

4. PEMBAHASAN

Oleoresin adalah komponen dari rempah yang merupakan penciri rasa dan flavor. Secara umum oleoresin diperoleh dari hasil ekstraksi tepung rempah dengan menggunakan pelarut organik. Oleoresin pala merupakan campuran minyak atsiri, resin, mentega pala dan senyawa warna (Assagaf, *et al.*, 2012). Kandungan minyak esensial pada oleoresin memberi aroma khas dan resin akan membentuk citarasa khas dari bahan asal (Rodianawati *et al.*, 2015). Oleoresin memiliki banyak keuntungan. Keuntungan oleoresin yakni lebih higienis, aroma dan flavor lebih kuat, lebih stabil dalam masa penyimpanan, umur simpan panjang, dan lebih aman dari mikroba perusak (Khasanah *et al.*, 2016). Biji pala dapat diekstrak menjadi oleoresin (Nurdjannah, 2007). Oleoresin pala diperoleh melalui proses ekstraksi dengan pelarut organik. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini yakni etanol. Etanol salah satu pelarut organik yang banyak dimanfaatkan karena memiliki polaritas yang tinggi dan aman jika dikonsumsi oleh konsumen (Sumbono, 2019; Lestario, 2017). Etanol juga mampu menarik pigmen pada bahan yang diekstrak (Aziz *et al.*, 2009). Proses ekstraksi oleoresin pala ini menggunakan metode *ultrasound-assisted extraction* (UAE). Penggunaan metode ini memiliki banyak keuntungan seperti kontak yang efisien antara bahan dengan pelarut serta bisa meminimalkan waktu ekstraksi dan mengurangi penggunaan pelarut organik jika dibandingkan *soxhlet*. Keuntungan lain sistem UAE yakni ukuran sampel yang berbeda-beda dapat digunakan, beberapa proses ekstraksi dapat dilakukan bersamaan, dan tidak memerlukan peralatan laboratorium khusus (Martínez, 2009).

Pada penelitian ini menggunakan pengaruh suhu, waktu, dan rasio. Suhu sangat mempengaruhi ekstraksi. Suhu yang tinggi akan menaikkan efisiensi dari ekstraksi namun jika suhu terlalu tinggi proses ekstraksi tidak efisien (Charpe dan Rathod, 2016). Waktu ekstraksi yang semakin lama, oleoresin yang didapat semakin banyak namun jika terlalu lama maka hasil oleoresin akan menurun dikarenakan terjadinya penguapan (Bustan *et al.*, 2008). Pemilihan waktu ekstraksi dipengaruhi dari sistem *ultrasound-assisted extraction*. Pada sistem *ultrasound-assisted extraction* memerlukan waktu yang lebih pendek dibanding proses ekstraksi biasa. Hal ini disebabkan adanya proses kavitasi saat ekstraksi berlangsung (Sani *et al.*, 2014). Rasio yang digunakan

harus sesuai dengan jumlah pelarut yang digunakan. Rasio harus konstan antara bahan padat dengan *solvent* (Capelo-Martine, 2009). Hasil ekstraksi dengan *ultrasound-assisted extraction* akan dipisahkan dengan *vacuum rotary evaporator*. Pelarut akan teruapkan dan terperangkap dalam kondensor. Pelarut dalam kondensor kemudian akan ditampung dalam labu penampung dibawah kondensor. Pelarut yang tertampung dapat digunakan kembali atau dibuang dengan perlakuan tertentu (Monk, 2004). Batas akhir evaporasi dilihat dari kondensor yang sudah tidak mendinginkan pelarut.

Response Surface Methodology (RSM) merupakan kumpulan metode statistik dan matematika yang bermanfaat untuk mengembangkan, meningkatkan, dan mengoptimalkan proses. Pengaplikasian RSM banyak digunakan dalam dunia industri dimana RSM digunakan untuk menganalisa perlakuan yang mempengaruhi kinerja atau karakteristik hasil produk atau proses. Kinerja atau karakteristik disebut sebagai respon. Perlakuan yang digunakan disebut sebagai variabel independen yang dikontrol oleh pelaku untuk keperluan tes atau percobaan. Hasil analisa RSM akan ditampilkan dalam bentuk grafik 3 dimensi yang menunjukkan respon dari perlakuan yang diterapkan (Myers *et al.*, 2009).

4.1. Analisa Rendemen

Analisa rendemen dihitung dengan menggunakan rumus. Rumus yang digunakan dengan membagi hasil oleoresin dalam ml dengan berat awal sampel dalam gram kemudian dikalikan 100%. (Anggraini *et al.*, 2018). Pada analisa rendemen ini ditampilkan dalam grafik 3 dimensi. Grafik yang didapat berupa grafik perlakuan suhu-rasio, suhu-waktu, dan waktu-rasio. Pada perlakuan ini terlihat grafik 3 dimensi membentuk grafik maksimum. Grafik maksimum menunjukkan bahwa titik maksimum berada dalam lingkup penelitian (Bezerra *et al.*, 2008). Suhu, waktu, dan rasio mempengaruhi hasil oleoresin. Jika suhu yang digunakan tinggi maka akan menaikkan efisiensi dari ekstraksi sehingga hasil yang didapat semakin banyak. Namun jika suhu terlalu tinggi proses ekstraksi tidak efisien (Charpe dan Rathod, 2016). Pada grafik suhu – waktu dan suhu – rasio terlihat suhu yang terlalu tinggi menurunkan hasil ekstraksi sehingga hasil yang didapat tidak optimal. Waktu ekstraksi juga mempengaruhi hasil ekstraksi. Jika semakin lama waktu ekstraksi maka oleoresin yang

didapat semakin banyak namun jika terlalu lama maka hasil akan menurun dikarenakan terjadinya penguapan (Bustan *et al.*, 2008). Pada grafik suhu – waktu dan waktu – rasio memperlihatkan waktu paling lama yang digunakan menghasilkan hasil oleoresin yang lebih sedikit. Hal ini menunjukkan bahwa adanya penguapan yang terjadi pada oleoresin. Selain itu, perlakuan rasio yang digunakan harus sesuai dengan jumlah pelarut yang digunakan. Rasio harus konstan antara bahan padat dengan *solvent* (Capelo-Martine, 2009). Pada grafik suhu – rasio dan waktu – rasio menunjukkan bahwa rasio tertinggi tidak menghasilkan oleoresin yang optimal. Rasio bubuk pala yang terlalu tinggi menyebabkan pelarut sulit untuk menarik semua senyawa oleoresin. Oleoresin pala yang diekstraksi dengan metode maserasi memperoleh oleoresin sebanyak $20,07 \pm 0,23\%$ dalam berat kering (Assagaf, *et al.*, 2012). Pada hasil analisa rendemen menunjukkan hasil tertinggi sebanyak 30,4%. Menurut Najib (2018), etanol bukan hanya melarutkan oleoresin melainkan juga senyawa lain yang terkandung dalam sampel, kemungkinan sampel ekstrak juga mengandung senyawa lain yang tidak diinginkan sehingga didapatkan hasil yang tinggi. Selain pengaruh dari pelarut, metode ekstraksi dengan sistem *ultrasound-assisted extraction* juga berpengaruh. Pada tulisan Sani *et al* (2014), rendemen yang tinggi diperoleh karena ada proses kavitasi saat gelombang ultrasonik memecah dinding sel. Kavitasi merupakan proses pembentukan gelembung-gelembung mikro (*microbubbles*) akibat peningkatan tekanan pada saat ekstraksi sebagai akibat dari adanya gelombang ultrasonik. Gelembung yang terbentuk tidak stabil sehingga mudah pecah ketika gelembung tersebut mencapai volume maksimal sehingga tidak mampu menyerap energi lagi. Efek mekanik dari metode *ultrasound-assisted extraction* meningkatkan penetrasi pelarut kedalam sel bahan serta meningkatkan transfer massa (Sani *et al.*, 2014). Pengotor yang terikut juga dapat meningkatkan hasil ekstraksi.

Pareto yang didapat menunjukkan bahwa rasio dan suhu mempengaruhi hasil rendemen. Pareto digunakan untuk menunjukkan tingkat kecocokan data hasil analisa dengan variabel yang digunakan (Chotikapanich, 2008). Pareto yang ditampilkan menunjukkan suhu, waktu, dan rasio sangat mempengaruhi hasil dimana data yang didapat sangat signifikan. Uji ANOVA merupakan prosedur uji yang didasarkan pada penguraian total variabilitas dalam variabel respon. Uji ANOVA digunakan untuk menentukan hubungan linier antara respon variabel dan subset dari variabel regresi. Jika variabel

tidak memberikan efek maka variabel tersebut tidak signifikan terhadap respon (Myers et al., 2009). ANOVA dan pareto chart digunakan untuk menunjukkan variabel penting (Pambi dan Musonge, 2016). Pada hasil ANOVA menunjukkan bahwa suhu, waktu, dan rasio mempengaruhi hasil ekstraksi.

Pada RSM diperlukan pengembangan model perkiraan untuk permukaan respon yang sesungguhnya. Permukaan respon yang sesungguhnya didorong oleh beberapa mekanisme fisik yang tidak diketahui. Model aproksimasi didasarkan pada data yang diamati dari proses atau sistem yang disebut model empiris. Regresi merupakan kumpulan teknik statistik yang bermanfaat untuk membangun jenis empiris yang diperlukan RSM. Regresi membandingkan beberapa variabel independen sebagai variabel predador atau regresor (Myers et al., 2009). Regresi digunakan untuk mengetahui hubungan antar variabel. Pada analisa 3 variabel dengan RSM persamaan yang digunakan yakni $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_1^2X_1^2 + b_2^2X_2^2 + b_3^2X_3^2$ (Lee et al., 2006). Tabel regresi yang diperoleh kemudian diolah menjadi persamaan regresi untuk analisa %rendemen. Persamaan yang didapat yakni $Y = -282,901 + 8,724X_1 + 3,915X_2 + 3,377X_3 - 0,023X_1X_2 - 0,020X_1X_3 - 0,011X_2X_3 - 0,074X_1^2 - 0,034X_2^2 - 0,140X_3^2$.

4.2. Analisa Fenol

Pengujian aktivitas total fenol merupakan dasar pengujian aktivitas antioksidan, karena senyawa fenolik mampu untuk mencegah terjadinya proses oksidasi. Pengukuran total antioksidan bahan pangan dapat dilakukan dengan mengukur kadar total fenolik menggunakan reagen Folin-ciocalteau. Uji total fenol digunakan untuk menentukan total senyawa fenolik yang terkandung di dalam sampel, sehingga bila kandungan senyawa fenolik di dalam sampel tinggi maka aktivitas antioksidannya akan tinggi. Analisis ini menggunakan kurva standar asam galat sebagai pembanding (Djapiala et al., 2013). Senyawa fenol berkontribusi secara langsung terhadap aktivitas antioksidan. Korelasi positif antara aktivitas antioksidan dan total fenolik berasal dari efektivitas donor hidrogen dalam senyawa fenol. Ada hubungan antara kemampuan senyawa fenol sebagai antioksidan dan struktur kimianya. Konfigurasi dan total gugus hidroksil merupakan dasar yang sangat mempengaruhi mekanisme aktivitasnya sebagai

antioksidan. Terdapat korelasi positif antara aktivitas antioksidan dengan kandungan senyawa polifenol. Senyawa fenol merupakan senyawa yang bersifat antioksidan (Ibrahim *et al.*, 2015). Senyawa antioksidan sendiri tidak tahan terhadap suhu panas dan akan rusak saat terkena panas (Sie, 2013).

Total fenolik dianalisa dengan spektrofotometer dengan metode Folin–Ciocalteu. Pemilihan metode Folin-Ciocalteu dikarenakan metode ini mudah dilakukan, tidak memerlukan peralatan khusus, dan data yang dihasilkan lebih sebanding (Singleton *et al.*, 1999). Sampel oleoresin diambil sebanyak 0,1 gram dan diencerkan hingga 50 ml dengan metanol. Kemudian sampel hasil pengenceran disonikasi selama 10 menit. Setelah itu, sampel di saring. Larutan folin-ciocalteu dan natrium karbonat dipersiapkan. Larutan folin diperoleh dari mengencerkan 1 ml folin kedalam 10 ml aquades. Larutan natrium karbonat diperoleh dari melarutkan 7,5 gram natrium karbonat kedalam 100 ml aquades. Kemudian 0,5 ml sampel diambil dan dicampur dengan 2 ml larutan folin dan 4 ml larutan natrium karbonat 7,5%. Setelah 5 menit, ditambahkan kembali 2,0 ml larutan natrium karbonat (7,5%). Setelah itu larutan disimpan dalam ruang gelap selama 1 jam. Absorbansi diukur pada 760 nm. Asam galat digunakan sebagai standar, dan hasilnya dinyatakan sebagai miligram gallic acid equivalent (GAE) per gram ekstrak (Santos *et al.*, 2015).

Grafik analisa fenol yang ditampilkan merupakan respon fenol terhadap perlakuan suhu, waktu, dan rasio. Pada semua grafik, grafik membentuk grafik maksimum. Pada analisa fenol menunjukkan kondisi optimal berada ditengah grafik. Grafik maksimum menunjukkan bahwa perlakuan optimal berada dalam lingkup penelitian (Bezerra *et al.*, 2008). Senyawa fenol merupakan senyawa yang bersifat antioksidan (Ibrahim *et al.*, 2015). Senyawa antioksidan tidak tahan terhadap suhu panas dan akan rusak saat terkena panas (Sie, 2013). Perlakuan suhu optimal yang digunakan pada penelitian ini tidak tinggi pada suhu 50°C sehingga kandungan fenol yang terekstrak tidak rusak. Uji ANOVA ini digunakan untuk menentukan hubungan linier antara respon variabel dan subset dari variabel regresi. Jika variabel tidak memberikan efek maka variabel tersebut tidak signifikan terhadap respon (Myers *et al.*, 2009). ANOVA dan *pareto chart* digunakan untuk menunjukkan variabel penting (Pambi dan Musonge, 2016). Pada

ANOVA dan pareto ditunjukkan bahwa suhu, waktu, dan rasio yang digunakan signifikan. Regresi merupakan kumpulan teknik statistik yang bermanfaat untuk membangun jenis empiris yang diperlukan RSM. Regresi membandingkan beberapa variabel independen sebagai variabel predador atau regresor (Myers *et al.*, 2009). Regresi digunakan untuk mengetahui hubungan antar variabel. Pada analisa 3 variabel dengan RSM persamaan yang digunakan yakni $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_1^2X_1^2 + b_2^2X_2^2 + b_3^2X_3^2$ (Lee *et al.*, 2006). Persamaan total fenolik yang diperoleh yakni $Y = -755,031 + 22,684X_1 + 14,839X_2 + 1,517X_3 - 0,022X_1X_2 + 0,202X_1X_3 - 0,052X_2X_3 - 0,247X_1^2 - 0,177X_2^2 - 0,443X_3^2$.

4.3. Analisa Antioksidan

Senyawa fenol berkontribusi secara langsung terhadap aktivitas antioksidan. Korelasi positif antara aktivitas antioksidan dan total fenolik berasal dari efektivitas donor hidrogen dalam senyawa fenol. Ada hubungan antara kemampuan senyawa fenol sebagai antioksidan dan struktur kimianya. Konfigurasi dan total gugus hidroksil merupakan dasar yang sangat mempengaruhi mekanisme aktivitasnya sebagai antioksidan. Terdapat korelasi positif antara aktivitas antioksidan dengan kandungan senyawa polifenol. Senyawa fenol merupakan senyawa yang bersifat antioksidan (Ibrahim *et al.*, 2015). Senyawa antioksidan tidak tahan terhadap suhu panas dan akan rusak saat terkena panas (Sie, 2013). Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa ekstrak untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan persen penghambatan (Purwanto *et al.*, 2014). DPPH merupakan komponen radikal bebas sintetis dan bersifat stabil. DPPH dapat digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan dalam sampel. DPPH dalam larutan metanol akan memberikan efek warna ungu yang dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 515-517 nm. Aktivitas antioksidan diukur melalui besarnya penurunan intensitas warna ungu larutan DPPH setelah ditambahkan komponen antioksidan. Aktivitas antioksidan tersebut dinyatakan sebagai aktivitas penangkapan radikal DPPH atau aktivitas *antiradical* DPPH (Rauf *et al.*, 2011). Pada pengujian ini, sampel yang digunakan yakni larutan sampel untuk analisa fenol. Larutan hasil penyaringan dalam uji fenol (1000 ppm) diturunkan terlebih dahulu menjadi 100 ppm. Larutan sampel diambil 1 ml dan ditambahkan dengan 9 ml larutan DPPH. Campuran kemudian diinkubasi selama 1 jam

dalam ruang gelap. Kemudian campuran diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Pada pengujian ini dibutuhkan blanko. Blanko yang digunakan terdiri dari metanol dan larutan DPPH tanpa melalui proses inkubasi. Hasil spektrofotometri yang diperoleh kemudian dihitung dengan mengurangi absorbansi blanko dengan absorbansi sampel kemudian dibagi absorbansi blanko dan dikali 100% (Rauf *et al.*, 2011; Gulcin, 2005). Larutan DPPH sangat peka terhadap cahaya (Hasanah *et al.*, 2017).

Pada grafik aktivitas antioksidan ditunjukkan bahwa grafik yang terbentuk membentuk grafik maksimum. Grafik maksimum menunjukkan titik optimal berada pada lingkup penelitian (Bezerra *et al.*, 2008). Senyawa antioksidan tidak tahan terhadap suhu panas dan akan rusak saat terkena panas (Sie, 2013). ANOVA dan pareto chart digunakan untuk menunjukkan variabel penting (Pambi dan Musonge, 2016). Pada hasil pareto terlihat variabel waktu dan rasio merupakan variabel yang penting karena hasil pareto yang ditampilkan signifikan. Selain itu pada hasil ANOVA juga terlihat bahwa waktu dan rasio juga yang signifikan dengan ditunjukkan melalui warna merah. Pada analisa ini seharusnya suhu yang menunjukkan signifikansi karena antioksidan tidak tahan terhadap panas (Sie, 2013). Hasil yang didapat menunjukkan perlakuan waktu dan rasio yang signifikan. Regresi merupakan kumpulan teknik statistik yang bermanfaat untuk membangun jenis empiris yang diperlukan RSM. Regresi membandingkan beberapa variabel independen sebagai variabel predator atau regresor (Myers *et al.*, 2009). Regresi digunakan untuk mengetahui hubungan antar variabel. Pada analisa 3 variabel dengan RSM persamaan yang digunakan yakni $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_1^2X_1^2 + b_2^2X_2^2 + b_3^2X_3^2$ (Lee *et al.*, 2006). Persamaan regresi aktivitas antioksidan yang diperoleh yakni $Y = -742,355 + 18,393X_1 + 14,919X_2 + 6,759X_3 - 0,050X_1X_2 - 0,014X_1X_3 - 0,015X_2X_3 - 0,162X_1^2 - 0,161X_2^2 - 0,218X_3^2$.

4.4. Critical Value

Critical value ditentukan melalui grafik 3 dimensi yang diperoleh melalui hasil analisa RSM. *Critical value* diperoleh dari fungsi polinomial untuk memperoleh persamaan kuadrat. *Critical value* dapat diperoleh jika grafik berbentuk maksimum, minimum, dan saddle. *Critical point* diperoleh melalui derivasi pertama dari fungsi matematika yang

menggambarkan permukaan respons dan menyamakan hingga nol (Bezerra *et al.*, 2008).

Pada hasil analisa rendemen grafik 3 dimensi yang ditampilkan berbentuk maksimum pada semua perlakuan. Bentuk grafik 3 dimensi yang maksimum menunjukkan titik optimal berada dalam lingkup penelitian (Bezerra *et al.*, 2008). Pada analisa ANOVA terlihat variabel yang signifikan yakni variabel suhu dan rasio. Hasil analisa *critical values* menunjukkan suhu, waktu, dan rasio optimal. Suhu terbaik pada suhu 52,04°C selama 38,42 menit dengan rasio sebanyak 6,66%. Pada hasil analisa fenol terlihat grafik 3 dimensi yang terbentuk maksimum. Pada grafik Pada grafik maksimum titik optimal berada dalam lingkup penelitian (Bezerra *et al.*, 2008). Pada hasil ANOVA dan pareto terlihat variabel suhu, waktu, dan rasio yang memberikan pengaruh pada hasil fenol. Hasil analisa *critical values* menunjukkan suhu, waktu, dan rasio optimal. Suhu terbaik pada suhu 48,56°C selama 37,31 menit dengan rasio sebanyak 10,59%. Pada hasil analisa antioksidan menunjukkan grafik 3 dimensi maksimum. Pada grafik maksimum titik optimal dapat ditentukan karena berada dalam lingkup penelitian (Bezerra *et al.*, 2008). Pada hasil ANOVA dan pareto terlihat variabel waktu dan rasio memberikan pengaruh terhadap hasil antioksidan. Hasil analisa *critical values* menunjukkan suhu, waktu, dan rasio optimal. Suhu terbaik pada suhu 50,3°C selama 37,91 menit dengan rasio sebanyak 12,68%.

4.5. Analisa GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry)

Gas chromatography mass spectrometry digunakan untuk menganalisa senyawa volatil dalam suatu campuran. Senyawa akan melalui kapiler silika kemudian dianalisa senyawa yang terkandung berada pada suatu area (Hubschmann, 2015). Hasil analisa menunjukkan kandungan tertinggi dalam oleoresin pala yakni *1,3-Benzodioxole, 5-(2-propenyl)- (CAS)*, lalu diikuti *Adamantane-1-carboxylic acid (2-methyl-4-thiocyanatophenyl)-amide, 3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)- (CAS)*, dan *trans Sabinene hydrate*. Senyawa *1,3-Benzodioxole, 5-(2-propenyl)- (CAS)* memiliki nama lain *safrole*. Pada oleoresin pala terkandung *Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS)* yang memiliki nama lain asam miristat. Biji pala (*Myristica fragrans*) mengandung penilpropana yang tersusun atas *myristicin (50%-75%), safrole, eugenole, elernicin*, dan

THC / Trepene Hydrocarbon (α -pinene, limonene, dan p -cymene). Pala juga mengandung *trepene alcohols*, geraniol, borneol, linalool, dan *trepineol* dalam konsentrasi rendah (Wagner dan Bladt, 2011). Pada oleoresin pala yang terekstraksi menunjukkan kandungan *safrole* dan *sabinene*. Menurut Maya *et al* (2004), ekstrak pala mengandung *myristicin*, *elemicin*, *safrole*, dan *sabinene*. Safrole terkandung pada minyak atsiri pala. Biji pala yang diperoleh dari Papua memiliki kandungan safrol yang tinggi sedangkan biji pada dari India Timur tinggi kandungan *myristicin* dan India Barat tinggi kandungan *elemicin* (Assagaf, *et al.*, 2012). Perbedaan biji pala yang digunakan akan mempengaruhi kandungan dalam biji pala. Kandungan *myristicin* yang rendah disebabkan *myristicin* larut pada pelarut non polar sedangkan pelarut etanol termasuk pelarut polar sehingga yang terekstrak sedikit (Peter, 2012). *Myristicin* sendiri bersifat sedikit larut etanol sehingga yang terlarut dalam oleoresin sedikit (PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Myristicin>).

