., Collic-Jouault, S., Singuin, C., Simon, G., Carentola, S., Riadi, H. and Bourgougnon, N. 2011. Antiviral Activities of Sulfated Polysaccharides Isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales), *Mar. Drugs* 9: 1187-1209
- Dahuri, R., 2000. *Pendayagunaan Sumberdaya Kelautan untuk Kesejahteraan Rakyat (Kumpulan Pemikiran)*. LISPI. ISBN : 979-96004-0-5
- Istini, S. & Suhaimi., 1998, *Manfaat dan Pengolahan Rumput Laut*, Lembaga Oseanologi Nasional, Jakarta.
- Manoj, S.G.M., Mahesh, K.P. S., Vasanthi, M. and Anant, A. 2013. Anticoagulant property of sulphated polysaccharides extracted from marine brown algae collected from Mandapam Island, India. *Afr. J. Biotechnol.* 12(16):1937-1945
- Mazumber, S., Ghosal, P. K., Pujol, C. A., Carlucci, M. J., Damonte, E. B., Ray, B., 2002, Isolation, Chemical Investigation and Antiviral Activity from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Int. J. of Bio. Macromolecules.* 31, 87-95
- Mohsen, Asker, M.S., Mohamed, S.F., Ali, F.M. and El-Sayed O.H. 2007. Chemical Structure and Antiviral Activity of Water-soluble Sulfated Polysaccharides from *Sargassum latifolium*. *J. Appl. Sci. Res.* 3(10): 1178-1185
- Okajima-Kaneko, M., Ono, M., Kabata, K., Kaneko, T. 2007. Extraction of novel sulfated polysaccharides from *Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada, and its spectroscopic characterization. *Pure Appl. Chem.*, 79 (11): 2039–2046.
- Samsuari, 2006. *Penelitian Pembuatan Karaginan dari Rumput Laut Euclima Cottonii di Wilayah Perairan Kabupaten Jeneponto Propinsi Sulawesi Selatan*. hal 8-11.
- Silva, R.O., dos Santos, G.M.P., Nicolau, L.A.D., Lucetti, L.T., Santana, A.P.M., de Souza Chaves, L., Barros, F.C.N., Freitas, A.L.P., Souza, M.H.L.P., Medeiros, J.V.R. 2011. Sulfated-Polysaccharide Fraction from Red Algae *Gracilaria caudata* Protects Mice Gut Against Ethanol-Induced Damage. *Mar. Drugs*, 9: 2188-2200.
- Suwandi, 1992, *Isolasi dan Identifikasi Karaginan dari Rumput Laut Euclima cottonii*, Lembaga Penelitian Universitas Sumatra Utara, Medan.
- Viana, G.S.B., Freitas, A.L.P., Lima, M.M.L. Vieira, L.A.P. Andrade, M.C.H. and Benevides, N.M.B. 2002. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35: 713-722
- Zhang, H., Wang, Z.Y., Yang, L., Yang, X., Wang, X. and Zhang, Z. 2011. *In Vitro* Antioxidant Activities of Sulfated Derivatives of Polysaccharides Extracted from *Auricularia auricular*. *Int. J. Mol. Sci.* 12:3288-3302