

## 4. Pembahasan

### 4.1. Pengaruh Waktu, Daya, Frekuensi, dan Suhu

Berdasarkan Tabel 5 di atas, dapat kita lihat bahwa kondisi *Ultrasound Assisted Extraction* pada *Sargassum* sp. yang memiliki hasil nilai rata-rata konsentrasi polifenol, antioksidan, dan fukosantin tertinggi dan nilai STDEV terkecil pada suhu ekstraksi 30°C, frekuensi 45 kHz, daya 100% dengan waktu 90 menit. Penggunaan frekuensi diatas 50 kHz akan mengurangi efektifitas dari proses ekstraksi senyawa. Terjadinya formasi serta pertumbuhan gelembung kavitasi akibat adanya proses pemadatan serta pemantulan gelombang ultrasonik menjadi kurang maksimal. Proses pembentukan gelembung kavitasi menjadi tidak sempurna karena sudah pecah terlebih dahulu dengan keberadaan gelombang lain pada frekuensi yang tinggi (terdapat gelombang terlalu banyak dalam satuan waktu). Penggunaan daya 100% juga akan mempengaruhi dalam proses ekstraksi. Penggunaan daya yang tinggi akan meningkatkan konsentrasi senyawa bioaktif yang terekstrak akibat semakin besarnya tingkat kerusakan dinding sel sehingga pelarut etanol akan lebih mudah masuk dan mengikat senyawa bioaktif yang akan diekstrak (Sanderson, 2004).

Dalam penelitian ini juga digunakan waktu ekstraksi selama 90 menit dalam 3 siklus. Waktu ekstraksi dalam *Ultrasound Assisted Extraction* terbagi dalam 2 tahap (pencucian dan ekstraksi perlahan). Tahap pencucian menjadi tahap awal dimana berbagai komponen permukaan matriks rumput laut akan terlarut dalam pelarut. Setelah melewati tahap pencucian dilanjutkan dengan tahap ekstraksi perlahan yang terdiri dari proses transfer massa senyawa bioaktif dari dalam matriks sel ke pelarut melalui difusi. Maka dari itu penggunaan waktu ekstraksi yang tepat sangat diperlukan untuk mengoptimalkan proses ekstraksi senyawa. Proses ekstraksi dilakukan dalam 3 siklus dengan masing-masing 90 menit. Proses ekstraksi ini lebih efektif dibandingkan dengan ekstraksi langsung selama 4,5 jam dalam 1 siklus karena menghasilkan rendemen lebih tinggi. Berdasarkan hasil penelitian ekstraksi metabolit sekunder tanaman lipo dalam 5 siklus yang dilakukan Febrina *et al.*, (2015) menunjukkan bahwa semakin banyak siklus ekstraksi yang dilakukan maka rendemen yang diperoleh juga semakin tinggi. Ekstraksi dalam 1 siklus meningkatkan risiko degradasi senyawa bioaktif serta kejenuhan

interaksi antara pelarut dan senyawa (Cravotto dan Binello, 2016). Penggunaan suhu 30°C dalam ekstraksi ini dikarenakan fukosantin yang merupakan senyawa pigmen utama pada *Sargassum* sp. yang sangat mudah terdegradasi oleh faktor eksternal, salah satunya suhu. Adanya ikatan rangkap konjugasi dalam struktur fukosantin mengakibatkan mudah rusak akibat adanya degradasi oksidatif oksigen, suhu, serta cahaya. Adanya suhu tinggi menyebabkan terputusnya ikatan rangkap konjugasi yang menurunkan aktivitas fukosantin. Secara umum, fukosantin tahan terhadap suhu hingga suhu 60°C saja (Eka Wati, Suhendra dan Wartini, 2020). Maka dari itu digunakan suhu yang tidak terlalu tinggi untuk mengurangi risiko kerusakan senyawa bioaktif yang akan diekstraksi.

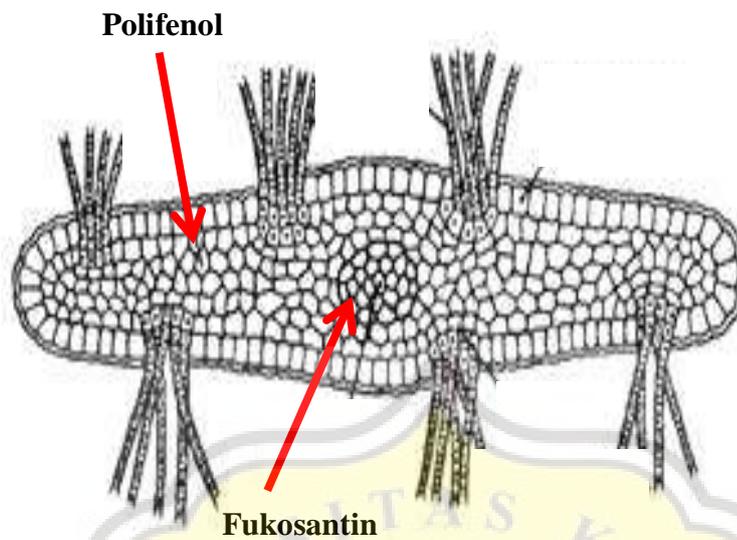
#### **4.2. Pengaruh Ukuran Partikel**

Pada penelitian ini salah satu variabel bebas yang digunakan adalah ukuran partikel dengan dua tingkat perlakuan, yaitu 0,400 mm dan 0,149 mm. Pada Tabel 7 dapat kita lihat pada konsentrasi pelarut dan rasio *dried mass:solvent* yang sama terjadi kecenderungan peningkatan konsentrasi polifenol dan antioksidan seiring dengan semakin kecilnya ukuran partikel namun untuk konsentrasi fukosantin mengalami penurunan seiring dengan semakin kecilnya ukuran partikel. Peningkatan konsentrasi antioksidan seiring dengan peningkatan konsentrasi polifenol karena keberadaan gugus hidroksil dalam senyawa polifenol yang berperan dalam menstabilkan atom hidrogen saat bereaksi dengan senyawa radikal dalam sistem transfer elektron sehingga mampu menghambat proses oksidasi.

Polifenol sering terdapat dalam bentuk glikosida polar dan mudah larut dalam pelarut polar (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. Etanol merupakan kelompok pelarut yang bersifat polar sehingga sangat cocok untuk digunakan sebagai pelarut dalam ekstraksi senyawa polifenol maupun antioksidan 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.

Berbagai senyawa polifenol yang terkandung pada *Sargassum* sp dominan terletak pada bagian matriks sel vegetatif (Budhiyanti *et al.*, 2012). Etanol juga memiliki kemampuan untuk mendegradasi dinding sel sehingga senyawa bioaktif lebih mudah keluar dari matriks sel yang mendukung peningkatan konsentrasi polifenol dan antioksidan yang terekstrak (Rahmadhani, Putra dan Suhendra, 2020).

Hasil penelitian ini menunjukkan kecenderungan hasil yang sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Norra *et al* (2016) dalam ekstraksi polifenol dan antioksidan dari *Sargassum* sp. dimana semakin kecil ukuran partikel sampel maka konsentrasi polifenol dan antioksidan semakin tinggi. Pada penelitian oleh Rondang Tambun *et al* (2017) melaporkan bahwa ukuran partikel yang kecil memiliki kecenderungan memperluas permukaan zat yang akan membantu dalam mempercepat tingkat kelarutan dari suatu zat. Semakin kecil ukuran partikelnya juga akan memperbanyak pori-pori yang terbentuk sehingga dapat meningkatkan jumlah kadar polifenol dan antioksidan yang mudah diserap. Ukuran partikel yang kecil akan meningkatkan kecenderungan untuk mempercepat penetrasi dari pelarut ke bagian dalam bahan yang akan diekstrak. Selain itu semakin kecil ukuran partikel maka tingkat kelarutannya akan semakin tinggi sehingga proses pemisahan hasil sentrifugasi menjadi lebih sulit dan lama (Rondang Tambun *et al.*, 2017). Ukuran partikel akan meningkatkan jumlah membran sel bahan yang rusak sehingga memudahkan pelarut dalam menarik senyawa dari matriks sel dan mempermudah kontak pelarut dengan senyawa yang diekstrak (Rahmadhani, Putra dan Suhendra, 2020).



**Gambar 13 Skema Posisi Fukosantin dan Polifenol pada *Sargassum* sp.**

Konsentrasi fukosantin cenderung menurun seiring dengan semakin kecilnya ukuran partikel. Hal tersebut mungkin terjadi karena fukosantin merupakan senyawa pigmen utama pada *Sargassum* sp. yang sangat mudah terdegradasi oleh faktor eksternal, antara lain yaitu panas, pH, dan paparan cahaya (Defiana, 2013). Selama proses pengecilan ukuran terdapat terjadi peningkatan suhu sehingga berisiko menyebabkan fukosantin mengalami kerusakan dan menurunkan konsentrasinya. Fukosantin merupakan pigmen utama pada *Sargassum* sp dan dominan terletak di bagian plastida pada talus serta kloroplas pada sel vegetatif. *Sargassum* sp mengandung beberapa pigmen lain seperti klorofil a dan klorofil c walaupun jumlahnya relatif lebih sedikit dibandingkan oleh fukosantin (Taylor, Amorim dan López-hernández, 2012), sedangkan senyawa polifenol yang terkandung pada *Sargassum* sp dominan terletak pada bagian lapisan luar korteks, jaringan meristem, dan jaringan sporogen mitotik (Fadhullah, 2019). Berdasarkan letaknya di dalam sel, maka fukosantin cenderung lebih sulit diekstrak dibandingkan dengan senyawa polifenol ataupun antioksidan.

### 4.3. Pengaruh Konsentrasi Pelarut

Pada penelitian ini salah satu variabel bebas yang digunakan adalah konsentrasi pelarut dengan tiga tingkat perlakuan, yaitu 50%, 60%, dan 70%. Pada Tabel 7 dapat kita lihat pada ukuran partikel dan rasio *dried mass: solvent* yang sama terjadi kecenderungan peningkatan konsentrasi polifenol dan antioksidan namun untuk konsentrasi fukosantin juga mengalami peningkatan pada konsentrasi 60% namun menurun kembali pada konsentrasi 70%. Pelarut yang digunakan yaitu etanol yang 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. Etanol merupakan pelarut yang digunakan dalam melarutkan senyawa fenolik karena kemampuannya dalam mendegradasi dinding sel. Hal tersebut menyebabkan polifenol lebih mudah keluar dan mengoptimalkan proses ekstraksi. Selain itu etanol juga memiliki gugus hidroksil yang mampu mengikat gugus hidrogen pada gugus hidroksil yang terdapat pada senyawa fenolik sehingga meningkatkan kelarutan senyawa fenolik dalam etanol (Suhendra, Widarta dan Wiadnyani, 2019). Konsentrasi etanol yang semakin besar dalam ekstraksi akan meningkatkan daya kemampuan dalam merusak sel yang menyebabkan senyawa yang terekstrak serta rendemen yang diperoleh akan semakin besar juga (Diah, Wrasati dan Wartini, 2018). Proses kavitasi yang terjadi juga dapat meningkatkan polaritas pelarut sehingga jumlah pelarut etanol yang kontak dengan senyawa yang diekstrak akan semakin banyak dan menimbulkan senyawa yang

diekstrak akan keluar sel serta memaksimalkan hasil ekstraksi (Buana Januarti, Santoso dan Razak, 2012).

Konsentrasi fukosantin cenderung meningkat pada konsentrasi 60% namun menurun kembali pada konsentrasi 70%. Hal tersebut mungkin terjadi karena fukosantin merupakan senyawa pigmen utama pada *Sargassum* sp. yang bersifat semi polar sehingga seiring berkurangnya konsentrasi etanol yang digunakan akan mengurangi sifat kepolarannya dan cenderung memiliki tingkat kepolaran yang sama antara fukosantin dengan etanol pada konsentrasi 60% sehingga efektif dalam meningkatkan konsentrasi fukosantin yang terekstrak. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi mempunyai tingkat kepolaran yang sama, maka senyawa yang terekstrak akan larut dan terekstrak dengan optimal (Suhendra, Widarta dan Wiadnyani, 2019).

#### **4.4. Pengaruh Rasio *Dried Mass:Solvent***

Pada penelitian ini salah satu variabel bebas yang digunakan adalah rasio *dried mass: solvent* dengan tiga tingkat perlakuan, yaitu 1:10, 1:15, dan 1:20. Pada Tabel 7 dapat kita lihat pada ukuran partikel dan konsentrasi pelarut yang sama terjadi kecenderungan peningkatan konsentrasi polifenol, antioksidan, dan fukosantin. Peningkatan konsentrasi polifenol, antioksidan, dan fukosantin seiring dengan peningkatan rasio *dried mass: solvent* karena rasio *dried mass: solvent* yang semakin besar dapat meningkatkan konsentrasi senyawa yang dihasilkan akibat terjadi peningkatan jumlah dan kemampuan pelarut dalam melarutkan komponen senyawa yang terdapat dalam bahan. Di lain sisi, peningkatan jumlah rasio *dried mass:solvent* juga akan menimbulkan konsentrasi senyawa yang diekstrak akan semakin menurun atau relatif menjadi konstan karena jumlah konsentrasi sudah mencapai titik jenuh / titik optimumnya (Noviyanty dan Salingkat, 2019). Fukosantin merupakan pigmen utama pada *Sargassum* sp dan dominan terletak di bagian plastida pada talus serta kloroplas pada sel vegetatif. *Sargassum* sp mengandung beberapa pigmen lain seperti klorofil a dan klorofil c walaupun jumlahnya relatif lebih sedikit dibandingkan oleh fukosantin (Taylor, Amorim dan López-hernández, 2012), sedangkan senyawa polifenol yang terkandung pada *Sargassum* sp dominan terletak pada bagian lapisan luar korteks, jaringan meristem, dan jaringan sporogen mitotik (Fadhullah, 2019). Berdasarkan letaknya di dalam sel, maka

fukosantin cenderung lebih sulit diekstrak dibandingkan dengan senyawa polifenol ataupun antioksidan.

#### 4.5. Analisa Data Secara Statistik

Berdasarkan hasil ANOVA dari 3 faktor ekstraksi pada konsentrasi polifenol, antioksidan, dan fukosantin masing-masing, semua hasil ANOVA menunjukkan probabilitas  $<0,0001$  ( $p < 0,05$ ), yang berarti bahwa model kuadrat permukaan respon untuk kedua respon (variabel dependen) adalah signifikan dan dapat digunakan untuk mengoptimalkan faktor ekstraksi. Pada tabel hasil *summary of fit* masing-masing untuk konsentrasi polifenol, antioksidan, dan fukosantin,  $R^2$  model regresi konsentrasi polifenol adalah 0,920322 (0,400 mm) dan 0,900722 (0,149 mm). Pada konsentrasi antioksidan,  $R^2$  model regresi adalah 0,823727 (0,400 mm) dan 0,861842 (0,149 mm) untuk kurva standar *trolox* sedangkan kurva standar *ascorbic acid*  $R^2$  model regresi adalah 0,823779 (0,400 mm) dan 0,861805 (0,149 mm). Pada konsentrasi fukosantin,  $R^2$  model regresi adalah 0,935215 (0,400 mm) dan 0,961779 (0,149 mm). Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa model regresi signifikan dan cukup mewakili distribusi data (Wang, Liu dan Hu, 2014). *R square* juga disebut sebagai koefisien determinasi yang menjelaskan seberapa jauh data dependen dapat dijelaskan oleh data independen. *R square* bernilai antar 0 – 1 dengan ketentuan semakin mendekati angka satu berarti semakin baik. Jika *r square* bernilai 0,6, berarti 60% sebaran variabel dependen dapat dijelaskan oleh variabel independen. Sisanya 40% tidak dapat dijelaskan oleh variabel independen atau dapat dijelaskan oleh variabel diluar variabel independen (komponen error).

Dalam analisis *Central Composite Design*, *p-value* menunjukkan signifikansi masing-masing koefisien dalam model regresi polinomial yang dibangun, dimana semakin rendah *p-value*, semakin signifikan koefisien terhadap model regresi secara keseluruhan (Zhong dan Wang, 2010). Hasil pengaruh *effect summary* terhadap hasil eksperimen pada 0,400 mm menunjukkan bahwa variabel yang paling signifikan terhadap model adalah rasio dan konsentrasi pelarut dengan *p-value* 0,00000, kemudian konsentrasi pelarut\*konsentrasi pelarut dengan *p-value* 0,00000 dan koefisien signifikan terakhir adalah konsentrasi pelarut\*rasio dengan *p-value* 0,00185. Koefisien rasio\*rasio tidak

signifikan dalam model regresi. Interaksi antara rasio dengan rasio menunjukkan signifikansi terendah dengan *p-value* 0,07193. Selain itu, hasil pengaruh *response surface methodology* terhadap hasil eksperimen pada 0,149 mm variabel yang paling signifikan terhadap model adalah rasio dan konsentrasi pelarut dengan *p-value* 0,00000, kemudian konsentrasi pelarut\*konsentrasi pelarut dengan *p-value* 0,00000, konsentrasi pelarut\*rasio dengan *p-value* 0,00095, dan terakhir rasio\*rasio dengan *p-value* 0,03288. Walaupun terdapat beberapa koefisien yang tidak signifikan, beberapa ahli berpendapat bahwa koefisien tersebut tidak untuk dihilangkan dan model regresi dilihat secara keseluruhan (Anderson dan Whitcomb, 2017).

#### **4.6. Titik Optimum Ukuran Partikel, Konsentrasi Pelarut, dan Rasio *Dried Mass:Solvent***

Hasil pengukuran konsentrasi polifenol, antioksidan, dan fukosantin pada *Sargassum* sp yang diekstraksi menggunakan metode *Ultrasound Assisted Extraction* dengan variabel bebas ukuran partikel (0,400 mm dan 0,149 mm), konsentrasi pelarut (50%, 60%, dan 70%), serta rasio *dried mass : solvent* (1:10, 1:15, dan 1:20). Berdasarkan gambar 7a menunjukkan plot permukaan pada tingkat ukuran 0,400 mm dan batas bawah prediksi konsentrasi total polifenol adalah setara dengan 98 mg GAE/g dan batas atas adalah setara dengan 136 mg GAE/g. Gambar 7b menunjukkan plot permukaan pada tingkat ukuran 0,149 mm dan batas bawah prediksi konsentrasi total polifenol terbukti setara dengan 99 mg GAE/g sedangkan batas atas terbukti setara dengan 129 mg GAE/g. Dari gambar plot permukaan tersebut, dapat kita lihat titik optimum konsentrasi polifenol berada pada ukuran partikel 0,149 mm, konsentrasi pelarut 70%, serta rasio *dried mass : solvent* 1:20.

Berdasarkan gambar 8a menunjukkan plot permukaan pada tingkat ukuran 0,400 mm dan batas bawah prediksi konsentrasi antioksidan adalah setara dengan 4 mg TE/g dan batas atas adalah setara dengan 24 mg TE/g. Gambar 8b menunjukkan plot permukaan pada tingkat ukuran 0,149 mm dan batas bawah prediksi konsentrasi antioksidan terbukti setara dengan 7 mg TE/g sedangkan batas atas terbukti setara dengan 26,6 mg TE/g. Pada gambar 9a menunjukkan plot permukaan pada tingkat ukuran 0,400 mm dan batas bawah prediksi konsentrasi antioksidan adalah setara dengan 15 mg AAE/g dan

batas atas adalah setara dengan 31 mg AAE/g. Gambar 9b menunjukkan plot permukaan pada tingkat ukuran 0,149 mm dan batas bawah prediksi konsentrasi antioksidan terbukti setara dengan 18 mg AAE/g sedangkan batas atas terbukti setara dengan 33 mg AAE/g. Dari gambar plot permukaan tersebut, dapat kita lihat titik optimum konsentrasi antioksidan berada pada ukuran partikel 0,149 mm, konsentrasi pelarut 70%, serta rasio *dried mass : solvent* 1:20.

Ukuran partikel yang kecil memiliki kecenderungan memperluas permukaan zat yang akan membantu dalam mempercepat tingkat kelarutan dari suatu zat. Semakin kecil ukuran partikelnya juga akan memperbanyak pori-pori yang terbentuk sehingga dapat meningkatkan jumlah kadar polifenol yang mudah diserap. Ukuran partikel yang kecil akan meningkatkan kecenderungan untuk mempercepat penetrasi dari pelarut ke bagian dalam bahan yang akan diekstrak (Rondang Tambun *et al.*, 2017). Ukuran partikel akan meningkatkan jumlah membran sel bahan yang rusak sehingga memudahkan pelarut dalam menarik senyawa dari matriks sel dan mempermudah kontak pelarut dengan senyawa yang diekstrak (Rahmadhani, Putra dan Suhendra, 2020). Selain itu konsentrasi etanol yang semakin besar dalam ekstraksi akan meningkatkan daya kemampuan dalam merusak sel yang menyebabkan senyawa yang terekstrak serta rendemen yang diperoleh akan semakin besar juga (Diah JuliantariD, Wrasiasi dan Wartini, 2018). Jumlah rasio *dried mass: solvent* yang semakin besar dapat meningkatkan konsentrasi senyawa yang dihasilkan akibat terjadi peningkatan kemampuan pelarut dalam melarutkan komponen senyawa yang terdapat dalam bahan (Noviyanty dan Salingkat, 2019).

Berdasarkan gambar 10a menunjukkan plot permukaan pada tingkat ukuran 0,400 mm, batas bawah prediksi konsentrasi fukosantin adalah setara dengan 474 mg/g dan batas atas adalah setara dengan 604 mg/g. Gambar 10b menunjukkan plot permukaan pada tingkat ukuran 0,149 mm dan batas bawah prediksi konsentrasi total antioksidan terbukti setara dengan 330 mg/g sedangkan batas atas terbukti setara dengan 592 mg/g. Dari gambar plot permukaan tersebut, dapat kita lihat titik optimum konsentrasi fukosantin berada pada ukuran partikel 0,400 mm, konsentrasi pelarut 60%, serta rasio *dried mass : solvent* 1:20. Fukosantin merupakan senyawa pigmen utama pada

*Sargassum* sp. yang bersifat semi polar sehingga seiring berkurangnya konsentrasi etanol yang digunakan akan mengurangi sifat kepolarannya dan cenderung memiliki tingkat kepolaran yang sama antara fukosantin dengan etanol pada konsentrasi 60% sehingga efektif dalam meningkatkan konsentrasi fukosantin yang terekstrak. Selain itu fukosantin merupakan senyawa pigmen utama pada *Sargassum* sp. yang sangat mudah terdegradasi oleh faktor eksternal, antara lain yaitu panas, pH, dan paparan cahaya (Defiana, 2013).

