

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Rumput laut (*seaweed*) merupakan tumbuhan di perairan laut dan sangat berpotensi sebagai salah satu sumber pangan alternatif. Rumput laut memiliki nilai kandungan nutrisi yang tinggi, antara lain mineral, vitamin, serat, dan senyawa antioksidan (Yan dan Chuda, 1999). Rumput laut terbagi menjadi 3 kelompok besar berdasarkan struktur kimia serta distribusi pigmennya, yaitu rumput laut cokelat (*Phaeophyta*), rumput laut hijau (*Chlorophyta*), dan rumput laut merah (*Rhodophyta*) (Mabeau dan Fleurence, 1993). Dari ketiga kelompok tersebut, rumput laut cokelat merupakan rumput laut yang cukup banyak dijumpai dan memiliki kandungan nutrisi yang tinggi.

Rumput laut cokelat memiliki beberapa kandungan senyawa bioaktif, salah satunya adalah fukosantin. Fukosantin merupakan senyawa yang paling banyak dimanfaatkan dibandingkan senyawa lain yang terkandung di dalam rumput laut cokelat. Fukosantin merupakan salah satu senyawa pigmen terpenting di dalam rumput laut cokelat dan menyumbang kurang lebih 10 persen dari total produksi karotenoid (Rohim *et al.*, 2019). Fukosantin yang terkandung dalam berbagai spesies rumput laut cokelat memiliki karakteristik yang sama namun berbeda konsentrasinya. Fukosantin sendiri sangat mudah terdegradasi oleh faktor eksternal, antara lain yaitu panas, pH, dan paparan cahaya (Defiana, 2013). Selain fukosantin, terdapat juga beberapa senyawa bioaktif penting lain yang terkandung di dalam rumput laut cokelat, antara lain polifenol, antioksidan, florotanin, dan berbagai senyawa bioaktif lainnya (Rohim dan Estiasih, 2019).

Rumput laut coklat sendiri terbagi menjadi beberapa spesies, salah satunya *Sargassum* sp.. Genus *Sargassum* termasuk salah satu kelas dari rumput laut coklat (*Phaeophyceae*) yang terdiri dari kurang lebih 400 spesies. Spesies-spesies ini banyak dijumpai dan ditemukan di perairan Indonesia. *Sargassum* sp. pada umumnya memiliki talus sekitar 35 cm serta berwarna coklat kekuningan. *Sargassum* sp. mengandung banyak senyawa bioaktif yang didominasi oleh fukosantin, polifenol, antioksidan, fukoidan, alginat, fukosterol, *meroditerpenoid*, dan *gentisic acid* (Rohim dan Estiasih, 2019).

Dengan berbagai potensi senyawa bioaktif yang terkandung di dalam *Sargassum* sp., maka perlu dilakukan ekstraksi untuk memperoleh ekstrak senyawa yang dapat diketahui konsentrasinya dan potensinya untuk dimanfaatkan lebih lanjut. Ekstraksi senyawa pada *Sargassum* sp. dapat dilakukan dengan berbagai metode, salah satunya dengan bantuan gelombang ultrasonik atau biasa disebut *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). UAE adalah salah satu metode ekstraksi yang cepat, sederhana dan efisien dibandingkan dengan ekstraksi konvensional dan telah diterapkan untuk mengekstraksi senyawa bioaktif karena reproduksibilitasnya yang tinggi, dapat diterapkan pada berbagai ukuran sampel, serta mengurangi waktu yang dibutuhkan untuk melakukan ekstraksi yang sangat efisien (Moorthy *et al.*, 2017). Selain metode ekstraksi, ukuran partikel, jenis, dan rasio solven yang tepat dalam ekstraksi juga diperlukan agar diperoleh ekstrak secara maksimal dari segi kualitas maupun kuantitasnya. Tabel 1 menunjukkan berbagai penelitian yang telah dipublikasikan tentang berbagai variasi kondisi ekstraksi senyawa bioaktif *Sargassum* sp. antara lain total fenol, fukosantin, florotanin, dan karotenoid.

Tabel 1. Kondisi Ekstraksi *Sargassum sp.*

No	Pelarut	Senyawa Bioaktif	Ekstraksi				Referensi	
			Suhu ekstraksi (°C)	Waktu (jam)	Ukuran partikel (mm)	Rasio		Konsentrasi
1	Metanol 50%	Fenol Fukosantin	40	3	---	---	0,08-0,743% db 14,246-152,465 µg/g db	(Lann <i>et al.</i> , 2012)
2	Etanol 80%	Fukosa Asam Uronat Sulfat	100	4	---	---	13,48-22,67% 7,18-12,80% 15,94-25,81%	(Jin <i>et al.</i> , 2014)
3	Etanol	Total Fenol	37	4,5	300x200	1: 12,5	17 dan 0,9 mg CE/g db 0,006-0,65 g PGE/100 g	(Zahra <i>et al.</i> , 2007)
4	Metanol	Total Fenol	40	1	---	1 : 10	(sitoplasma) 6,72-21,99g PGE/100 g (terikat membran)	(Budhiyanti <i>et al.</i> , 2012)
5	Etanol 96%	Polifenol Florotanin Klorofil a	---	4	5-10	1 :9,375	---	(Islami, Ridlo dan Pramesti, 2014)
6	Metanol	Karotenoid Total Fenol	40	24	±10	---	2,84 mg/g 2,63 µmol/g 57,97 mgGAE/g	(Sedjati <i>et al.</i> , 2018)
7	Etanol 50%	Total Fenol	---	---	2,00 dan 0,25	---	0,8601±0,0387 mgGAE/g 0,9024±0,0167 mgGAE/g	(Norra, Aminah dan Suri, 2016)
8	Metanol	Total Fenol	100	---	0,5	---	172,7±3,4 mgGAE/g	(Savaghebi, Barzegar dan Mozafari, 2020)
9	---	---	70	3-4	125	1:20	---	(Azizi <i>et al.</i> , 2014)

Keterangan :

--- : Tidak dijelaskan

Pada Tabel 1., dapat kita lihat bahwa penggunaan berbagai kondisi ekstraksi yang berbeda seperti jenis pelarut, konsentrasi pelarut, suhu, waktu, ukuran partikel, serta rasio bahan dengan pelarut menghasilkan konsentrasi senyawa ekstrak yang bervariasi. Maka dari itu, sangat diperlukan optimasi kondisi dalam ekstraksi *Sargassum* sp. agar diperoleh ekstrak secara maksimal.



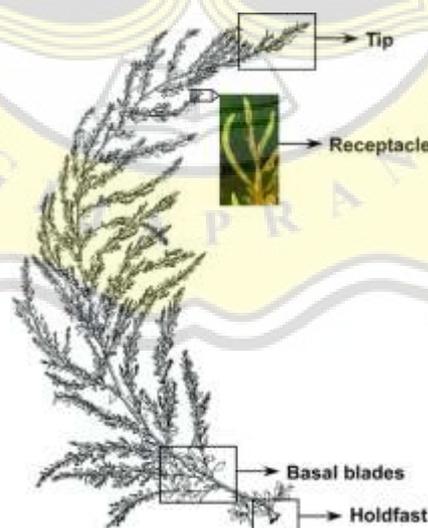
1.2. Tinjauan Pustaka

1.2.1. Rumput Laut Cokelat

Rumput laut cokelat cukup banyak dijumpai dan memiliki kandungan nutrisi yang tinggi. Rumput laut cokelat memiliki beberapa kandungan senyawa bioaktif, salah satunya adalah fukosantin. Selain fukosantin, terdapat juga beberapa senyawa bioaktif penting lain yang terkandung di dalam rumput laut cokelat, antara lain polifenol, antioksidan, florotanin, dan berbagai senyawa bioaktif lainnya (Rohim dan Estiasih, 2019). Rumput laut cokelat juga memiliki banyak manfaat kesehatan antara lain sebagai anti kanker, anti obesitas, anti tumor, dan sebagian besar tentang fungsi utama sebagai antioksidan (Fung *et al.*, 2013).

1.2.1.1. *Sargassum sp*

Genus *Sargassum* termasuk salah satu kelas dari rumput laut cokelat (*Phaeophyceae*) yang terdiri dari kurang lebih 400 spesies. Genus *Sargassum* termasuk famili *Sargassaceae*, ordo *Fucales*, kelas *Phaeophyceae*, dan subkelas *Cyclosporeae*. Spesies-spesies ini banyak dijumpai dan ditemukan di perairan Indonesia. *Sargassum sp.* kaya dengan berbagai jenis senyawa bioaktif yang penting untuk pencegahan maupun terapi berbagai penyakit (Rohim *et al.*, 2019).



Gambar 1. *Sargassum sp.*

.(Serebryakova *et al.*, 2018)

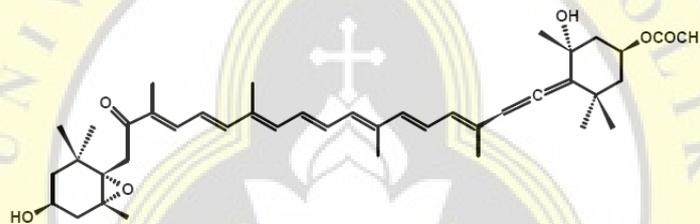
Sargassum sp. pada umumnya memiliki talus sekitar 35 cm serta berwarna coklat kekuningan. Holdfast pada *Sargassum* sp. berbentuk *berrhizoid*, *discoid*, atau *axis* silindris. *Sargassum* sp. ini memiliki talus berbentuk vesikel atau batang. Vesikel pada talus berbentuk oval kecil. Spesies-spesies *Sargassum* yang umum digunakan dalam industri antara lain:

- *Sargassum kjellmaniarum* (Cho *et al.*, 2011) sebagai bahan pangan dan obat-obatan.
- *Sargassum polycstum* (Mohamed *et al.*, 2012) sebagai bahan pangan dan obat-obatan.
- *Sargassum ilicifolium* dan *Sargassum binderi* (Nursid *et al.*, 2013). sebagai bahan pangan dan obat-obatan.
- *Sargassum fulvellum* (Matsumoto, Hosokawa dan Matsukawa, 2010) sebagai bahan pangan dan dikonsumsi secara langsung.
- *Sargassum silquastrum* (Kim *et al.*, 2010) sebagai obat karena kandungan senyawa bioaktif yang tinggi.
- *Sargassum fusiformis* (Hashimoto *et al.*, 2009) sebagai bahan pangan dan obat-obatan.
- *Sargassum horneri* (Miyashita, 2009) sebagai bahan pangan.
- *Sargassum cristaefolium* (Eko, 2013) sebagai bahan pangan.

Sargassum sp. mengandung banyak senyawa bioaktif yang meliputi florotanin, *terpenoid*, *chromene*, derivat *tetraprenyltoluquinol*, fukosantin, fukoidan, alginat, asam fenolat, katekin, kuersetin, fukosterol, stigmasterol, β -sitosterol, feofitin A, dan *sulfoquinovosyldiacylglycerol*. Florotanin, fukosantin, fukoidan, alginat, fukosterol, *meroditerpenoid*, dan *gentisic acid* adalah senyawa beberapa bioaktif dominan dalam *Sargassum* sp. *Meroditerpenoid* merupakan senyawa bioaktif khas dalam *Sargassum* sp., yang tidak diproduksi oleh genus rumput laut lainnya. Senyawa *meroditerpenoid* dalam *Sargassum* sp. terdiri dari rantai poliprenil yang terikat pada bagian *p-benzoquinon* maupun hidroquinon. Variasi struktur meroditerpenoid terutama terjadi pada rantai samping terpena dan termasuk penambahan ikatan rangkap eksosiklik, asam karboksilat, alkohol, atau gugus fungsi aldehida (Rohim *et al.*, 2019).

1.2.2. Fukosantin

Fukosantin merupakan salah satu senyawa pigmen terpenting di dalam rumput laut cokelat dan menyumbang kurang lebih sekitar 10 persen dari total produksi karotenoid (Rohim *et al.*, 2019). Fukosantin merupakan salah satu jenis senyawa hidrokarbon karotenoid. Fukosantin memiliki rumus bangun $C_{42}H_{58}O_6$, berwarna *orange* dan memiliki tujuh ikatan rangkap (Eko, 2013). Fukosantin sendiri sangat mudah terdegradasi oleh faktor eksternal, antara lain yaitu panas, pH, dan paparan cahaya (Defiana, 2013). Fukosantin merupakan pigmen utama pada *Sargassum* sp dan dominan terletak di bagian plastida pada talus (Solis *et al.*, 2010). Selain fukosantin, *Sargassum* sp juga mengandung beberapa pigmen lain seperti klorofil a dan klorofil c walaupun jumlahnya relatif lebih sedikit dibandingkan dengan fukosantin (Taylor, Amorim dan López-hernández, 2012).



Gambar 2 Struktur Kimia Fukosantin

(Rohim *et al.*, 2019)

Fukosantin memiliki susunan struktur yang unik berupa ikatan alena dan adanya beberapa gugus fungsional oksigen seperti pada bagian epoksi, hidroksil, karbonil dan karboksil. Struktur fukosantin juga mengandung gugus karbonil konjugasi dalam rantai. Oleh karena itu, struktur fukosantin berbeda dari karotenoid tumbuhan darat seperti β -karoten dan lutein (Rohim *et al.*, 2019). Fukosantin sendiri memiliki beberapa manfaat, antara lain *antiangiogenic* (penghambat pembentukan pembuluh darah baru di dalam tubuh), *anticancer effect* (mempercepat terjadinya apoptosis pada sel kanker), *anti-obesity* (meningkatkan *brown adipose tissue* serta menurunkan *white adipose tissue*), dan *anti-inflammatory activity* (mengurangi terjadinya peradangan pada tubuh) (Pereira, 2014).

Fukosantin juga menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, dan *Staphylococcus aureus* serta pada kelompok fungi (*Candida albicans* dan *Aspergillus brasiliensis*). Selain itu, fukosantin juga diketahui mampu menghambat *Angiotensin I-Converting Enzyme* (ACE-I) dalam tingkat kapasitas menengah, sehingga fukosantin dapat pula berfungsi sebagai agen antihipertensi. Senyawa fukosantin hasil ekstraksi dari *Sargassum muticum* juga sangat berpotensi sebagai pencerah kulit karena dapat menghambat produksi melanin, sehingga memiliki aktivitas *anti browning* pada sel melanoma murin B₁₆F₁₀ (Rohim *et al.*, 2019). Fukosantin yang mengalami proses purifikasi akan menghasilkan senyawa turunan berupa fukosantinol (Maeda *et al.*, 2008). Fukosantinol sendiri juga merupakan hasil metabolisme deasetilisasi dari fukosantin (Kumar, Hosokawa dan Miyashita, 2013). Fukosantinol memiliki efek *suppressive* yang lebih tinggi dibandingkan dengan fukosantin sendiri. Fukosantinol dapat dideteksi dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Maeda *et al.*, 2006).



Gambar 3 Struktur Kimia Fukosantinol

(Maeda *et al.*, 2006)

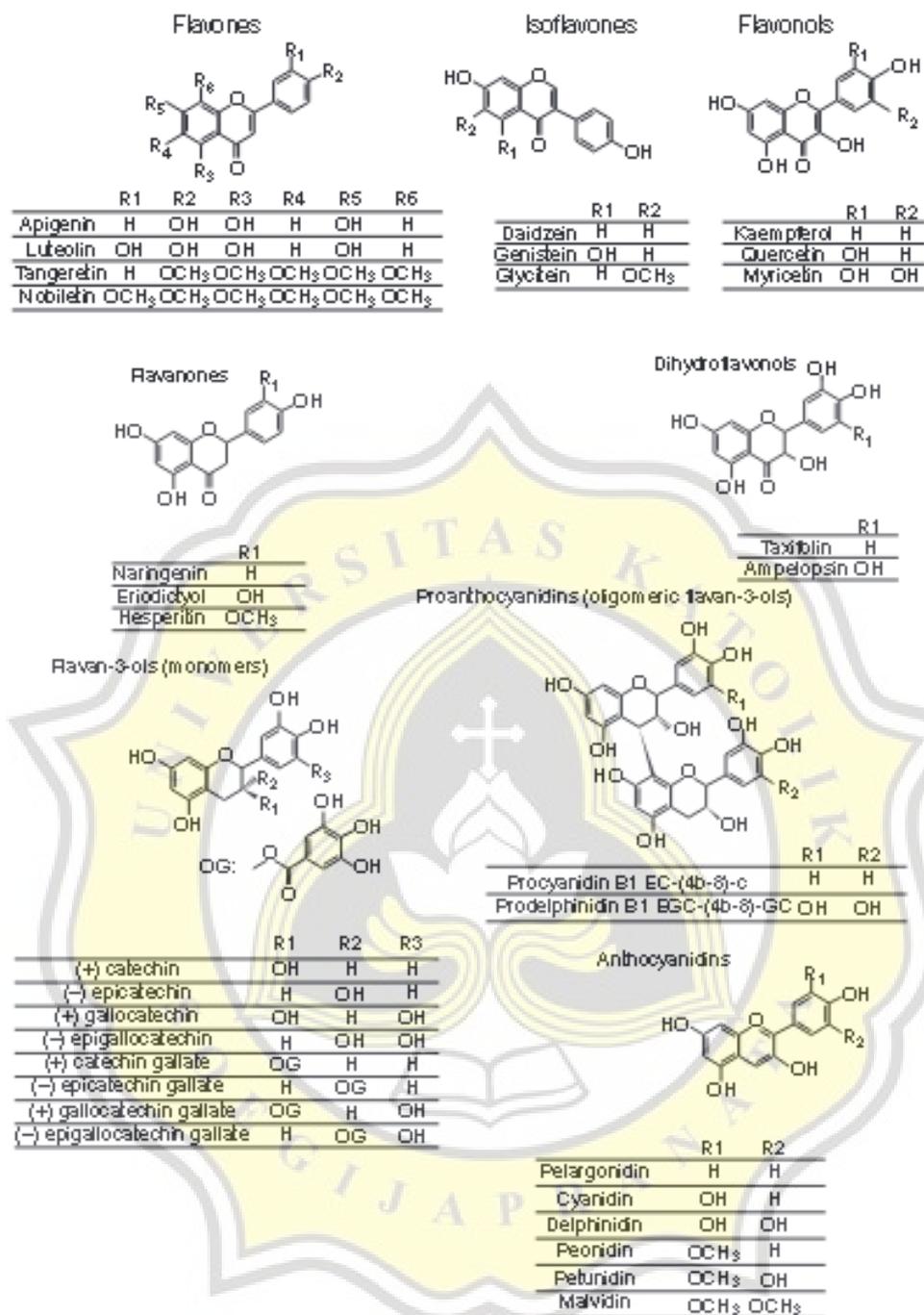
Fukosantinol memiliki manfaat antioksidan yang setara atau lebih tinggi dari alfa tokoferol. Selain itu fukosantinol memiliki kemampuan yang setara namun lebih rendah dibandingkan dengan fukosantin dalam menginduksi terjadinya proses apoptosis pada sel kanker dan berperan dalam sitotoksitas. Fukosantinol memiliki kemampuan dalam meningkatkan kerja hormon insulin dan memiliki kemampuan memecah glukosa menjadi glikogen dan berperan sebagai anti diabetes (Handayani, 2018).

Dalam mengukur dan mengidentifikasi kandungan fukosantin dalam bahan dapat dilakukan dengan berbagai metode, salah satunya yaitu *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Metode HPLC merupakan salah satu metode untuk mengidentifikasi kandungan fukosantin dalam sampel yang paling sering digunakan dan

memiliki tingkat akurasi yang tinggi. HPLC merupakan suatu teknik kromatografi untuk zat cair yang pada umumnya disertai dengan penggunaan tekanan tinggi. Kromatografi adalah teknik atau metode pemisahan molekul yang didasarkan pada perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam. Kromatografi dipakai untuk memisahkan komponen (berupa molekul) yang berada pada suatu larutan. Prinsip kerja HPLC adalah pemisahan komponen analit berdasarkan perbedaan kepolarannya serta setiap campuran yang keluar akan terdeteksi dengan detektor dan direkam dalam bentuk kromatogram. Deteksi pada metode HPLC salah satunya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan sinyal akan dikonversi dan direkam oleh komputer dan ditunjukkan menjadi kromatogram dimana jumlah *peak* menyatakan jumlah komponen, sedangkan luas *peak* menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran (Saeed *et al.*, 2020).

1.2.3. Polifenol

Polifenol merupakan senyawa yang mengandung setidaknya satu cincin aromatik dengan satu gugus hidroksil dalam strukturnya. Ada lebih dari 8000 senyawa polifenol dengan variabilitas struktural yang besar dan diklasifikasikan menjadi dua kelompok utama: *flavonoid* dan non *flavonoid*. *Flavonoid* adalah senyawa polifenol paling melimpah serta paling bioaktif. Mereka mengandung kerangka fenil benzopiran: dua cincin fenil (A dan B) yang bergabung melalui cincin piran heterosiklik. *Flavonoid* dapat dibagi menjadi enam kelompok sesuai dengan perbedaan cincin *pyran* (de la Rosa *et al.*, 2018).



Gambar 4 Kelompok Senyawa *Flavonoid*

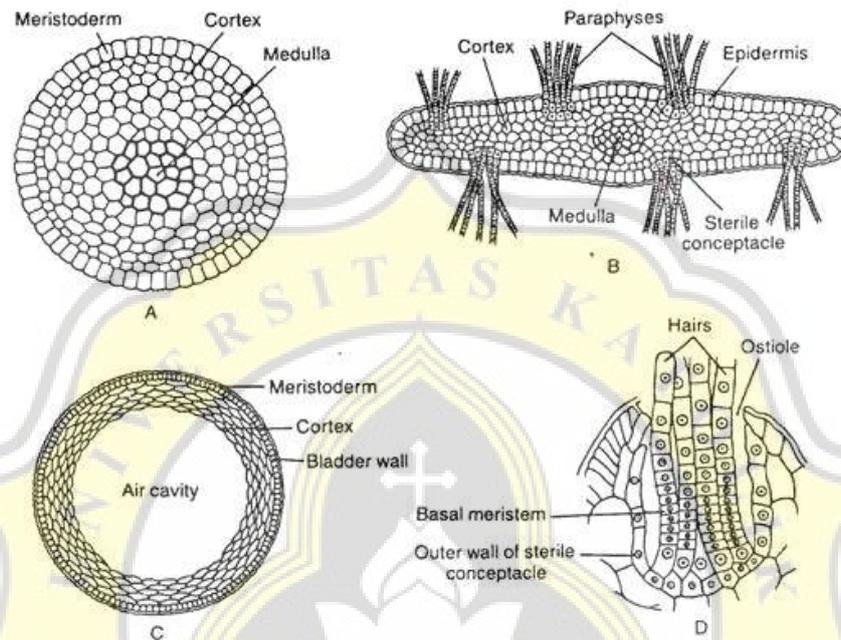
(de la Rosa *et al.*, 2018)

Flavon merupakan struktur paling dasar dari *flavonoid*. Flavon mengandung gugus keto di C4, ikatan rangkap antara C2 dan C3, dan cincin B melekat pada C2. Flavon paling melimpah dalam buah-buahan dan sayuran termasuk *apigenin*, *luteolin*, dan glikosidanya di mana karbohidrat terkait dengan bagian *flavonoid* (bernama aglikon) melalui OH. Isoflavon utama adalah *daidzein*, *genistein*, *glisitin*, dan glikosida (masing-masing *daidzin*, *genistin*, dan *glisitin*). Flavonol adalah flavon yang terhidroksilasi dalam C3. Mereka adalah beberapa *flavonoid* antioksidan terbaik karena pola hidroksilasinya, di mana OH dalam C3 dianggap meningkatkan stabilitas radikal *flavonoid* yang terbentuk setelah senyawa tersebut bertindak sebagai penangkal radikal (de la Rosa *et al.*, 2018).

Polifenol sering terdapat dalam bentuk glikosida polar dan mudah larut dalam pelarut polar. Senyawa fenol sangat peka terhadap oksidasi enzim dan mungkin hilang pada proses isolasi akibat kerja enzim fenolase yang terdapat dalam tumbuhan. Ekstraksi senyawa fenol tumbuhan dengan etanol mendidih biasanya mencegah terjadinya oksidasi enzim. Semua senyawa fenol berupa senyawa aromatik sehingga semuanya menunjukkan serapan kuat di daerah spektrum UV. Polifenol membantu melawan pembentukan radikal bebas dalam tubuh (Rubín *et al.*, 2006).

Pada *Sargassum* sp., senyawa polifenol yang paling dominan adalah *flavonoid*. Selain *flavonoid* juga terdapat senyawa polifenol lain seperti *terpenoid* dan fenol hidrokuinon. *Flavonoid* baik dalam mereduksi senyawa, menghambat banyak reaksi oksidasi enzimatik dan non-enzimatik. *Flavonoid* merupakan salah satu dari polifenol, memiliki peran besar dalam aktivitas tirosinase karena mengandung gugus fenol dan cincin fenil. Struktur *flavonoid* pada prinsipnya cocok sebagai substrat dan mampu bersaing sehingga sehingga dapat menghambat tirosinase. Senyawa ini juga memiliki aktivitas anti inflamasi, karena dapat menghambat sintesis prostaglandin. *Triterpenoid* adalah senyawa alami yang terbentuk melalui proses biosintesis. Struktur *terpenoid* dibangun oleh molekul isoprena dengan kerangka *terpenoid* yang terbentuk dari dua atau lebih banyak unit isoprena (C5). *Terpenoid* terdiri dari beberapa macam senyawa yaitu komponen minyak atsiri, *diterpenoid*, giberalin, triterpenoidem, *sterid* dan *karotenoid* (Nurjanah *et al.*, 2017).

Berbagai senyawa polifenol yang terkandung pada *Sargassum* sp. dominan terletak pada bagian lapisan luar korteks, jaringan meristem, dan jaringan sporogen mitotik (Fadhullah, 2019) sedangkan dinding sel *Sargassum* sp. dominan tersusun atas alginat dan fukoidan (Rohim dan Estiasih, 2019).



Gambar 5 Struktur Internal *Sargassum* sp (A) Batang Penampang Utama (B) Daun (C) Gas Bladder (D) Sterile Conceptacle

(<https://www.biologydiscussion.com/>)

Dalam mengukur dan mengidentifikasi kandungan polifenol dalam bahan dapat dilakukan dengan berbagai metode, antara lain :

a. Metode Folin-Ciocalteu

Merupakan metode uji yang paling umum digunakan. Kandungan flavonol total dinyatakan sebagai dalam mg/g atau %W/W dari ekstrak. Dalam uji ini menggunakan 2 bahan utama, yaitu reagen Folin dan larutan Na_2CO_3 . Keberadaan senyawa-senyawa polifenol terlihat dengan terjadinya perubahan warna larutan menjadi biru. Perubahan warna ini akibat proses reduksi asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat dalam pereaksi *Folin-Ciocalteu* oleh senyawa polifenol menjadi *molybdeum blue* sehingga mampu membentuk warna biru kompleks. Jika kadar senyawa polifenol dari bahan semakin tinggi, maka semakin warna biru yang terbentuk semakin pekat. Na_2CO_3 dalam

uji ini berfungsi menciptakan suasana basa sehingga reaksi reduksi *Folin-Ciocalteu* oleh gugus hidroksil senyawa polifenol dapat optimal (Zhimin Xu dan Luke R. Howard, 2007).

b. Metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Merupakan salah satu metode untuk mengidentifikasi kandungan polifenol dalam sampel. Metode ini umum digunakan dan dapat memisahkan berbagai kelompok senyawa polifenol dalam satu analisis. HPLC merupakan suatu teknik kromatografi untuk zat cair yang pada umumnya disertai dengan penggunaan tekanan tinggi. Kromatografi adalah teknik atau metode pemisahan molekul yang didasarkan pada perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam. Kromatografi dipakai untuk memisahkan komponen (berupa molekul) yang berada pada suatu larutan (Saeed *et al.*, 2020). Perbedaan antara fase normal dan fase terbalik yaitu pada fase normal yang menjadi fase diamnya adalah polar dan fase geraknya adalah non polar sedang pada fase terbalik, fase diamnya adalah non polar dan fase geraknya adalah polar (Lensmeyer *et al.*, 2006).

1.2.4. Antioksidan

Senyawa yang berperan sebagai antioksidan mampu menangkal radikal bebas. Radikal bebas sendiri adalah suatu atom molekul yang mempunyai tingkat kereaktifan yang tinggi. Hal tersebut dikarenakan adanya elektron yang tidak berpasangan. Sumber dari radikal bebas itu sendiri dapat berasal dari sisa-sisa hasil metabolisme tubuh dan dari luar tubuh seperti makanan, sinar UV, polutan dan asap rokok. Jumlah dari radikal bebas yang akan terus meningkat di dalam tubuh akan menimbulkan terjadinya stres oksidatif sel. Hal tersebut terjadi akibat ketidakseimbangan dari jumlah radikal bebas dengan antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh (Kelor *et al.*, 2015). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat memperlambat proses oksidasi dari radikal bebas. Mekanisme kerja senyawa antioksidan salah satunya yaitu dengan cara mendonorkan atom hidrogen atau proton kepada senyawa radikal. Hal ini menjadikan senyawa radikal lebih stabil (Kelor *et al.*, 2015).

Dalam berbagai penelitian, terdapat beberapa senyawa bioaktif yang berperan sebagai antioksidan pada *Sargassum* sp., antara lain

- a. 1,2-*benzenedicarboxylic acid* (69,62 mg/g) yang tergolong sebagai kelompok *triterpenoid* yang mampu memerangkap senyawa radikal DPPH. Selain itu mampu menghambat *Butyrylcholinesterase* (BuChE) dan *Acetylcholinesterase* (AchE) sehingga dapat berperan juga mencegah Alzheimer.
- b. Fuhalo, floretol, fukofloretol, ekol, dan karmalol yang tergolong kelompok senyawa florotanin (17,10-884,80 mg/g) dan berperan sebagai antioksidan
- c. Fukoidan (7,3-850 mg/g) selain sebagai antioksidan, juga berperan sebagai inhibitor sel kanker kolon pada manusia serta inhibitor enzim *cyclooxygenase*.
- d. Fukosantin (0,41-17,50 mg/g) dan fukosantanol (hasil metabolisme deasetilisasi dari fukosantin). Selain sebagai antioksidan juga berperan sebagai anti obesitas (menurunkan *White Adipose Tissue* dan meningkatkan *Brown Adipose Tissue*) serta anti kanker (meningkatkan intensitas fragmentasi DNA serta mempercepat apoptosis sel kanker).
- e. Katekin (*Flavonoid*) berperan sebagai antioksidan karena memiliki gugus hidroksil yang menyumbangkan atom hidrogen saat bereaksi dengan radikal bebas dalam suatu mekanisme transfer elektron yang menyebabkan oksidasi dihambat. *Flavonoid* baik dalam mereduksi senyawa serta menghambat banyak reaksi oksidasi enzimatik dan non-enzimatik.
- f. Alginat (89,80 mg/g) (mempunyai aktivitas SOD relatif lebih besar serta katalase lebih rendah dibanding kontrol) berperan dalam memerangkap radikal DPPH.
- g. Asam fenolat (Asam galat (2,20 mg/g), *gentisic* (64 mg/g), hidroksibenzoat (1,10 mg/g), *vanilic* (0,3 mg/g), *chlorogenic* (0,2 mg/g), dan *syringic* (0,2 mg/g)) berperan dalam memerangkap radikal DPPH serta pereduksi Fe(III)Cl.

(Rohim *et al.*, 2019) dan (Nurjanah *et al.*, 2017).

Pengukuran aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat dilakukan dengan berbagai macam metode uji, antara lain :

a. Uji *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)*.



Gambar 6 Struktur Kimia Larutan *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*

(Irawati, 2008)

Radikal *DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)* adalah senyawa radikal nitrogen, yang kereaktifannya tidak setinggi radikal oksigen seperti RO atau ROO, namun terstabilkan oleh sistem resonansi (Irawati, 2008). Radikal bebas sendiri adalah suatu atom molekul yang mempunyai tingkat kereaktifan yang tinggi. Hal tersebut dikarenakan adanya elektron yang tidak berpasangan. Selama proses reduksi yang dilakukan oleh senyawa antioksidan, larutan *DPPH* radikal akan berubah warna dari ungu menjadi berwarna kuning pucat. Penurunan nilai absorbansi inilah yang nantinya akan diukur dengan spektrofotometer UV. Uji ini memiliki keuntungan yaitu relatif singkat, sederhana, serta memiliki tingkat akurasi yang cukup tinggi.

b. Uji *Cellular antioxidant activity (CAA)*

Metode CAA menguji senyawa aktivitas antioksidan di dalam sel: Sebuah pendekatan yang mungkin memberikan ukuran antioksidan yang lebih akurat. Metode baru ini berfokus pada reaksi antioksidan yang berlangsung di dalam sel. Pendekatan baru ini lebih relevan secara biologis karena memperhitungkan penyerapan, metabolisme, distribusi, dan aktivitas antioksidan senyawa dalam sel. Kelebihan dari metode ini yaitu lebih akurat serta pendekatannya lebih bersifat biologis. Kelemahan metode ini yaitu membutuhkan waktu relatif lama serta biaya yang mahal (Badarinath *et al.*, 2010).

c. Uji Cupric Ion Reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

Metode CUPRAC adalah uji aktivitas antioksidan radikal hidroksil yang relatif baru. Spesies oksigen reaktif (ROS) dapat menyerang makromolekul biologis sehingga menimbulkan penyakit yang berasal dari stres oksidatif. Untuk metode uji *cupric ion reducing antioxidant capacity* (CUPRAC), digunakan reagen *Cu(II)-neocuproin* yang nantinya akan berperan sebagai agen pengoksidasi kromogenik karena akan terjadi proses reduksi ion *Cu(II)* yang dapat diukur. Pereaksi CUPRAC ini sendiri merupakan pereaksi yang bersifat selektif karena memiliki nilai potensial reduksi yang rendah. Pereaksi kromogenik yang digunakan adalah neocuproin (Nc), yang akan membentuk kelat dengan Cu^{2+} sehingga terbentuk bis-neocuproin tembaga (II) berwarna biru. Potensial standar $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+/+}$ sebesar 0.6 V lebih besar dibandingkan dengan $\text{Cu}^{2+/+}$ sebesar 0.17 V sehingga lebih mudah tereduksi. Kelebihan dari metode pengukuran kapasitas antioksidan memakai metode CUPRAC jika dibandingkan dengan metode pengukuran antioksidan yang lain yaitu reagen CUPRAC ini cukup cepat untuk mengoksidasi jenis antioksidan tiol serta pereaksi CUPRAC merupakan pereaksi selektif karena potensi redoksnya lebih rendah. Kekurangan dari metode ini yaitu membutuhkan instrumen canggih yang lebih mahal (Irawati, 2008).

d. Uji Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)

Uji FRAP merupakan uji kolorimetri untuk mengukur kemampuan plasma dalam mengurangi intensitas kompleks *tripirydyltriazine* Fe(III) biru menjadi Fe(II), sehingga mengubah absorbansinya. Keuntungan dari metode uji ini yaitu sederhana, cepat, murah, dan tidak membutuhkan peralatan khusus. Kelemahan metode ini tidak dapat mendeteksi spesies yang bertindak secara radikal pendinginan (transfer H), khususnya kelompok antioksidan yang mengandung SH seperti tiol dan *glutathione* (Badarinath *et al.*, 2010).

e. Uji Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP)

Uji lain yang telah diterapkan dalam mengukur aktivitas antioksidan adalah Uji TRAP. Dalam pengujian ini, laju peroksidasi yang diinduksi oleh AAPH (2-Azobis 2-Amidinopropana Hidroklorida) dilihat melalui hilangnya fluoresensi protein R-fikoeritrin (R-PE). Dalam uji TRAP fase *lag* yang diinduksi oleh plasma dibandingkan dengan yang diinduksi oleh *Trolox* dalam sampel yang sama. Keuntungan dari metode uji ini yaitu akurat untuk pengukuran kapasitas antioksidan *in vivo* dalam serum atau

plasma karena mengukur antioksidan non enzimatis seperti *glutathione* dan asam askorbat. Kelemahan metode ini yaitu relatif kompleks dan membutuhkan waktu relatif lebih lama. Selain itu juga membutuhkan keahlian dan pengalaman yang tinggi (Badarinath *et al.*, 2010).

f. Uji Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

Pengujian ini didasarkan pada kemampuan molekul untuk memerangkap radikal bebas stabil 2,2'-azinobis-(3-asam etil-benzotiazolin-6-sulfonat) sebagai perbandingan dengan *Trolox*, analog vitamin E yang larut dalam air. Oleh karena itu, aktivitas suatu senyawa dinyatakan sebagai TEAC. Teknik ini belum diterapkan secara luas, yang membatasi kemungkinan untuk membandingkan hasil dari studi yang berbeda (Badarinath *et al.*, 2010).

g. Uji 2,2'-azinobis 3-Ethylbenzothiozoline-6-sulfonic acid (ABTS)

Uji ini berdasarkan prinsip bahwa ketika 2,2'-azinobis-(3-asam etil-benzotiazolin-6-sulfonat) diinkubasi dengan peroksidase (seperti *metmyoglobin* dan H_2O_2) kation radikal yang relatif stabil, $ABTS^+$ terbentuk. Formasi dari $ABTS^+$ serta interaksi dengan *Feryl Myoglobin* menghasilkan warna biru-hijau yang relatif stabil, serta diukur pada panjang gelombang 600nm (Badarinath *et al.*, 2010).

Tabel 2 Pengelompokan Prinsip Metode Uji Aktivitas Antioksidan

Prinsip	Metode Uji
Transfer Atom Hidrogen	Uji TRAP
	Uji ABTS
	Uji DPPH
Transfer Elektron.	Uji CUPRAC
	Uji FRAP
	Uji TEAC

Berdasarkan penjabaran berbagai metode uji aktivitas antioksidan di atas, dapat dikelompokkan dalam 2 prinsip utama yaitu transfer atom hidrogen dan transfer elektron. Uji TRAP, uji ABTS, dan uji DPPH menggunakan prinsip transfer atom hidrogen, sedangkan uji CUPRAC, FRAP, dan TEAC menggunakan prinsip transfer elektron.

1.2.5. Etanol

Etanol merupakan kelompok pelarut yang bersifat polar. Etanol dikenal juga dengan etil alkohol serta memiliki rumus kimia C_2H_5OH atau CH_3CH_2OH . Titik didih etanol sekitar $78,4^\circ C$. Etanol memiliki beberapa sifat fisik yaitu tidak berwarna, volatil serta dapat bercampur dengan air (Zhang *et al.*, 2007). Etanol sering digunakan sebagai pelarut zat organik maupun anorganik dalam proses ekstraksi.

Tabel 3 Karakteristik Fisik Etanol

Sifat Fisik	Nilai
Maasa Molekul Relatif	46,07 g/mol
Titik Didih Normal	$78,32^\circ C$
Titik Beku	$-114,1^\circ C$
Densitas pada $20^\circ C$	0,7893 g/ml
Kelarutan dalam air	Sangat larut
Viskositas pada $20^\circ C$	1,17 cP

(Zhang *et al.*, 2007)

Etanol merupakan kelompok pelarut yang bersifat polar sehingga sangat cocok untuk digunakan sebagai pelarut dalam ekstraksi berbagai senyawa bioaktif yang terkandung dalam *Sargassum* sp. Etanol juga paling sering digunakan sebagai pelarut dalam ekstraksi senyawa antioksidan karena senyawa tersebut umumnya merupakan senyawa aromatik dan organik jenuh. Konsentrasi etanol sebagai pelarut dalam ekstraksi sangat berpengaruh terhadap ekstrak yang dihasilkan. Konsentrasi etanol semakin besar, maka kepolaran etanol semakin besar pula sehingga mempermudah kontak pelarut dengan bahan dalam proses ekstraksi. Dalam berbagai penelitian, etanol digunakan sebagai pelarut utama dalam ekstraksi berbagai senyawa seperti fukosantin, polifenol, dan antioksidan di dalam rumput laut cokelat. Dalam Tabel 1., dapat kita lihat bahwa ekstraksi senyawa bioaktif pada *Sargassum* sp. didominasi menggunakan etanol sebagai pelarutnya.

1.2.6. *Freeze Drying*

Metode *freeze drying* (pengeringan beku) merupakan salah satu metode pengeringan yang mampu mempertahankan kualitas hasil pengeringan dan menjaga senyawa yang sensitif terhadap panas. Prinsip dasar dari *freeze drying* yaitu dengan menghilangkan kandungan air di dalam bahan yang dikeringkan atau produk beku tanpa melalui fase cair terlebih dahulu. Proses pengeringan dengan *freeze drying* terbagi dalam 3 tahap utama yaitu :

- a. **Pembekuan:** dilakukan proses pembekuan terlebih dahulu sebelum produk akan dikeringkan.
- b. **Vacuum:** setelah dibekukan maka sampel dikondisikan dalam kondisi vakum sehingga pelarut yang beku dalam sampel akan dapat mengalami penguapan tanpa melalui fase cair.
- c. **Kondensasi:** adanya kondensor pada suhu rendah menghilangkan pelarut yang menguap pada tempat vakum.

(Claussen *et al.*, 2007)

1.2.7. *Ultrasound Assisted Extraction*

UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*) adalah salah satu metode ekstraksi yang cepat, sederhana dan efisien dibandingkan dengan ekstraksi konvensional. Selama proses ekstraksi, terjadi peningkatan efisiensi ekstraksi akibat adanya propagasi gelombang tekanan ultrasonik dan fenomena kavitasi yang dihasilkan. Energi yang dihasilkan dari runtuhnya gelembung kavitasi memberikan penetrasi pelarut yang lebih besar ke dalam bahan seluler dan meningkatkan transfer massa. Proses ekstraksi juga dapat lebih ditingkatkan dengan terganggunya dinding sel dan pelepasan bahan seluler (Zou *et al.*, 2010). Beberapa parameter yang digunakan dalam penggunaan gelombang ultrasonik yaitu:

- a. Daya sonikasi
- b. Frekuensi
- c. Suhu
- d. Waktu

(Kovačević *et al.*, 2019)



Gambar 7 Mekanisme Pembentukan Gelembung Kavitasi

(Kenneth, 1994)

Mekanisme peningkatan ultrasonik terutama dikaitkan dengan perilaku gelembung kavitasi pada propagasi gelombang akustik. Pecahnya gelembung-gelembung ini dapat menghasilkan efek kimia, fisik dan mekanik yang mengakibatkan gangguan pada matriks bahan, menyebabkan pelepasan senyawa yang dapat diekstraksi, serta meningkatkan perpindahan massa pelarut ke dalam sampel, dan meningkatkan pelepasan senyawa target dari matriks ke pelarut. (Maran dan Priya, 2014). UAE memiliki beberapa keunggulan antara lain :

- a. Bersifat *non-destructive* dan *non-invasive*,
- b. Mudah diaplikasikan
- c. Mampu mempercepat proses ekstraksi
- d. Aman
- e. Mampu dalam meningkatkan jumlah rendemen hasil ekstraksi
- f. Penggunaan suhu yang tidak terlalu tinggi sehingga cocok untuk diterapkan untuk senyawa bioaktif tidak tahan panas.
- g. Mampu memberi efek kavitasi, efek panas, dan efek struktural yang membuat penetrasi zat terlarut ke dalam sel terjadi lebih cepat
- h. Mampu meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam sel bahan serta meningkatkan transfer massa. Dinding sel bahan dipecah dengan gelombang ultrasonik sehingga kandungan didalamnya dapat keluar dengan mudah.

(Awad *et al.*, 2012; Campoli *et al.*, 2018; Bhargava *et al.*, 2021)

Pada penelitian ini, digunakan alat *ultrasound waterbath*. Cara kerja dari alat ini yaitu dengan mengubah energi listrik menjadi getaran mekanis oleh transduser piezoelektrik. Sistem *tuning* inilah yang kemudian akan mengirimkan gelombang ultrasonik yang dihasilkan getaran mekanis ke medianya. *Ultrasound waterbath* mempunyai *sounder* ultrasonik dan digunakan dalam memberi sinyal eksitasi sesuai dengan frekuensi (Kristina, Budianto dan Soedarini, 2020).

Tabel 4. Aplikasi *Ultrasound Assisted Extraction* pada Rumput Laut Cokelat

Spesies	Frekuensi (kHz)	Daya (W)	Waktu (menit)	Suhu (°C)	Senyawa Bioaktif	Yield (mg/kg db)	Referensi
<i>Sargassum muticum</i>	50	400	60	50	Polifenol	0,103-0,235	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sargassum muticum</i>	---	---	10	80	Fukosantin	0,613	(Subramanian <i>et al.</i> , 2013)
<i>Hormosira banksii</i>	50	150-250	20,40, dan 60	30,40, dan 50	Polifenol	14,46-23,12	(Dang <i>et al.</i> , 2017)
<i>Ascophyllum nodosum</i>	20	750	15	---	Polifenol	0,128-0,156	(Kadam <i>et al.</i> , 2015)
<i>Laminaria hyperborea</i>	20	750	15	---	Polifenol	0,343-0,365	(Kadam <i>et al.</i> , 2015)
<i>Ecklonia cava</i>	40	200	30	360 dan 720	Polifenol	0,342-0,615	(Lee <i>et al.</i> , 2013)

Berdasarkan Tabel 4, dapat kita lihat berbagai Aplikasi *Ultrasound Assisted Extraction* pada rumput laut cokelat yang telah dipublikasikan. Berbagai kondisi ekstraksi perlu dicari kondisi optimum sehingga dapat diperoleh ekstrak secara maksimal.

1.2.8. *Response Surface Methodology*

Response Surface Methodology (RSM) merupakan kumpulan matematika dan teknik statistik yang berguna untuk pemodelan dan analisis masalah yang dipengaruhi oleh beberapa variabel dan tujuannya adalah untuk mengoptimalkan respon. Respon pengoptimalan ini dapat berupa nilai maksimum, minimum, atau target (Olawoye, 2020). RSM pada dasarnya dapat dikategorikan menjadi dua kelompok yaitu:

(1) **Desain *Box-Behnken***

Dalam desain *Box-Behnken* jumlah minimum faktor (faktor kontinu atau numerik) yang dapat mengakomodasi adalah 3 dan memiliki 3 tingkat faktor yaitu tingkat atas, tingkat yang lebih rendah, serta titik tengah (Olawoye, 2020).

(2) **Desain Komposit Pusat (CCD)**

Desain Komposit Pusat adalah desain respon permukaan yang selain memiliki 3 faktor level juga memiliki titik aksial. Titik aksial biasanya dilambangkan sebagai (α) meningkatkan jumlah level ke 5 tingkat sehingga memberikan fleksibilitas desain eksperimental. Keunggulannya dibandingkan *Box-Behnken* adalah memungkinkan perancang eksperimental untuk mengetahui efek dari faktor-faktor yang ditanggapi sebagai perancang eksperimental yang melampaui atau di bawah level yang dipilih. Namun, dalam Desain Komposit Pusat, jumlah minimum faktor yang dapat diakomodasi hanya dua (Olawoye, 2020).

1.3. Rumusan Masalah

- a. Apa pengaruh perbedaan ukuran partikel, konsentrasi, dan rasio solven dalam *ultrasound assisted extraction* terhadap fukosantin, polifenol, dan aktivitas antioksidan pada *Sargassum* sp.?
- b. Bagaimana optimasi ukuran partikel, konsentrasi, dan rasio solven dalam *ultrasound assisted extraction* fukosantin, polifenol, dan antioksidan pada *Sargassum* sp.?

1.4. Tujuan

- a. Mengetahui pengaruh perbedaan ukuran partikel, konsentrasi, dan rasio solven dalam *ultrasound assisted extraction* terhadap fukosantin, polifenol, dan aktivitas antioksidan pada *Sargassum* sp.
- b. Mengetahui ukuran partikel, konsentrasi, dan rasio solven optimum dalam *ultrasound assisted extraction* fukosantin, polifenol, dan antioksidan pada *Sargassum* sp.?

1.5. Hipotesis

- H₀ = Tidak ada pengaruh antara ukuran partikel, konsentrasi, dan rasio solven terhadap kandungan fukosantin, polifenol, dan antioksidan pada *Sargassum* sp.
- H_a = Ada pengaruh antara ukuran partikel, konsentrasi, dan rasio solven terhadap kandungan fukosantin, polifenol, dan antioksidan pada *Sargassum* sp.