

Kaedah penentuan sebatian kimia fukoxantin dalam serbuk rumpai laut perang

(Determination of fucoxanthin constituent in brown seaweed powder)

Hasnisa Hashim, Tun Nurbrillinda Mokhtar, Sharizan Ahmad dan Norra Ismail

Pengenalan

Rumpai laut atau alga merupakan tumbuhan akuatik liar yang tumbuh semula jadi di pesisir pantai terutamanya di kawasan terumbu karang dan kawasan pantai yang terlindung.

Tumbuhan ini bersifat makroskop, multisel dan makrotalik berbanding dengan tumbuhan akuatik yang lain. Bawah Dasar Agromakanan Negara (DAN 2011 – 2020), rumpai laut tidak lagi dikenali sebagai tumbuhan liar dan telah dikenal pasti sebagai komoditi pertanian bernilai tinggi yang merupakan salah satu sumber ekonomi negara. Oleh itu, Program NKEA-Pertanian diwujudkan bagi membangunkan industri rumpai laut berskala komersial. Di samping itu, usaha terus dilakukan bagi meningkatkan pengeluaran dan produktiviti penternak sedia ada.

Di Malaysia, rumpai laut banyak didapati di kawasan perairan pantai timur Sabah yang merupakan kawasan pengeluaran rumpai laut terbesar di Malaysia. Sehingga 2014, penanaman rumpai laut di Sabah ialah 13,000 hektar dan pengeluarannya mencecah 24,533 tan. Menjelang tahun 2020, Jabatan Perikanan Malaysia mensasarkan industri rumpai laut menyumbang sebanyak 730 ribu tan.

Terdapat pelbagai spesies dan nama gelaran rumpai laut di perairan Malaysia iaitu *sweet, orange, red, yellow, brown, crocodile, worm, giant, black, aring* dan *eucheuma*. Namun spesies utama yang ditenak di negeri Sabah ialah rumpai laut merah iaitu *Kappaphycus alvarezii* dan *Eucheuma cottoni*. Spesies ini banyak ditenak bagi menghasilkan karagenan iaitu biopolimer marin.

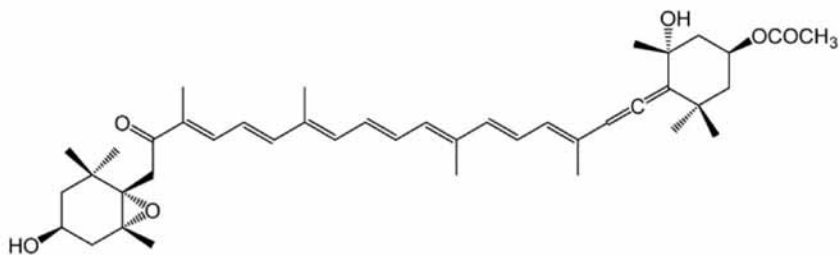
Rumpai laut diklasifikasikan kepada tiga kumpulan berasaskan pigmen warna asli iaitu rumpai laut perang (*Phaeophyceae*), rumpai laut merah (*Rhodophyceae*) dan rumpai laut hijau (*Chlorophyceae*). Rumpai laut kaya dengan pigmen warna yang terdiri daripada polisakarida dan sebatian bioaktif yang bertindak sebagai bahan antioksidan seperti polifenol dan karotenoid. Sebatian bioaktif ini boleh digunakan dalam makanan berfungsi, farmaseutikal dan produk kosmetik kerana memberi manfaat kesihatan kepada pengguna. Salah satu sebatian aktif rumpai laut yang mempunyai kesan farmakologi terhadap kesihatan manusia ialah fukoxantin iaitu pigmen utama rumpai laut perang yang merupakan

salah satu karotenoid paling banyak didapati secara semula jadi (10% anggaran jumlah pengeluaran karotenoid). Ia adalah pigmen berwarna oren, yang terdapat bersama dengan klorofil a, klorofil c dan β -karotena yang menjadikannya berwarna perang atau hijau zaitun. Rumpai laut perang yang banyak terdapat di perairan Malaysia adalah daripada spesies *Sargassum* yang boleh dimakan seperti *Sargassum binderi* dan *Sargassum muticum*.

Fukoxantin

Fukoxantin ($C_{42}H_{58}O_6$) tergolong dalam kumpulan xantofil iaitu pigmen kuning semula jadi yang membentuk satu daripada dua bahagian utama kumpulan karotenoid. Fukoxantin juga merupakan sebatian bioaktif larut lemak yang mempunyai struktur unik yang mengandungi ikatan alenik, sembilan ikatan ganda dua berkonjugat, 5,6-monoepoksida (memainkan peranan penting dalam struktur fukoxantin) dan kumpulan hidroksil seperti dalam *Rajah 1*. Ikatan alenik ini tidak ditemui dalam struktur karotenoid rumpai laut perang yang lain. Struktur fukoxantin ini berkait rapat dengan aktiviti farmakologi yang menunjukkan sifat antioksidan yang tinggi.

Sejak kebelakangan ini, kajian mengenai fungsi karotenoid sebagai makanan kesihatan dijalankan secara aktif kerana fukoxantin mempunyai sifat antiradang, antikanser, antioksidan, antidiabetik dan antiobesiti. Fukoxantin juga menunjukkan aktiviti hepatoprotektif yang melindungi jantung dan serebrovaskular serta bertindak sebagai pemulung radikal yang berkesan (*effective radical scavenger*). Kajian terdahulu melaporkan aktiviti pemotongan radikal DPPH yang kuat (bersifat antioksidan) dipamerkan oleh fukoxantin dari pelbagai sumber. Fukoxantin adalah bahan farmasetikal yang selamat. Beberapa kajian ketoksikan telah melaporkan bahawa tiada kesan negatif fukoxantin terhadap uji kaji tikus. Pengambilan ekstrak fukoxantin (0.0012%) setiap hari selama empat minggu tidak menunjukkan sebarang kematian dan tanda-tanda klinikal yang buruk dalam uji kaji ketoksikan akut terhadap tikus. Kajian klinikal juga menunjukkan pengambilan fukoxantin dapat mempercepatkan metabolisme badan yang berkait dengan kesan antiobesiti. Oleh itu, fukoxantin dapat meningkatkan kesihatan dan sesuai untuk



Rajah 1. Struktur kimia fukoxantin

digunakan sebagai makanan berfungsi dan bioingredien. Bagi setiap pembangunan produk makanan terutamanya makanan berfungsi dan bioingredien, sebatian bioaktif atau pigmen fukoxantin perlu ditentukan terlebih dahulu. Dalam kajian ini, sebatian aktif fukoxantin ditentukan menggunakan teknik kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) dan juga spektrofotometer pada jarak gelombang spesifik dan dalam masa yang singkat.

Penyediaan serbuk rumpai laut perang

Serbuk Sargassum muticum (Kaedah pengeringan ketuhar)

Rumpai laut *Sargassum muticum* dari Semporna, Sabah dibilas dengan air bagi menyingkirkan garam dan pasir. Seterusnya rumpai laut ini dipotong kecil (lebih kurang 1 cm) dan dikeringkan di dalam ketuhar pada suhu 110 °C selama dua jam. Rumpai laut yang telah kering, dikisar dan ditapis menggunakan jaring bersaiz 0.25 mm untuk dijadikan serbuk. Kandungan kelembapan serbuk *Sargassum muticum* ditentukan menggunakan penganalisis kelembapan Sartorius model MA100. Bacaan kelembapan serbuk yang sesuai adalah bawah 10% (bagi mengelakkan kontaminasi kulat dan jangka hayat lebih lama). Serbuk yang terhasil dipek di dalam pek aluminium dan disimpan sejuk pada suhu 4 °C untuk analisis seterusnya.

Serbuk pewarna semula jadi Sargassum muticum

(Pengekstrakan warna semula jadi dan pengeringan-sembur ekstrak warna *Sargassum muticum*)

Rumpai laut *Sargassum muticum* dari Semporna, Sabah dibilas dengan air bagi menyingkirkan garam dan pasir. Kemudian direndam dalam air bertapis dengan nisbah 1:10 (rumpai laut:air) dan diempar di dalam *waterbath* bersuhu 95 – 98 °C selama 210 minit. Ekstrak warna kemudiannya ditapis dengan menggunakan dua lapis kain muslin. Ekstrak warna *Sargassum muticum* dikeringkan menjadi serbuk dengan kaedah pengeringan-sembur (pengering-sembur B-290 Buchi, Flawil, Switzerland). Ekstrak warna dicampurkan dengan Maltodekstrin DE10 yang bertindak sebagai agen enkapsulasi. Serbuk yang terhasil dipek di dalam pek aluminium dan disimpan sejuk pada suhu 4 °C untuk analisis seterusnya.

Kaedah penentuan fukoxantin

Penyediaan larutan piawai fukoxantin

Sebatian piawai fukoxantin (ketulenan $\geq 95\%$) diperoleh dari Sigma Aldrich (St. Louise, USA). Pelarut yang digunakan adalah daripada gred HPLC. Sebanyak 1 mg fukoxantin piawai dilarutkan dalam 1 mL pelarut metanol:asetonitril (70:30 v/v) bagi menyediakan larutan stok piawai berkepekatan 1,000 ppm (mg/L). Manakala 1 mL stok piawai dilarutkan dalam 10 mL pelarut untuk menyediakan larutan piawai pertengahan

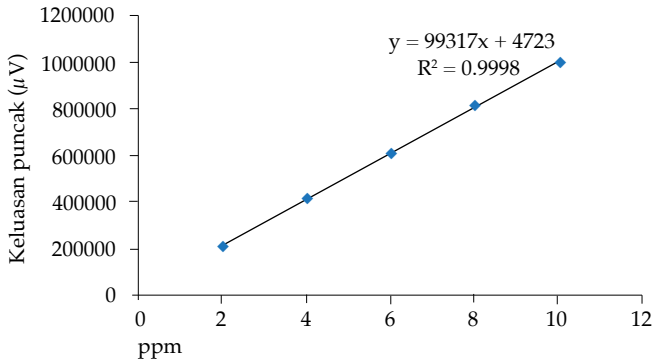
berkepekatan 100 ppm (mg/L). Seterusnya beberapa siri kepekatan 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm (*working standard solution*) disediakan daripada piawai 100 ppm ini untuk menghasilkan graf kalibrasi piawai fukoxantin.

Penentuan kandungan fukoxantin menggunakan teknik HPLC

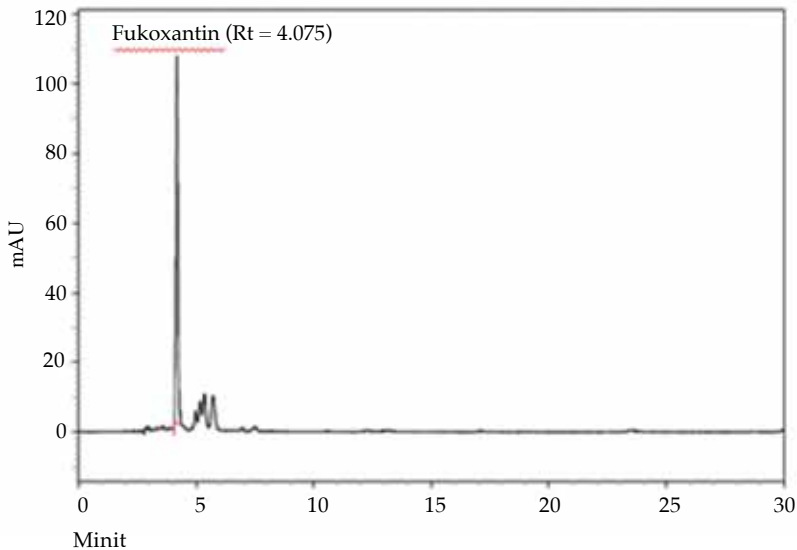
Pengekstrakan lipid dijalankan dalam keadaan malap bagi mengelakkan berlakunya degradasi karotenoid atau lipid. Serbuk *Sargassum muticum* diekstrak menggunakan pelarut metanol pada nisbah 1:10 (berat sampel/isi padu pelarut) dengan goncangan berterusan selama 24 jam. Hasil ekstrak dituras menggunakan kertas turas (Whatman No. 4). Residu (serbuk *Sargassum muticum*) diekstrak semula menggunakan metanol dengan mengulangi langkah di atas sehingga hasil ekstrak tidak berwarna. Hasil turasan dikumpul dan disejat menggunakan penyejat berputar (*rotary evaporator*) pada suhu 30 °C dan tekanan 556 mbar sehingga kering. Residu hijau pekat yang terhasil ditimbang, dilarutkan semula dalam metanol dan disimpan pada suhu -20 °C untuk analisis kandungan fukoxantin.

Fukoxantin boleh ditentukan menggunakan teknik kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) dan juga UV-spektrofotometer. Kaedah HPLC merupakan satu kaedah yang cepat dan jitu bagi penentuan fukoxantin secara kualitatif dan kuantitatif. Dalam kajian ini, penentuan kandungan fukoxantin menggunakan peralatan HPLC model Shimadzu yang dilengkapi dengan pengesan *photo diode array* dan sistem penyuntik automatik yang boleh diubah suai isi padunya. Pemisahan sampel menggunakan kolum pemisah jenis C18 (Genesis, saiz zarah 4 µm, 0.46 cm diameter dalaman x 25 cm panjang) manakala pelarut metanol dan asetonitril gred HPLC digunakan sebagai fasa gerak. Kedua-dua pelarut ini dituras terlebih dahulu menggunakan penuras membran 0.45 µm dan digetarkan menggunakan penggetar (*sonicator*) untuk menyingkirkan udara.

Fukoxantin ditentukan secara isokratik di mana fasa gerak yang digunakan ialah metanol-asetonitril (70:30, v/v) selama 30 minit pada aliran 1.0 ml/minit, suhu kolum pemisah 28 °C dan jarak gelombang ditetapkan pada 450 nm. Masa analisis yang diperlukan adalah selama 30 minit untuk mencuci kolum pemisah sebelum suntikan seterusnya. Puncak komponen fukoxantin dapat dikesan pada minit ke-4. Kandungan fukoxantin secara kuantitatif ditentukan berdasarkan pengesanan keluasan kawasan puncak komponen di dalam kromatogram dan graf kalibrasi diplotkan daripada siri kepekatan piawai fukoxantin. *Rajah 2* menunjukkan graf kalibrasi fukoxantin piawai manakala *Rajah 3* menunjukkan kromatogram pemisahan sebatian fukoxantin dalam rumpai laut *Sargassum muticum*. Fukoxantin hadir sebanyak 6.7 µg/g berat kering dalam *Sargassum muticum*.



Rajah 2. Graf kalibrasi fukoxantin piawai terbaik (bacaan R^2 menghampiri 1.0) menggunakan teknik HPLC



Rajah 3. Kromatogram HPLC bagi pemisahan sebatian fukoxantin dalam serbuk *Sargassum muticum*

Penentuan kandungan fukoxantin menggunakan teknik spektrofotometri

Kaedah spektrofotometri merupakan satu kaedah penentuan secara kualitatif dan kuantitatif yang mudah dan pantas. Namun, kaedah ini kurang jitu berbanding dengan kaedah HPLC. Kaedah ini sesuai digunakan untuk penyaringan komponen dalam kuantiti sampel yang banyak. Serbuk *Sargassum muticum* diekstrak menggunakan pelarut aseton pada nisbah 1:10 (berat sampel/isi padu pelarut) dengan goncangan berterusan selama dua jam pada suhu bilik dan dalam keadaan gelap bagi mengelakkan berlakunya degradasi karotenoid. Seterusnya pelarut metanol pada nisbah 1:10 (berat sampel/isi padu pelarut) dan dikacau selama 15 minit pada suhu bilik. Hasil ekstrak dituras menggunakan kertas

turas (Whatman No. 4) dan disejat menggunakan penyejat berputar (*rotary evaporator*) pada suhu 30 °C dengan tekanan 556 mbar sehingga kering. Residu pekat yang terhasil ditimbang, dilarutkan semula dalam metanol dan disimpan pada suhu -20 °C untuk analisis seterusnya. Penentuan kandungan fukoxantin dijalankan menggunakan *Spectro UV-Vis Double Beam PC Scanning Spectrophotometer* (Model UVD-2950; Labomed, USA) pada jarak gelombang 425 nm. Kandungan sebatian fukoxantin dalam sampel rumput laut diukur berdasarkan kecerunan graf kalibrasi piawai yang dibangunkan. Fukoxantin hadir sebanyak 6.2 µg/g berat kering dalam *Sargassum muticum*.

Kesimpulan

Penentuan fukoxantin di dalam rumput laut tempatan boleh dilaksanakan menggunakan dua jenis teknik iaitu kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) dan spektrofotometri. Kaedah spektrofotometri lebih mudah dan pantas berbanding dengan teknik HPLC. Namun, kaedah ini kurang jitu berbanding dengan kaedah HPLC. Kaedah ini sesuai digunakan bagi tujuan penyaringan komponen dalam kuantiti sampel yang banyak.

Penghargaan

Sekalung penghargaan buat kumpulan penyelidik dan ahli-ahli kumpulan kerja iaitu Nor Fadhillah Sapiee, Nur Ellyana Noordin dan Rahimah Mohd Zaki yang terlibat secara langsung dan tidak langsung dalam kajian ini. Projek ini disokong oleh dana Projek Wang Rezab MARDI (Kod Projek Utama TM2.8.13).

Bibliografi

- Dedi, N., Irwandi, J., Hamzah, M.S., Muhammad, T., Miyashita, K. dan Nazaruddin, R. (2011). Fucoxanthin extraction and fatty acid analysis of *Sargassum binderi* and *S. duplicatum*. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(11): 2,405 – 2,412
- Hii, S.L., Choong, P.Y., Woo, K.K. dan Wong, C.L. (2010). Stability studies of fucoxanthin from *Sargassum binderi*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4(10): 4,580 – 4,584
- Peng, J., Yuan, J.P., Wu, C.F. dan Wang, J.H. (2011). Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine Drugs* 9: 1,806 – 1,828
- Wu, H.Y., Lim, S.J., Wan Aida, W.M., Mohamad Yusof, M. dan Mamot, S. (2014). Characterisation and stability of pigments extracted from *Sargassum binderi* obtained from Semporna, Sabah. *Sains Malaysiana* 43(9): 1,345 – 1,354
- Zailanie, K. dan Purnomo, H. (2011). Fucoxanthin content of five species brown seaweed from Talango District, Madura Island. *Journal of Agricultural Science and Technology* 1: 1,103 – 1,105
- Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., Kong, R., Han, C. dan Liu, Z. (2015). Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: 1 – 10

Ringkasan

Rumpai laut kaya dengan pigmen warna yang terdiri daripada komponen aktif yang bertindak sebagai bahan antioksidan. Antara komponen aktif rumpai laut ialah fukoxantin yang mempunyai kesan farmakologi terhadap kesihatan manusia. Fukoxantin adalah sejenis karotenoid yang terdapat secara semula jadi dalam rumpai laut perang yang boleh dimakan seperti *Sargassum muticum*. Pengekstrakan pigmen dijalankan menggunakan pelarut polar dan pigmen boleh dianalisis menggunakan teknik kromatografi cecair berprestasi tinggi (HPLC) dan spektrofotometri pada jarak gelombang tertentu. Kaedah HPLC merupakan satu kaedah yang cepat dan jitu bagi penentuan fukoxantin secara kualitatif dan kuantitatif. Manakala kaedah spektrofotometri juga dapat menentukan kandungan fukoxantin secara kualitatif dan kuantitatif dengan mudah dan pantas. Namun, kaedah ini kurang jitu berbanding dengan kaedah HPLC. Kaedah ini sesuai digunakan bagi tujuan penyaringan komponen dalam kuantiti sampel yang banyak.

Summary

Seaweed is rich in colour pigments consist of active components that act as antioxidants. The active components of seaweed such as fucoxanthin has pharmacological effects on human health. Fucoxanthin is a carotenoid found naturally in brown edible seaweed such as *Sargassum muticum*. Pigment extraction was carried out using polar solvents and the pigments were analysed using high performance liquid chromatography and spectrophotometry at specific wavelengths. HPLC technique is a prompt and precise method to determine fucoxanthin qualitatively and quantitatively. Meanwhile, the spectrophotometry method could also determine fucoxanthin content qualitatively and quantitatively in a rapid way. However, it is less precise than the HPLC method. This method is much suitable to be used in screening components in large quantities.

Pengarang

Hasnisa Hashim

Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM 43400 Serdang, Selangor

E-mel: hasnisa@mardi.gov.my

Tun Nurbrillinda Mokhtar, Sharizan Ahmad dan Norra Ismail

Pusat Penyelidikan Sains Teknologi Makanan, Ibu Pejabat MARDI,
Persiaran MARDI-UPM 43400 Serdang, Selangor