

## BAB IV PEMBAHASAN

*Review* disusun untuk mengetahui pengaruh berbagai faktor dalam proses ekstraksi dan analisis yang sudah pernah dilakukan terhadap konsentrasi asam glutamat *edible seaweed* yang diperoleh, agar metode yang tepat dapat dipilih sehingga asam glutamat *edible seaweed* dapat diperoleh secara optimal dan dapat dikembangkan lebih lanjut menjadi bumbu penyedap. Penyusunan *review* dilakukan secara sistematis mengikuti bagian *systematic review* dari metode *Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta Analyses* (PRISMA 2020) dengan sedikit modifikasi. Melalui proses seleksi jurnal berdasarkan rentang waktu (2011–2020) dan empat kriteria kelayakan jurnal yang telah ditentukan, diperoleh 63 jurnal yang sesuai dengan semua kriteria (Lampiran 1). Jurnal terpilih tersebut berasal dari 26 jurnal publikasi, dimana lebih dari setengah total jurnal terpilih berasal dari 5 jurnal publikasi, yaitu *Journal of Applied Phycology* (18), *Food Chemistry* (9), *Marine Drugs* (4), *Food Research International* (3), dan *Molecules* (3) (Lampiran 2).

Berbagai data yang dibutuhkan untuk *review* telah dikumpulkan dan diketahui terdapat 41 genus dan 88 spesies *edible seaweed* (Lampiran 4) yang berasal dari 33 negara (Lampiran 3) yang asam glutamatnya sudah pernah diteliti dalam kurun waktu 10 tahun terakhir. Genus dan spesies tersebut terdiri dari 18 genus dan 37 spesies *seaweed* merah (*rhodophyta*), 15 genus dan 25 spesies *seaweed* coklat (*phaeophyta*), serta 8 genus dan 26 spesies *seaweed* hijau (*chlorophyta*). Setiap jenis *seaweed* memiliki kisaran konsentrasi asam glutamat yang berbeda. Berdasarkan data yang terkumpul dari jurnal terpilih, konsentrasi asam glutamat *seaweed* merah (*rhodophyta*) yang dapat diperoleh berkisar antara 0.00083–5.030 gram/100gram *dry weight seaweed*, konsentrasi asam glutamat *seaweed* coklat (*phaeophyta*) yang dapat diperoleh berkisar antara 0.00012–3.650 gram/100 gram *dry weight seaweed*, sedangkan konsentrasi asam glutamat *seaweed* hijau (*chlorophyta*) yang dapat diperoleh berkisar antara 0.0026–6.600 gram/100 gram *dry weight seaweed*. Perolehan asam glutamat tertinggi berasal dari spesies *Palmaria palmata* (*seaweed* merah/*rhodophyta*), *Saccharina latissima* (*seaweed* coklat/*phaeophyta*), dan *Ulva pertusa* (*seaweed* hijau/*chlorophyta*). Selain itu, diantara

jenis dan spesies *seaweed* tersebut, *seaweed* coklat (*phaeophyta*) khususnya *Saccharina latissima* merupakan jenis dan spesies *seaweed* yang paling sering dianalisis dimana jumlah data asam glutamatnya mencapai 168 dan 74 data.

Dari proses pemilihan data dan penyusunan diagram *fishbone*, diketahui terdapat empat faktor utama yang terdiri dari delapan faktor dalam proses ekstraksi dan analisis yang berpotensi memengaruhi konsentrasi asam glutamat *edible seaweed* yang diperoleh. Faktor tersebut meliputi metode, pelarut hidrolisis, proses hidrolisis, serta metode/alat analisis. Faktor metode meliputi metode utama (hidrolisis) dan metode tambahan setelah hidrolisis. Faktor pelarut hidrolisis meliputi pelarut utama (katalis) dan pelarut tambahan yang digunakan. Faktor proses hidrolisis meliputi alat pemanas, suhu, dan waktu yang dipilih untuk hidrolisis. Berikut pembahasan dari masing-masing faktor tersebut yang disusun berdasarkan tabel hasil.

#### **4.1. Metode**

##### **4.1.1. Perbandingan Metode Hidrolisis secara Kimiawi, Enzimatis, dan Ultrasonikasi**

Hidrolisis merupakan metode utama dalam proses ekstraksi asam glutamat *edible seaweed*, dimana protein dalam bahan tersebut diberi air lalu mengalami reaksi substitusi nukleofilik atau dekomposisi ganda sehingga terjadi pemutusan ikatan-ikatan dalam protein dan menghasilkan campuran komponen penyusun protein, salah satunya asam glutamat, salah satu jenis asam amino (Daintith, 2008; Speinght, 2017; Murphy & Robert, 2007; Speinght, 2018). Saat ini, hidrolisis dapat dilakukan dengan berbagai jenis metode, diantaranya dengan pelarut atau katalis (hidrolisis secara kimiawi), enzim (hidrolisis secara enzimatis), atau ultrasonikasi. Di antara ketiga jenis metode tersebut, hidrolisis secara kimiawi merupakan metode yang paling sering digunakan.

Hidrolisis secara kimiawi merupakan metode hidrolisis dengan menambahkan pelarut selain air yang berperan sebagai katalis yang berfungsi untuk mempercepat proses hidrolisis (Speinght, 2017; Rostagno & Juliana, 2013). Hidrolisis hanya dengan air membutuhkan waktu yang sangat lama dan tidak semua senyawa yang diinginkan dari

suatu bahan pangan dapat diperoleh. Hal tersebut disebabkan karena ikatan-ikatan kimia dalam bahan pangan (khususnya nabati) cenderung sangat kompleks, oleh karena itu hidrolisis dilakukan dengan katalis (Speinght, 2018). Di antara metode hidrolisis secara kimiawi, metode yang paling sering digunakan adalah metode standar yaitu hidrolisis dengan HCl 6N pada suhu 110°C selama 18–24 jam atau 20–24 jam, dimana 24 jam merupakan waktu yang paling umum digunakan (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Toldra & Leo, 2021).

Meskipun begitu, hidrolisis secara kimiawi memiliki banyak kekurangan, yaitu membutuhkan jumlah pelarut yang banyak, waktu proses lama, serta perlu pemanasan pada suhu tinggi. Ketiga hal tersebut diketahui dapat menyebabkan degradasi atau kerusakan senyawa target yang mengakibatkan hilangnya fungsi senyawa target, berkurangnya konsentrasi senyawa yang diperoleh, serta munculnya masalah toksisitas pada hasil hidrolisis (Syed, 2010). Kekurangan metode hidrolisis secara kimiawi tersebut mendorong pengembangan metode hidrolisis yang menghasilkan proses yang lebih cepat dan ramah lingkungan, hasil hidrolisis yang lebih aman bagi manusia, serta yang paling penting yaitu konsentrasi senyawa target yang diperoleh lebih optimal (Rostagno & Juliana, 2013). Metode hidrolisis yang berbeda diharapkan menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berbeda pula; lebih baik dibanding metode standar yang sudah umum digunakan (Sikorski, 2001). Berdasarkan hasil *review* ini (Tabel 3.1.1.), diketahui bahwa penggunaan jenis metode utama (hidrolisis) yang berbeda terbukti memengaruhi konsentrasi asam glutamat *edible seaweed* yang diperoleh. Berikut penjelasan masing-masing jenis metode utama (hidrolisis) selain metode hidrolisis secara kimiawi.

#### **a. Hidrolisis secara Enzimatis**

Penggunaan metode hidrolisis secara enzimatis dengan 10% bromelin yang diinkubasi dalam oven bersuhu 50°C selama 3 jam (data [6b]: 0.013 g/100g dw *seaweed*) diketahui menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang jauh lebih rendah dibanding metode standar yaitu hidrolisis secara kimiawi dengan HCl 6N yang diinkubasi dalam oven bersuhu 110°C selama 24 jam (data [6a]: 2.220 g/100g dw *seaweed*). Hidrolisis secara enzimatis merupakan salah satu metode alternatif untuk mengatasi kekurangan

hidrolisis secara kimiawi sehingga penggunaan metode ini diharapkan dapat menghasilkan konsentrasi asam glutamat dengan jumlah dan kualitas yang lebih baik (Rutherford & Sarwar, 2009; Fountoulakis & Hans–Werner, 1998). Namun data yang diperoleh dalam *review* ini menunjukkan hasil yang berkebalikan. Hal ini dapat terjadi karena keberhasilan hidrolisis dengan enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis sampel, prakondisi sampel, jenis dan konsentrasi enzim yang digunakan, serta suhu dan waktu inkubasi (Syed, 2010).

Dalam *review* ini, *seaweed* yang dihidrolisis secara enzimatik adalah *Gracilaria fisheri* yang termasuk ke dalam jenis *seaweed* merah (*rhodophyta*). *Seaweed* merupakan bahan pangan nabati yang secara umum memiliki ikatan kimia yang sangat kompleks (Speinght, 2018). Ikatan kompleks tersebut dapat ditemukan pada dinding sel *seaweed* yang tersusun dari berbagai jenis polisakarida (Walsh, 2002; Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2013). Secara umum polisakarida yang mendominasi *seaweed* merah (*rhodophyta*) adalah agar atau karagenan (El-Sheekh & Abd El-Fatah, 2021). Pada genus *Gracilaria*, agar merupakan polisakarida utama yang menyusun dinding sel. Struktur dinding sel yang kompleks pada *seaweed* memiliki beberapa fungsi, salah satunya untuk bertahan dalam kondisi salinitas, pH, dan suhu yang ekstrem (Lee et al., 2017). Hal inilah yang menyebabkan proses ekstraksi protein dan asam amino dari dalam sel menjadi sulit. Salah satu cara yang umum dilakukan ketika ingin mengekstraksi protein untuk diambil asam glutamatnya yaitu dengan merusak ikatan dalam dinding sel *seaweed* (*cell disruption*) dan/atau memisahkan senyawa tersebut dari senyawa target (Bonner, 2019). Hal ini dilakukan juga pada spesies *Gracilaria fisheri* (jurnal [6]), dimana agar yang merupakan komponen penyusun utama dinding sel dihilangkan (metode tidak disebutkan) sebelum proses hidrolisis secara enzimatik sehingga proses hidrolisis protein seharusnya dapat berlangsung lebih optimal, tetapi hasil *review* yang diperoleh berkebalikan.

Kemudian, jenis dan konsentrasi enzim serta waktu dan suhu inkubasi juga dapat menjadi penyebab rendahnya konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis secara enzimatik. Dalam *review* ini, enzim yang sudah pernah digunakan untuk hidrolisis protein menjadi komponen asam amino termasuk asam glutamat adalah

bromelin batang (EC3.4.22.32: 119.325U/g) (jurnal [6]). Bromelin merupakan salah satu enzim proteolitik yang tergolong dalam enzim hidrolase, peptidase, dan merupakan endopeptidase sistein (katalisnya berupa sistein) (NCBI, 2021; Nabavi & Ana, 2019). Pemilihan kombinasi konsentrasi enzim serta suhu dan waktu hidrolisis dilakukan pada jurnal tersebut. Dari beberapa kombinasi, diketahui bahwa kondisi optimal untuk hidrolisis protein *edible seaweed* yaitu dengan menambahkan 10% bromelin ke dalam sampel yang pH-nya sudah diatur menjadi pH 6, lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 3 jam. Pemilihan kombinasi tersebut sudah sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa enzim bromelin bekerja secara optimal pada pH 6-8.5 dan kisaran suhu 50-60°C (Kuddus, 2019). Oleh karena itu, konsentrasi enzim, pH, serta suhu dan waktu inkubasi bukan penyebab rendahnya konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dengan metode hidrolisis secara enzimatis.

Jika bukan konsentrasi enzim yang kurang tepat, maka penyebab rendahnya konsentrasi asam glutamat yang diperoleh adalah jenis enzim yang digunakan. Jenis enzim berkaitan dengan mekanisme kerja enzim dalam menghidrolisis polimer (Jenkins & Artemis, 2012). Pada enzim bromelin, sistein bertindak sebagai nukleofil (pendonor elektron) dan menyerang elektrofil (senyawa yang kekurangan elektron) pada substrat berupa ikatan peptida internal dari rantai protein (Nabavi & Ana, 2019; Caballero, 2016; Speinght, 2018). Enzim bromelin batang memiliki spesifitas yang luas untuk pemisahan protein dan bekerja secara optimal pada substrat [Z-Arg-Arg|-NHMec] (NCBI, 2021). Secara sederhana, dapat dikatakan bahwa enzim bromelin batang sangat baik digunakan untuk memisahkan berbagai jenis protein yang berbeda dalam suatu kompleks protein, dengan cara memotong ikatan peptida setelah ditemukan dua asam amino arginin secara berurutan. Dari penjelasan tersebut, jelas bahwa enzim bromelin batang tidak cocok digunakan untuk hidrolisis protein menjadi komponen asam amino. Ketidakkcocokan enzim menyebabkan asam glutamat atau asam amino yang lain tidak terhidrolisis atau tidak terpisah secara optimal sehingga sulit untuk terdeteksi oleh alat analisis yang sudah dirancang untuk mendeteksi berbagai jenis asam amino.

Secara umum, masalah tersebut dapat diatasi dengan mengganti enzim, menggunakan kombinasi beberapa enzim, atau dikombinasikan dengan jenis metode hidrolisis yang lain. Pergantian enzim dapat dilakukan dengan menggunakan enzim yang bertugas untuk hidrolisis protein menjadi komponen asam amino termasuk asam glutamat. Salah satu contohnya adalah enzim bromelin buah yang memiliki spesifitas yang luas untuk ikatan peptida. Meskipun dapat memotong berbagai jenis ikatan tapi pemotongan secara optimal hanya terjadi pada substrat [Z-Phe-Val-Arg-|-NHMe], bahkan sama sekali tidak bereaksi pada substrat [Z-Arg-Arg-|-NHMe] (NCBI<sup>k</sup>, 2021). Hal ini memungkinkan terjadinya proses hidrolisis yang kurang optimal sehingga asam glutamat tidak terpisah dengan baik dan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh menjadi kurang optimal. Kemudian, pemisahan antar senyawa secara optimal dapat dicapai dengan menggunakan kombinasi beberapa enzim (Daintith, 2008; Toldra & Leo, 2021). Namun, proses menentukan jenis enzim yang akan digunakan itu tidak mudah. Banyak hal yang perlu diperhatikan, seperti mengetahui kecocokan substrat dengan enzim dengan cara mencari urutan asam amino (*amino acid sequence*) *edible seaweed*, menentukan perlakuan untuk *edible seaweed* sebelum hidrolisis, serta mencari konsentrasi enzim, suhu, dan waktu inkubasi yang cocok untuk *seaweed*. Selain itu, penggunaan lebih dari satu enzim tentu membutuhkan biaya yang sangat tinggi.

Oleh karena itu, meskipun hidrolisis secara enzimatik mampu mengatasi masalah yang muncul dalam hidrolisis secara kimiawi, tetapi kurang cocok untuk diterapkan dalam skala besar atau menengah, seperti produksi senyawa asam glutamat dari *edible seaweed* yang akan digunakan sebagai bahan utama pembuatan bumbu penyedap. Selain karena biaya produksinya akan sangat tinggi, enzim hanya bekerja optimal pada substrat tertentu saja, artinya kemungkinan besar terdapat ikatan yang tidak terpotong. Hal tersebut berbeda dengan hidrolisis secara kimiawi yang dikenal dapat memotong berbagai jenis ikatan dalam suatu senyawa kompleks (Speinght, 2018).

Kemudian, selain jenis metode hidrolisis, konsentrasi asam glutamat *Gracilaria fisheri* yang diperoleh dalam *review* ini kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Setelah hidrolisis, pada data [6a]

langsung dilakukan proses derivatisasi, sedangkan pada data [6b] dilakukan proses pemanasan (95°C 15 menit), sentrifugasi, dan penyaringan sebelum proses derivatisasi. Derivatisasi umum dilakukan ketika hasil hidrolisis akan dianalisis dengan metode kromatografi cair (LC). Derivatisasi merupakan proses perubahan senyawa tertentu menjadi senyawa lain yang serupa dengan senyawa awal agar batas deteksi (sensitivitas atau spesifisitas) senyawa tersebut meningkat sehingga dapat lebih mudah dideteksi (Rutherford & Sarwar, 2009; Caballero et al., 2016; Caballero, 2003; Worsfold et al., 2005). Lalu, pemanasan, sentrifugasi, dan penyaringan merupakan proses yang umum dilakukan setelah menggunakan enzim. Hal tersebut wajib dilakukan untuk menghentikan kerja enzim serta memisahkan enzim dari senyawa target agar tidak mengganggu proses selanjutnya. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis tidak memengaruhi konsentrasi asam glutamat *Gracilaria fisheri* yang diperoleh, karena pemanasan merupakan proses yang wajib dilakukan setelah hidrolisis secara enzimatik, artinya pengaruhnya tidak akan sebesar pengaruh jenis enzim yang digunakan.

#### **b. Hidrolisis dengan Ultrasonikasi**

Ultrasonikasi merupakan suatu metode yang memanfaatkan perambatan gelombang suara ultrasonik (20kHz hingga 10MHz) untuk berbagai tujuan, salah satunya untuk menghidrolisis senyawa sehingga hasil ekstraksi berbagai senyawa penting dapat meningkat (Rostagno & Juliana, 2013; Syed, 2010). Teori tersebut sesuai dengan hasil *review* yang diperoleh. Berbeda dengan hidrolisis secara enzimatik, penggunaan metode hidrolisis dengan ultrasonikasi (jurnal [14]: 4.633 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat *Pyropia yezoensis* yang lebih tinggi dibanding modifikasi metode standar yaitu hidrolisis secara kimiawi dengan HCl 6N yang diinkubasi dalam oven bersuhu 120°C selama 20 jam (jurnal [61]: 0.580–2.630 g/100g dw *seaweed*). Konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi tersebut dapat disebabkan oleh beberapa hal. Pertama, peran gelombang ultrasonik yang digunakan dalam proses ultrasonikasi mirip dengan pelarut (katalis) yang digunakan dalam metode hidrolisis secara kimiawi, yaitu dapat memotong berbagai jenis ikatan kimia meskipun mekanisme kerjanya berbeda. Hidrolisis dengan ultrasonikasi dapat dilakukan dengan air saja, kecuali untuk hidrolisis bahan pangan nabati seperti *edible*

*seaweed* yang memiliki struktur dinding sel yang kompleks (Walsh, 2002; Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2013). Masalah tersebut dapat diatasi dengan melakukan kombinasi beberapa jenis metode hidrolisis agar dapat bekerja secara sinergis dan lebih efisien, sehingga hasil hidrolisis yang diperoleh lebih optimal. Di antara dua jenis metode hidrolisis yang lain, hidrolisis secara kimiawi merupakan jenis metode yang paling umum digunakan karena penggunaan pelarut (katalis) memiliki kinerja yang baik untuk berbagai bahan dan lebih murah dibanding menggunakan enzim (Rostagno & Juliana, 2013; Syed, 2010).

Pada jurnal [14], *edible seaweed* dihidrolisis dengan ultrasonikasi yang dikombinasikan dengan penambahan etanol. Selain air dan asam, etanol ( $\geq 70\%$ ) merupakan pelarut yang umum digunakan dalam proses hidrolisis senyawa dari bahan pangan (Rostagno & Juliana, 2013; Nollet, 2004; Verma, 2014). Hal ini disebabkan karena etanol termasuk pelarut yang memiliki efek racun paling rendah sehingga dapat digunakan dalam proses pengolahan pangan dengan syarat hanya meninggalkan sebagian kecil residu dalam produk akhir (Rostagno & Juliana, 2013). Selain itu, tidak perlu ada proses pemisahan atau pemurnian hasil hidrolisis karena etanol mudah menguap (titik didih:  $78.3^{\circ}\text{C}$ ) sehingga hanya perlu didiamkan saja (Nollet, 2004; Daintith, 2008; Verma, 2014). Dalam jurnal [14], dijelaskan bahwa hasil hidrolisis dengan ultrasonikasi dan penambahan pelarut etanol cukup didiamkan (evaporasi) selama 24 jam. Kemudian, meskipun menggunakan pelarut pada proses hidrolisis dengan ultrasonikasi, jumlah pelarut yang ditambahkan lebih kecil (15 ml/gram *seaweed*) dibanding hidrolisis dengan etanol saja tanpa ultrasonikasi (jurnal [63] *Ulva pertusa*: 250ml/gram *seaweed*). Hal ini membuktikan bahwa penggunaan ultrasonikasi dapat mengurangi jumlah pelarut yang digunakan untuk hidrolisis (Galanakis, 2019).

Selanjutnya, jika akan menggunakan pelarut etanol untuk menghidrolisis bahan yang kaya akan karbohidrat atau garam, maka kedua konsentrasi tersebut perlu dihilangkan terlebih dahulu karena dapat mengganggu proses hidrolisis (Katoch, 2011). Dalam jurnal [14] dijelaskan bahwa polisakarida pada dinding sel tidak dihilangkan tetapi *seaweed* sudah dihidrolisis dengan metode *subcritical water* sebelum proses hidrolisis dengan ultrasonikasi dilakukan. *Subcritical water hydrolysis* merupakan salah satu



metode hidrolisis baru yang menerapkan penggunaan suhu dan tekanan tinggi pada air, yaitu suhu dan tekanan diantara titik didih air (100°C; 1bar) dan titik kritis air (374°C;  $\geq 220$ bar; *supercritical water*). Air yang dikondisikan diantara titik didih dan titik kritis akan mengalami perubahan konstanta dielektrik ( $\epsilon$ : menunjukkan polaritas pelarut) dari 80 menjadi 24 pada suhu 250°C. Selain itu, air juga akan mengalami peningkatan proses disosiasi (pemecahan senyawa menjadi ion penyusunnya) yang menyebabkan jumlah ion meningkat hingga mencapai suhu 250°C. Konstanta dielektrik yang rendah dan jumlah ion yang tinggi menyebabkan air (*subcritical water*) dapat menjadi pelarut yang cocok untuk hidrolisis berbagai senyawa organik termasuk polisakarida pada dinding sel *seaweed* yang menghalangi proses hidrolisis protein dalam sel (Anikeev & Maohong, 2014).

Kemudian, hidrolisis dengan ultrasonikasi dilakukan pada suhu ruang dan waktu yang singkat yaitu 1 jam (jurnal [14]). Selama proses memang terjadi peningkatan suhu tetapi tidak setinggi suhu hidrolisis secara kimiawi. Peningkatan suhu berpotensi menghasilkan efisiensi yang lebih tinggi karena dapat meningkatkan jumlah gelembung, area kontak sampel-pelarut, serta difusivitas pelarut. Namun, efek tersebut berkurang ketika suhu lebih tinggi atau mendekati titik didih pelarut. Peningkatan suhu yang berlebihan menyebabkan kenaikan tekanan uap, penurunan viskositas dan tegangan permukaan, serta mendorong pertumbuhan gelembung yang sangat cepat sehingga lebih banyak uap pelarut yang masuk ke dalam rongga tersebut. Hal ini menyebabkan perbedaan tekanan di dalam serta luar gelembung berkurang dan akhirnya mengurangi efek sonikasi. Oleh karena itu, suhu perlu dioptimalkan sekaligus dikontrol selama proses ultrasonikasi agar tidak menimbulkan degradasi pada senyawa target. Selain itu, waktu kontak *edible seaweed* dengan pelarut juga tidak selama hidrolisis secara kimiawi sehingga dapat meminimalkan degradasi atau kerusakan pada senyawa target (Rostagno & Juliana, 2013). Dengan demikian, hidrolisis dengan ultrasonikasi tidak hanya memberikan hasil tertinggi, tetapi juga dapat menghemat konsumsi energi (biaya produksi) dan waktu proses, serta hasil yang diperoleh lebih berkualitas, artinya hasil dapat diolah lebih lanjut sebagai produk pangan yang aman bagi manusia (Rostagno & Juliana, 2013).

Selain jenis metode, konsentrasi asam glutamat *Pyropia yezoensis* dalam review ini kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis atau metode/alat analisis. Perbedaan metode tambahan antara jurnal [14] dan [61] adalah urutan proses evaporasi dan penyaringan. Pada jurnal [14], hasil hidrolisis dievaporasi lalu disaring, sedangkan pada jurnal [61] hasil hidrolisis disaring terlebih dahulu lalu dievaporasi. Penyaringan umumnya dilakukan untuk memisahkan padatan atau molekul yang berukuran besar dan tidak larut dari molekul yang berukuran kecil dan larut, sedangkan evaporasi (penguapan) merupakan proses perubahan wujud zat cair menjadi uap karena suhu zat cair melewati titik didihnya (Tiwari & Declan, 2015; Daintith, 2008). Evaporasi umumnya dilakukan untuk menghilangkan senyawa yang tidak diinginkan yaitu pelarut dari hasil hidrolisis (Sikorski, 2001). Proses penguapan tidak harus melalui pemanasan jika pelarut mudah menguap di suhu ruang (titik didih:  $\leq \pm 25^{\circ}\text{C}$ ) seperti HCl 6N, tetapi jika menggunakan atau menambahkan pelarut yang memiliki titik didih di atas suhu ruang ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) seperti fenol, maka proses pemanasan perlu dilakukan agar pelarut dapat menguap (Rostagno & Juliana, 2013; Adebisi, 2005).

Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa metode tambahan jurnal [61] kurang tepat. Hal ini disebabkan karena proses pemisahan pelarut (evaporasi) dilakukan setelah pemisahan senyawa (penyaringan), sehingga terdapat kemungkinan bahwa hasil hidrolisis kontak dengan HCl 6N lebih lama dari yang seharusnya dan menyebabkan degradasi atau kerusakan pada senyawa target. Namun jika dilihat pada metode tambahan jurnal [14], diketahui bahwa hasil hidrolisis kontak dengan etanol selama evaporasi yang berlangsung  $\pm 24$  jam, tetapi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tetap lebih tinggi. Hal tersebut menunjukkan bahwa pelarut asam lebih mudah mendegradasi atau merusak senyawa target dibanding etanol sehingga meskipun HCl 6N dapat menguap di suhu ruang tetapi proses lain seperti evaporasi tetap dibutuhkan untuk mempercepat proses penghilangan pelarut dari hasil hidrolisis. Selain itu, metode tambahan setelah hidrolisis terbukti bukan faktor utama yang memengaruhi konsentrasi asam glutamat *Pyropia yezoensis* yang diperoleh.

Selain faktor dalam proses ekstraksi dan analisis, perbedaan hasil kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor tersebut adalah perbedaan lokasi panen *seaweed*. Lokasi panen yang berbeda pada suatu negara berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* (contohnya salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Meskipun perbedaan lokasi panen berpengaruh, umumnya selisih hasil yang diperoleh relatif kecil. Namun, hasil *review* menunjukkan bahwa selisih konsentrasi asam glutamat yang diperoleh pada jurnal [14] dan [61] relatif besar. Hal tersebut menunjukkan bahwa perbedaan lokasi panen terbukti bukan faktor utama yang memengaruhi konsentrasi asam glutamat *Pyropia yezoensis* yang diperoleh.

#### **4.1.2. Perbandingan Kombinasi Metode Tambahan Setelah Proses Hidrolisis**

Selain metode utama berupa proses hidrolisis, terdapat metode lain yang digunakan setelah proses hidrolisis selesai. Dalam *review* ini, metode setelah hidrolisis disebut sebagai metode tambahan. Jenis metode tambahan yang ditemukan dalam *review* ini cukup beragam dan dapat dikelompokkan menjadi metode pemisahan, pengeringan, pelarutan, pengenceran, serta penetralan. Pemisahan merupakan salah satu proses yang umum dilakukan setelah hidrolisis dengan tujuan untuk menghilangkan kontaminan (garam, ion logam berat, protein, atau asam amino lain) dari asam amino yang diinginkan agar tidak mengganggu proses selanjutnya, serta dapat memperoleh senyawa target yang murni agar dapat diolah menjadi produk pangan (Tzia & George, 2003; Rostagno & Juliana, 2013; Armarego & Christina, 2009). Kemudian, pengeringan dilakukan untuk menghilangkan pelarut yang digunakan dalam proses hidrolisis sekaligus konsentrasi air dari hasil hidrolisis, melalui proses pemanasan dengan suhu yang relatif tinggi, sehingga hasil hidrolisis dapat disimpan beberapa hari bahkan beberapa bulan jika suhu penyimpanan lebih rendah (Rutherford & Sarwar, 2009).

Selanjutnya, pelarutan biasanya dilakukan setelah proses menghilangkan pelarut dari hasil hidrolisis atau sebelum asam amino dianalisis dengan tujuan untuk mengkondisikan senyawa yang akan dianalisis (Sikorski, 2001). Berbeda dengan pelarutan, pengenceran

merupakan proses penambahan sejumlah volume air atau pelarut pada suatu larutan, agar konsentrasinya berkurang atau lebih encer sehingga senyawa dapat dianalisis, khususnya jika akan dianalisis dengan prinsip kromatografi (Daintith, 2008; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Adebisi et al., 2005). Kemudian, penetralan merupakan proses dimana senyawa asam bereaksi dengan senyawa basa atau sebaliknya membentuk senyawa netral berupa garam dan air (Daintith, 2008). Penetralan sering dilakukan setelah hidrolisis secara kimiawi dengan asam, walaupun sebenarnya beberapa pelarut asam dapat menguap pada suhu ruang (Sikorski, 2001; Adebisi et al., 2005; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Namun dalam proses pengembangan bumbu penyedap dari asam glutamat, penetralan wajib dilakukan karena *umami* tidak akan terasa pada pH rendah, sehingga perlu dinetralkan menjadi bentuk garam (glutamat) agar nantinya ion glutamat (rasa *umami*) dapat terbentuk saat diaplikasikan ke masakan (de Man et al., 2018; Ronzio, 2003; Mouritsen & Klavs, 2014)

Metode tambahan yang digunakan pada tiap jurnal tidak hanya satu tetapi berupa kombinasi dari beberapa jenis metode. Penggunaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang berbeda ditemukan pada spesies *Porphyra umbilicalis* (*rhodophyta* atau *seaweed* merah), *Saccharina latissima* (*phaeophyta* atau *seaweed* coklat), serta *Ulva lactuca* dan *Ulva rigida* (*chlorophyta* atau *seaweed* hijau). Hidrolisis berbagai spesies tersebut dilakukan secara kimiawi dengan HCl 6N pada suhu 110°C selama 24 jam. Berdasarkan hasil *review* (Tabel 3.1.2.), terdapat empat kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang konsentrasi asam glutamatnya dapat saling dibandingkan dan/atau dibandingkan dengan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tanpa metode tambahan setelah hidrolisis. Berikut penjelasan masing-masing kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang sudah pernah dilakukan dan dapat dibandingkan.

#### **a. Kombinasi Metode Tambahan Jurnal [53]**

Di antara kombinasi metode tambahan yang sudah pernah dilakukan dan dapat dibandingkan, pengeringan hasil hidrolisis dengan metode *flushing with air* yang dilanjutkan dengan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N pada jurnal [53], merupakan kombinasi metode tambahan yang paling banyak dibandingkan karena sudah diterapkan pada berbagai spesies *seaweed* seperti *Porphyra umbilicalis*,

*Saccharina latissima*, dan *Ulva lactuca*. Penggunaan kombinasi metode tambahan jurnal [53] diketahui menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang cenderung lebih tinggi dibanding tidak menggunakan metode tambahan setelah hidrolisis atau menggunakan kombinasi metode tambahan jurnal [22] dan [10].

Secara umum, metode *flushing with air* digunakan untuk beberapa tujuan, salah satunya adalah pengeringan (Nouri & Eberhard, 2021). Pengeringan dengan metode *flushing with air* atau lebih umum disebut *convective (air) drying* merupakan metode pengeringan yang memanfaatkan aliran udara panas dan kering untuk menguapkan konsentrasi air dalam bahan sekaligus menghilangkan uap air dari permukaan bahan (Berk, 2009). Meskipun tidak sebaik *freeze drying* tetapi pengeringan *convective (air) drying* tetap mampu menjaga konsentrasi nutrisi jauh lebih baik dibanding pengeringan dengan suhu tinggi lainnya serta biaya operasionalnya tidak setinggi *freeze drying* sehingga sering digunakan untuk skala besar (produksi) (Jacob-Lopes et al., 2020; Gressler et al., 2010). Hasil hidrolisis yang telah dikeringkan selanjutnya dilarutkan kembali dengan HAc 0.2N untuk dianalisis. HAc merupakan singkatan dari *acetic acid* atau asam asetat ( $C_2H_4O_2$  atau  $CH_3COOH$ ) yang tergolong dalam asam lemah. Asam asetat memiliki banyak peran, salah satunya adalah sebagai *buffer* yang bersifat hidrofilik atau polar (Daintith, 2008; NCBI<sup>a</sup>, 2022; Fisher Scientific, 2022). Pada jurnal [53], *buffer* HAc digunakan sebagai fase gerak dalam proses analisis dengan metode atau alat RP-HPLC. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa fase gerak (*buffer*) yang bersifat polar digunakan ketika fase diam berupa kolom fase terbalik (*reverse phase column*) (Waldron, 1989; Makowski, 2019). Berikut pembahasan masing-masing spesies yang menggunakan kombinasi metode tambahan jurnal [53].

### 1) *Porphyra umbilicalis*

Pada *Porphyra umbilicalis*, penggunaan kombinasi metode tambahan berupa sentrifugasi, penetralan dengan *buffer* borat pH 10.2, penambahan norvalin, serta sentrifugasi setelah hidrolisis (jurnal [22]: 2.107–2.591 g/100g dw *seaweed*), diketahui menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dengan kombinasi metode tambahan

jurnal [53] (0.289–2.830 g/100g dw *seaweed*). Sentrifugasi merupakan metode pemisahan partikel padat dalam cairan dengan cara memutar tabung dalam lingkaran horizontal dengan gaya sentrifugal, sehingga partikel padat (pelet) akan bergerak di sepanjang tabung yang rotasinya lebih besar, sedangkan partikel yang lebih ringan (supernatan) akan bergerak berlawanan (Daintith, 2008; Hatti-Kaul & Bo, 2003; Nollet, 2004). Pada jurnal [22], sentrifugasi pertama dilakukan pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dengan tujuan untuk memisahkan asam amino dari senyawa lain yang lebih besar agar tidak mengganggu proses analisis.

Supernatan yang diperoleh selanjutnya dinetralkan dengan *buffer* borat pH 10.2. Penetralkan dilakukan karena supernatan memiliki pH rendah akibat penggunaan pelarut asam dalam proses hidrolisis. Selain agar asam amino tidak mengalami degradasi lebih lanjut, *buffer* borat pH 10.2 merupakan *buffer* yang digunakan sebagai fase gerak dalam proses analisis dengan metode atau alat RP-HPLC dengan sistem LC/MS sekaligus menjaga pH asam amino selama proses analisis (Merck<sup>a</sup>, 2022). Selanjutnya, larutan sampel analisis tersebut ditambah dengan larutan norvalin. Norvalin/*norvaline* (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>) merupakan senyawa asam amino non-proteinogenik, isomer dari asam amino valin, dan salah satu larutan standar internal (NCBI<sup>m</sup>, 2021; Rutherford & Sarwar, 2009). Penambahan larutan standar internal setelah hidrolisis bertujuan untuk mengurangi variabilitas data yang diperoleh dari proses analisis (Rutherford & Sarwar, 2009). Setelah itu, larutan sampel analisis disentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan senyawa yang tidak larut dalam larutan *buffer* borat pH 10.2 dan norvalin, lalu supernatan dianalisis.

Dari hasil yang telah disebutkan, tidak dapat langsung disimpulkan bahwa penggunaan kombinasi metode tambahan jurnal [53] lebih baik atau tidak lebih baik dibanding kombinasi metode tambahan jurnal [22]. Hal ini disebabkan karena data konsentrasi asam glutamat yang diperoleh berbentuk kisaran, artinya terdapat faktor di luar proses ekstraksi dan analisis asam glutamat yang kemungkinan memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor tersebut adalah perbedaan penggunaan proses ekstraksi protein sebelum proses hidrolisis. Pada

jurnal [53], terdapat satu data yang diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein dan terdapat tiga data yang diperoleh melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, sedangkan pada jurnal [22], *edible seaweed* tidak melalui proses ekstraksi protein sebelum proses hidrolisis. Jika data yang diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein kedua jurnal tersebut dibandingkan, maka konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dengan kombinasi metode tambahan jurnal [53] (2.830 g/100g dw *seaweed*) sedikit lebih besar dibanding dengan kombinasi metode tambahan jurnal [22] (2.107–2.591 g/100g dw *seaweed*).

Meskipun kondisi sebelum proses hidrolisis sama, tetapi tidak dapat langsung disimpulkan bahwa selisih yang relatif kecil tersebut disebabkan oleh perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Hal ini disebabkan karena terdapat dua faktor lain yang kemungkinan juga dapat menyebabkan perbedaan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah alat pemanas yang digunakan untuk hidrolisis berbeda, dimana hidrolisis pada jurnal [53] dilakukan dalam oven, sedangkan hidrolisis pada jurnal [22] dilakukan dalam blok pemanas. Kedua alat pemanas tersebut memiliki prinsip pemanasan yang berbeda yang berkaitan dengan cepat-lambatnya proses pemanasan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan alat pemanas terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Faktor kedua adalah negara asal *seaweed* kedua jurnal tersebut berbeda, dimana *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia, sedangkan *seaweed* jurnal [22] berasal dari Portugal. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen yang diketahui dapat memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa terdapat kemungkinan *Porphyra umbilicalis* yang dipanen di Portugal memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang sedikit lebih rendah dibanding yang dipanen di Swedia.

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa perbedaan konsentrasi asam glutamat *Porphyra umbilicalis* antara jurnal [53] dan [14] memang dapat disebabkan karena

perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis, dimana proses pengeringan segera setelah proses hidrolisis pada jurnal [53] membantu mempercepat proses menghilangkan pelarut dari hasil hidrolisis, sehingga kontak antara hasil hidrolisis dengan pelarut dapat diminimalkan, artinya degradasi atau kerusakan senyawa target dapat diminimalkan. Namun, selisih hasil yang kecil menunjukkan bahwa perbedaan hasil hanya dapat disebabkan oleh salah satu dari tiga faktor yang telah dijelaskan, atau jika pengaruh dari masing-masing faktor tersebut sangat kecil maka perbedaan hasil dapat disebabkan oleh gabungan dari ketiga faktor tersebut.

## 2) *Saccharina latissima*

Pada *Saccharina latissima*, penggunaan kombinasi metode tambahan jurnal [53] (0.0091–0.758 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang relatif lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [3] (0.00012–0.017 g/100g dw *seaweed*) yang tidak menggunakan metode tambahan setelah hidrolisis, dengan selisih tertinggi dan terendah yang sangat besar. Meskipun begitu, hasil tersebut tidak dapat langsung menunjukkan bahwa penggunaan kombinasi metode tambahan lebih baik dibanding tidak menggunakan metode tambahan setelah proses hidrolisis selesai. Hal ini disebabkan karena data konsentrasi asam glutamat yang diperoleh berbentuk kisaran, artinya terdapat faktor di luar proses ekstraksi dan analisis asam glutamat yang kemungkinan memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor tersebut adalah perbedaan jenis metode pengawetan *seaweed* serta ekstraksi protein sebelum proses hidrolisis.

*Seaweed* pada jurnal [3] melalui proses pengawetan berupa pengeringan (*sun drying, oven drying, freeze drying*), pembekuan ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ ), atau *ensiling*, sedangkan *seaweed* pada jurnal [53] hanya dikeringkan dengan metode *freeze drying* saja. Jika konsentrasi asam glutamat yang dikeringkan dengan metode *freeze drying* dibandingkan, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.0091–0.758 g/100g dw *seaweed*) lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [3] (0.00165–0.00494 g/100g dw *seaweed*). Selanjutnya, *seaweed* dari kedua jurnal yang dikeringkan dengan *freeze drying* tersebut, ada yang melalui



proses ekstraksi protein sebelum dihidrolisis dan ada yang tidak. Metode ekstraksi protein yang digunakan pada jurnal [53] meliputi metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent* (ASE), sedangkan pada jurnal [3] meliputi *pH-shift* klasik dan *pH-shift* yang telah dimodifikasi dengan *freeze thaw aided precipitation*.

Jika konsentrasi asam glutamat tanpa proses ekstraksi protein dibandingkan, maka konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.7575 g/100g dw *seaweed*) jauh lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [3] (0.02011 g/100g dw *seaweed*). Kemudian, jika konsentrasi asam glutamat dengan metode ekstraksi protein *pH-shift* dibandingkan, maka konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.349 g/100g dw *seaweed*) juga lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [3] (0.002979 g/100g dw *seaweed*). Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa penggunaan metode tambahan terbukti memengaruhi konsentrasi asam glutamat *Saccharina latissima* yang diperoleh, karena pada kondisi sebelum hidrolisis yang sama, konsentrasi asam glutamat jurnal [53] tetap jauh lebih tinggi dibanding jurnal [3]. Selain itu, selisih hasil yang relatif besar menunjukkan bahwa perbedaan hasil yang diperoleh juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain. Faktor tersebut adalah perbedaan alat pemanas, dimana hidrolisis pada jurnal [53] dilakukan dalam oven, sedangkan hidrolisis pada jurnal [3] dilakukan dalam blok pemanas. Kedua alat pemanas tersebut memiliki prinsip pemanasan yang berbeda yang berkaitan dengan cepat-lambatnya proses pemanasan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan alat pemanas terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

### 3) *Ulva lactuca*

Pada *Ulva lactuca*, penggunaan kombinasi metode tambahan jurnal [53] menghasilkan konsentrasi asam glutamat (0.155–2.078 g/100g dw *seaweed*) yang lebih tinggi dibanding jurnal [48] (0.012–0.019 g/100g dw *seaweed*) yang tidak menggunakan metode tambahan setelah hidrolisis. Hasil tersebut dapat langsung menunjukkan bahwa penggunaan kombinasi metode tambahan lebih baik dibanding tidak menggunakan metode tambahan setelah proses hidrolisis selesai.

Namun untuk memperjelas seberapa besar pengaruh penggunaan metode.tambahan setelah hidrolisis, hasil dalam bentuk kisaran tersebut perlu dijabarkan terlebih dahulu. Pertama, hasil jurnal [53] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dengan melalui proses ekstraksi protein sebelum hidrolisis dan satu data diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein sebelum hidrolisis. Kedua, hasil jurnal [48] terdiri dari tiga data yang diperoleh dari *seaweed* dengan musim panen yang berbeda dan tidak melalui proses ekstraksi protein.

Jika data konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein dibandingkan, maka konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dengan metode tambahan jurnal [53] (2.078 g/100g dw *seaweed*) jauh lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat tanpa metode tambahan (jurnal [48]: 0.012–0.019 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sebenarnya sudah dapat menunjukkan bahwa penggunaan metode tambahan jurnal [53] memiliki pengaruh yang besar pada konsentrasi asam glutamat yang akan diperoleh, jika tidak ada faktor lain yang dapat memengaruhi. Masalahnya, selain kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis, konsentrasi asam glutamat *Ulva lactuca* yang diperoleh dalam *review* ini juga dapat dipengaruhi oleh perbedaan metode atau alat analisis dan negara asal *seaweed*. Analisis pada jurnal [53] dilakukan dengan RP–HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [48] dilakukan dengan LC3000 *amino acid analyzer*. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Selain itu, negara asal *seaweed* kedua jurnal tersebut juga berbeda, dimana *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia, sedangkan *seaweed* jurnal [48] berasal dari Mesir. Seperti yang sudah dijelaskan sebelumnya, negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen yang diketahui dapat memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada

kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Mesir memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang jauh lebih rendah dibanding seaweed yang dipanen di Swedia. Dengan demikian, selisih hasil yang besar dapat disebabkan oleh perbedaan penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis saja atau gabungan antara faktor metode tambahan dengan faktor metode atau alat analisis dan negara asal *seaweed*.

Selanjutnya, penggunaan kombinasi metode tambahan jurnal [53] (0.155–2.078 g/100g dw *seaweed*) pada *Ulva lactuca* juga menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dengan kombinasi metode tambahan berupa pengeringan dengan metode *vacuum drying*, derivatisasi dengan reagen PITC, pengeringan dengan metode *vacuum drying*, pelarutan dengan *buffer* fosfat, pengaturan pH menjadi 7.4 dengan asetonitril, serta penyaringan (jurnal [10]: 0.0026 g/100g dw *seaweed*). Hasil ini tidak dapat langsung diartikan bahwa penggunaan kombinasi metode tambahan jurnal [53] lebih baik dibanding penggunaan kombinasi metode tambahan jurnal [10]. Hal ini disebabkan karena beberapa hal tidak sesuai dengan teori yang sudah ada. Pertama, pengeringan dengan metode *vacuum drying* lebih baik dibanding pengeringan dengan *flushing with air* atau *convective (air) drying*. Hal ini disebabkan karena *vacuum drying* mengeringkan hasil hidrolisis dengan menurunkan tekanan dan menghilangkan oksigen selama proses sehingga titik dididih pelarut menjadi lebih rendah dan waktu pengeringan menjadi lebih singkat (Uribe et al., 2018 dalam Gressler et al., 2010; Devahastin, 2017; McNeil et al., 2013).

Kedua, hasil hidrolisis kering kedua jurnal tersebut sama-sama dilarutkan, bedanya hasil hidrolisis kering jurnal [53] langsung diberi *buffer* borat pH 10.2, sedangkan hasil hidrolisis kering jurnal [10] diderivatisasi terlebih dahulu baru setelah itu diberi *buffer* fosfat 5mM. Derivatisasi (*derivatization*) merupakan proses perubahan senyawa target menjadi senyawa lain yang serupa (*derivate*) dengan senyawa awal untuk membuat senyawa target lebih hidrofobik agar dapat terpisah dari senyawa lain dengan baik serta batas deteksi (sensitivitas atau spesifisitas) meningkatkan sehingga hasil pemisahan dapat dideteksi (Rutherford & Sarwar, 2009; Caballero et al., 2016; Caballero, 2003; Worsfold et al., 2005). Berdasarkan

penjelasan tersebut, seharusnya konsentrasi asam glutamat jurnal [10] lebih tinggi dibanding jurnal [53], tetapi ternyata tidak. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis tidak terlalu memengaruhi hasil. Oleh karena itu, kemungkinan terdapat faktor lain di luar metode tambahan yang memengaruhi konsentrasi asam glutamat *Ulva lactuca* yang diperoleh.

Faktor pertama adalah perbedaan jenis metode ekstraksi protein kedua jurnal tersebut. Pada jurnal [10] *seaweed* melalui proses ekstraksi protein dengan alkali (NaOH 1N) pada suhu 80°C lalu didinginkan dan dinetralkan dengan HCl 6N, sedangkan pada jurnal [53], *seaweed* melalui salah satu dari tiga proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE). Sonikasi atau ultrasonikasi merupakan suatu metode yang memanfaatkan perambatan gelombang suara ultrasonik (20kHz hingga 10MHz) untuk berbagai tujuan, salah satunya untuk hidrolisis senyawa tertentu sehingga proses dan hasil ekstraksi berbagai senyawa penting dapat meningkat (Rostagno & Juliana, 2013; Syed, 2010). Pada jurnal [53], ultrasonikasi dilakukan dengan pelarut air selama 1 jam. Hidrolisis dengan ultrasonikasi dapat dilakukan dengan air saja, kecuali untuk hidrolisis bahan pangan nabati seperti *seaweed* yang memiliki struktur dinding sel kompleks (Walsh, 2002; Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2013). Masalah ini dapat diatasi dengan melakukan kombinasi beberapa metode agar dapat bekerja secara sinergis dan lebih efisien sehingga diperoleh hasil yang lebih optimal.

Di antara dua jenis metode hidrolisis lain, hidrolisis secara kimiawi merupakan jenis metode yang paling umum digunakan karena penggunaan pelarut memiliki kinerja yang baik untuk berbagai bahan dan lebih murah dibanding menggunakan enzim (Rostagno & Juliana, 2013; Syed, 2010). Pada jurnal [53] proses ultrasonikasi dilanjutkan dengan proses presipitasi (pengendapan) menggunakan amonium sulfat. Amonium sulfat merupakan garam netral yang umum digunakan sebagai agen presipitasi protein karena memiliki kelarutan yang tinggi, tidak mendenaturasi sebagian besar protein, dapat menstabilkan protein, dan tidak mahal. Penambahan garam netral dalam jumlah kecil dapat meningkatkan kelarutan

protein (*salting in*), namun, ketika konsentrasi garam ditingkatkan hingga melebihi batas optimal, protein dalam larutan menjadi tidak stabil dan akhirnya mengendap (*salting out*) (Walsh, 2002). Pada konsentrasi tinggi, sebagian besar air akan berikatan dengan ion sulfat dari garam sehingga sebagian besar molekul protein tidak bisa berikatan dengan air (Rosenberg, 1996). Akibatnya interaksi antar protein meningkat, terutama permukaan molekul protein yang bersifat hidrofobik akan saling berinteraksi sehingga terbentuk endapan protein (Walsh, 2002).

Kemudian, metode *pH-shift* (pergeseran pH) merupakan metode ekstraksi dengan alkali (larutan basa) yang diikuti dengan pengendapan isoelektrik (jurnal [53]). Sebelum proses ekstraksi dinding sel *seaweed* dipecah dengan metode *osmotic shock*. Prinsip kerja metode ini adalah mengubah tekanan turgor (tekanan yang dibutuhkan agar sel utuh; umumnya 2-6 atm) untuk memengaruhi elastisitas dan variasi ukuran pori-pori dinding sel atau membran sel sehingga komponen intraseluler dapat keluar. Proses *osmotic shock* dimulai ketika sel yang normal diberi larutan hipertonik (larutan garam atau gula), sel akan mengalami penyusutan (*shrinking*). Kemudian, sel tersebut diberi larutan hipotonik (air dingin) sehingga sel yang sebelumnya menyusut menjadi membengkak (*swelling*). Proses penyusutan (*shrinking*) dan pembengkakan (*swelling*) menyebabkan perubahan elastisitas dan memperbesar ukuran pori-pori dinding sel atau membran sel sehingga terjadi pelepasan komponen intraseluler ke luar dinding sel (Show, 2019).

Setelah dinding sel *seaweed* mengalami proses *osmotic shock*, pH optimal untuk ekstraksi ditentukan dengan cara mengukur kelarutan protein dalam larutan *seaweed* secara bertahap pada rentang pH basa (hingga pH 13) dengan NaOH 1M dan dari proses tersebut diketahui bahwa kelarutan optimal protein terjadi pada pH 12. *Alkali extraction* merupakan metode ekstraksi dengan menggunakan larutan alkali (basa), dimana jika suatu sel diberi larutan alkali maka ion  $\text{OH}^-$  dari senyawa alkali akan merusak asam lemak gliserol dan ikatan pada dinding sel sehingga permeabilitas sel meningkat dan komponen intraseluler dapat keluar dengan mudah (Show, 2019). Selain itu, penggunaan larutan alkali memang lebih efektif

dibandingkan larutan lainnya karena protein cenderung lebih mudah terekstraksi dalam kondisi basa (Barbarino & Lourenço, 2005).

Lalu, larutan *seaweed* diendapkan dengan mengatur pH antara 2–6 untuk *Ulva lactuca* dengan HCl 1M, dan diketahui bahwa pengendapan protein secara optimal terjadi pada pH 2. Pengendapan akan lebih mudah terjadi pada titik isoelektrik protein (Rosenberg, 1996; Scopes, 1994). Titik isoelektrik protein ( $I_p$ ) adalah pH dimana protein menjadi netral secara elektrik, artinya pada pH tersebut keseluruhan muatan pada protein adalah nol atau bisa diartikan dalam protein jumlah muatan positif sama dengan jumlah muatan negatif. Umumnya, molekul yang membawa muatan yang sama akan saling menolak sehingga terbentuk dispersi yang stabil dalam air. Namun pada titik isoelektrik, gaya tolak muatan menjadi hilang sehingga molekul dapat saling berinteraksi dan membentuk endapan (Vaclavik & Christian, 2008). Pada jurnal [53], metode ini menghasilkan konsentrasi asam glutamat tertinggi dibanding 2 metode lainnya sehingga metode ini berpotensi untuk digunakan dalam produksi protein dan asam amino *seaweed* yang akan digunakan dalam bahan pangan.

Selanjutnya, *accelerated solvent extraction* (ASE) atau *pressurized liquid extraction* (PLE) merupakan metode ekstraksi protein yang menggabungkan suhu dan tekanan untuk menghasilkan ekstrak dengan menggunakan pelarut *food grade*, dimana sebelum protein diekstraksi dilakukan proses penghilangan senyawa lipid dan florotanin (senyawa fenolik) (Lopes et al., 2012 dalam jurnal [53]). Lipid diekstraksi dengan pelarut heksana. Lalu hasilnya digunakan sebagai sampel untuk ekstraksi florotanin dengan campuran silika dan 70% aseton *food grade* dalam air pada tekanan 1000 psi dan suhu 0°C selama 7 menit/siklus. Hasil yang diperoleh digunakan sebagai sampel untuk ekstraksi protein dengan silika dan 50% metanol dalam air pada tekanan 1500 psi dan suhu 37 °C selama 2 siklus (5 menit/siklus) lalu dikeringkan. Penggunaan metode ini menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *pH-shift* tetapi lebih tinggi dibanding metode tradisional. Hal ini dapat disebabkan karena terjadi degradasi protein selama proses

ekstraksi lipid dan florotanin atau ekstraksi secara kimiawi (ASE) lebih efektif dibanding kombinasi ekstraksi secara fisik (sonikasi) dan kimiawi (presipitasi).

Kemudian pada jurnal [10], *seaweed* melalui proses ekstraksi protein yang disebut *alkali-acid extraction*. Dalam kombinasi pelarut ekstraksi protein, pelarut pertama berfungsi untuk memecah dinding sel sedangkan pelarut kedua berfungsi sebagai pelarut protein (Barbarino & Lourenço, 2005). *Alkali extraction* merupakan metode ekstraksi dengan menggunakan larutan alkali (basa), dimana jika suatu sel diberi larutan alkali maka ion  $\text{OH}^-$  dari senyawa alkali akan merusak asam lemak gliserol dan ikatan pada dinding sel sehingga permeabilitas sel meningkat dan komponen intraselular dapat keluar dengan mudah (Show, 2019). Kemudian penggunaan HCl dengan konsentrasi yang tinggi (6N) sebagai larutan kedua tidak tepat karena protein lebih larut pada kondisi basa dibanding asam sehingga penambahan HCl sebenarnya tidak perlu dilakukan karena tidak terlalu berpengaruh pada konsentrasi protein yang diperoleh, bahkan justru berpotensi menyebabkan kehilangan protein sebelum hidrolisis (Barbarino & Lourenço, 2005). Meskipun penggunaan tiga metode ekstraksi jurnal [53] tidak menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih baik dibanding tanpa menggunakan metode ekstraksi protein, tetapi penggunaan kombinasi jenis metode, pelarut, dan suhu pada tiga metode tersebut lebih baik dibanding metode ekstraksi jurnal [10].

Faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed* yang berbeda, dimana *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia sedangkan *seaweed* jurnal [10] berasal dari India. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di India memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding yang dipanen di Swedia. Selain itu, sampel yang digunakan untuk hidrolisis pada jurnal [10] merupakan sisa hasil proses ekstraksi berturut-turut getah, lipid, ulvan, dan protein. Berbeda dengan metode ASE pada jurnal [53], semua ekstraksi senyawa pada jurnal

[10] dilakukan pada suhu tinggi sehingga jumlah protein yang diperoleh setiap proses selesai mengalami penurunan. Dari penjelasan tersebut diketahui bahwa faktor-faktor di luar metode tambahan tersebut lebih berpengaruh dibanding faktor metode tambahan, serta menjadi faktor utama yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh pada jurnal [10] jauh lebih rendah.

## **b. Kombinasi Metode Tambahan Jurnal [10] dan [16]**

Selain metode kombinasi tambahan jurnal [53], terdapat kombinasi metode tambahan lain yang sudah pernah digunakan dan dapat dibandingkan. Kombinasi metode tambahan ini ditemukan pada spesies *Ulva lactuca* dan *Ulva rigida*.

### **1) *Ulva lactuca***

Pada *Ulva lactuca*, penggunaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis (HCl 6N oven 110°C 24 jam) berupa pengeringan dengan metode *vacuum drying*, derivatisasi dengan reagen PITC, pengeringan dengan metode *vacuum drying*, pelarutan dengan *buffer* fosfat, pengaturan pH menjadi 7.4 dengan asetonitril, serta penyaringan (jurnal [10]: 0.0026 g/100g dw *seaweed*), menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat (0.012–0.019 g/100g dw *seaweed*) yang diperoleh tanpa menggunakan metode tambahan setelah hidrolisis. Hasil ini bertentangan dengan hasil sebelumnya yang menunjukkan bahwa penggunaan metode tambahan dapat menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh lebih baik dibanding tanpa penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis. Hasil yang bertentangan tersebut dapat terjadi karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang dapat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan metode ekstraksi protein kedua jurnal tersebut. Pada jurnal [10] *seaweed* melalui proses ekstraksi protein dengan alkali (NaOH 1N) pada suhu 80°C lalu didinginkan dan dinetralkan dengan HCl 6N, sedangkan pada jurnal [48], *seaweed* tidak melalui proses ekstraksi protein. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa *alkali-acid extraction*, metode ekstraksi protein yang digunakan pada jurnal [10], merupakan metode ekstraksi protein yang



kurang tepat karena penggunaan HCl 6N sebagai pelarut kedua tidak lebih baik dibanding larutan alkali dalam melarutkan protein. Bahkan justru berpotensi menyebabkan kehilangan protein sebelum hidrolisis (Barbarino & Lourenço, 2005). Selain itu, sampel yang digunakan untuk hidrolisis pada jurnal [10] merupakan sisa hasil proses ekstraksi berturut-turut getah, lipid, ulvan yang dilakukan pada suhu tinggi sehingga jumlah protein yang diperoleh setiap proses selesai mengalami penurunan.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [10] berasal dari India, sedangkan *seaweed* jurnal [48] berasal dari Mesir. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di India memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding yang dipanen di Mesir. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis, dimana analisis pada jurnal [10] dilakukan dengan RP-HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [48] dilakukan dengan LC3000 *amino acid analyzer*. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dari penjelasan tersebut diketahui bahwa faktor-faktor di luar metode tambahan tersebut lebih berpengaruh dibanding faktor metode tambahan, serta menjadi faktor utama yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh pada jurnal [10] jauh lebih rendah.

## 2) *Ulva rigida*

Pada *Ulva rigida*, penggunaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis (HCl 6N 110°C 24 jam) berupa pengeringan dengan metode *vacuum drying*, pelarutan dengan air deionisasi, penambahan *buffer* borat, serta derivatisasi dengan etoksi

metilen malonat (jurnal [16]: 1.060–2.260 g/100g dw *seaweed*), menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dengan menggunakan kombinasi metode tambahan jurnal [22] (0.947 g/100g dw *seaweed*) setelah hidrolisis. Hasil yang lebih tinggi pada jurnal [16] disebabkan karena penggunaan proses pengeringan setelah hidrolisis selesai. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pengeringan dilakukan untuk menghilangkan pelarut yang digunakan dalam proses hidrolisis sekaligus konsentrasi air dari hasil hidrolisis, melalui proses pemanasan dengan suhu yang relatif tinggi (Rutherford & Sarwar, 2009). Proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai, dapat meminimalkan kontak dengan HCl 6N sehingga degradasi atau kerusakan pada senyawa target dapat diminimalkan. Selain itu, pengeringan dilakukan dengan metode *vacuum drying* yang lebih baik dibanding metode yang menggunakan suhu tinggi, dimana hasil hidrolisis dikeringkan dengan menurunkan tekanan dan menghilangkan oksigen selama proses sehingga titik didih pelarut menjadi lebih rendah dan waktu pengeringan menjadi lebih singkat (Uribe et al., 2018 dalam Gressler et al., 2010; Devahastin, 2017; McNeil et al., 2013).

Selain kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis, perbedaan hasil yang diperoleh juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain. Faktor pertama adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [16] berasal dari Britania Raya (Inggris) sedangkan *seaweed* jurnal [22] berasal dari Portugal. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva rigida* yang dipanen di Britania Raya (Inggris) memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Portugal. Selanjutnya faktor kedua adalah alat pemanas yang digunakan untuk hidrolisis berbeda, dimana hidrolisis pada jurnal [16] dilakukan dalam oven, sedangkan hidrolisis pada jurnal [22] dilakukan dalam blok pemanas. Kedua alat pemanas tersebut memiliki prinsip pemanasan yang berbeda yang berkaitan dengan

cepat-lambatnya proses pemanasan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan alat pemanas terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Kemudian jika diperhatikan lagi, maka selisih hasil kedua jurnal tersebut dapat dikatakan relatif kecil. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan besar perbedaan hasil dipengaruhi oleh salah satu dari tiga faktor yang telah dijelaskan atau gabungan dari dua hingga tiga faktor tersebut jika pengaruh masing-masing faktor sangat kecil.

## 4.2. Pelarut Hidrolisis

### 4.2.1. Perbandingan Pelarut Utama (Katalis) pada Proses Hidrolisis secara Kimiawi

Dalam proses hidrolisis secara kimiawi, pemilihan jenis pelarut penting untuk diperhatikan karena jenis pelarut merupakan faktor utama yang memengaruhi efektifitas suatu proses, termasuk hidrolisis (Syed, 2010; Rostagno & Juliana, 2013). Karakteristik yang menjadi dasar dalam memilih pelarut cukup beragam dan dapat berbeda pada setiap proses, tetapi secara umum pelarut yang dipilih untuk proses yang berkaitan dengan bahan pangan adalah pelarut yang dapat melakukan perannya secara optimal (hidrolisis: memutus ikatan-ikatan kimia dalam bahan), tidak menyebabkan kerusakan pada senyawa target, serta aman untuk manusia dan ramah lingkungan (toksisitas rendah & *food grade*) (Tzia & George, 2003; Rostagno & Juliana, 2013). Terdapat dua pelarut utama (katalis) yang dapat digunakan dalam proses hidrolisis yaitu pelarut asam dan etanol.

Berdasarkan hasil *review* ini (Tabel 3.2.1.), pelarut (katalis) asam lebih sering digunakan dibanding pelarut (katalis) etanol. Kemudian, terdapat beberapa jenis pelarut (katalis) asam yang digunakan, yaitu asam klorida atau *hydrochloric acid* (HCl), asam metanasulfonat atau *methanesulfonic acid* (MSA), dan asam perklorat atau *perchloric acid* (HClO<sub>4</sub>/PCA). Asam klorida atau *hydrochloric acid* (HCl) khususnya HCl 6N merupakan pelarut utama (katalis) yang paling umum atau sering digunakan dan merupakan pelarut yang digunakan dalam metode standar (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Rutherford & Sarwar, 2009). Hal ini disebabkan karena penggunaannya cukup mudah, dapat digunakan dalam bentuk fase cair atau gas, serta dapat dihilangkan (dengan cara menguap) dari hasil hidrolisis atau dinetralkan (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998).

Oleh karena itu, pada subbab ini berbagai pelarut utama (katalis) yang jarang digunakan akan dibandingkan dengan HCl 6N yang merupakan pelarut utama (katalis) yang digunakan dalam metode standar. Berikut penjelasan dari masing-masing pelarut utama (katalis) yang sudah pernah digunakan dan dapat dibandingkan.

#### a. Etanol 75%

Hidrolisis *Ulva pertusa* dengan pelarut utama (katalis) etanol 75% (jurnal [63]: 2.300–6.600 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang relatif lebih tinggi dibanding hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [37]: 2.330 g/100g dw *seaweed*). Hasil yang lebih rendah disebabkan karena konsentrasi asam glutamat pada jurnal [63] terdiri dari empat data yang berbeda tergantung dari kedalaman lokasi panen *seaweed*. Empat data konsentrasi asam glutamat tersebut meliputi 4.700 g/100g dw *seaweed* (kontrol), 2.300 g/100g dw *seaweed* (permukaan laut), 5.700 g/100g dw *seaweed* (kedalaman 400 meter), dan 6.600 g/100g dw *seaweed* (kedalaman 1200 meter). Jika kontrol adalah kedalaman yang umum digunakan sebagai lokasi panen, maka dapat diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [63] (4.700 g/100g dw *seaweed*) memang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [37] (2.330 g/100g dw *seaweed*).

Hasil yang lebih tinggi pada jurnal [63] dapat disebabkan karena etanol dengan konsentrasi  $\geq 70\%$  adalah pelarut yang umum digunakan selain pelarut asam, dimana etanol tidak hanya menghidrolisis tetapi juga dapat mengekstraksi asam amino, khususnya memisahkan komponen asam amino dari senyawa lain yang tidak terhidrolisis (Nollet, 2004; Verma, 2014). Selain itu, etanol termasuk pelarut yang mudah menguap sehingga tidak perlu ada proses pemisahan hasil hidrolisis (Nollet, 2004). Kemudian, konsentrasi sampel yang digunakan perlu diperhatikan jika akan menggunakan etanol sebagai pelarut. Jika tinggi akan karbohidrat atau garam maka konsentrasi tersebut perlu dihilangkan terlebih dahulu (Katoch, 2011). Pada jurnal [63], *seaweed* yang digunakan bukan jenis *seaweed* merah (*rhodophyta*) atau *seaweed* coklat (*phaeophyta*) yang dikenal tinggi akan karbohidrat terutama pada struktur dinding selnya, oleh karena itu tidak ada proses penghilangan senyawa lain sebelum protein dihidrolisis. Kemudian, hidrolisis dengan etanol 75% tidak membutuhkan

waktu yang lama (hanya 0.25 jam atau 15 menit/proses) dibanding hidrolisis dengan HCl 6N (24 jam), meskipun suhu hidrolisis yang digunakan mirip yaitu 100°C (jurnal [63]) dan 105°C (jurnal [37]).

Selain pelarut utama (katalis), konsentrasi asam glutamat *Ulva pertusa* yang diperoleh dalam *review* ini kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [63] berasal dari Jepang sedangkan *seaweed* jurnal [37] berasal dari Korea Selatan. Jika letak kedua negara tersebut diperhatikan, maka diketahui bahwa kedua negara tersebut bersebelahan dan jarak kedua negara tersebut dapat dikatakan relatif kecil, sehingga kemungkinan besar selisih konsentrasi asam glutamat juga relatif kecil. Dengan demikian, perbedaan negara asal *seaweed* dapat dikatakan tidak terlalu memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Metode tambahan yang tepat memang dapat mengoptimalkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh jika metode utamanya (pelarut, suhu, dan waktu) sama. Masalahnya pelarut, suhu, dan waktu hidrolisis jurnal [63] dan [37] berbeda. Selain itu, sebelumnya sudah dijelaskan bahwa faktor utama dalam proses hidrolisis secara kimiawi adalah pelarut yang digunakan. Oleh karena itu, dibanding perbedaan kombinasi metode tambahan, jenis pelarut utama (katalis) yang berbeda lebih berpengaruh terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis, dimana analisis pada jurnal [63] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [37] dilakukan dengan L8900 *amino acid analyzer*. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

#### **b. Asam Perklorat (PCA) 8N**

Berdasarkan hasil *review*, pelarut utama (katalis) asam perklorat (PCA) 8N dapat dibandingkan dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N, HCl 12N, dan HCl Panas. Berikut penjelasan dari masing-masing perbandingan.

### 1) Perbandingan PCA 8N dengan HCl 6N

Hidrolisis *Ulva lactuca* dengan pelarut utama (katalis) asam perklorat (PCA) 8N (jurnal [12]: 3.308 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [10]: 0.0026 g/100g dw *seaweed*; jurnal [53]: 0.155–2.078 g/100g dw *seaweed*; jurnal [48]: 0.012–0.019 g/100g dw *seaweed*). Hasil yang lebih tinggi pada jurnal [12] bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa PCA dalam proses hidrolisis memberikan hasil yang lebih baik dibanding HCl hanya pada asam amino alanin, valin, dan histidin, sedangkan sistein dan metionin akan mengalami degradasi total selama hidrolisis dan asam amino lain akan diperoleh dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan hidrolisis dengan HCl. Degradasi atau kerusakan asam glutamat dapat terjadi karena PCA memiliki konsentrasi asam lebih tinggi dibanding HCl dan merupakan senyawa oksidator kuat (senyawa yang dapat menghilangkan elektron dari senyawa lain). Oleh karena itu, PCA jarang digunakan untuk hidrolisis protein menjadi asam amino (Davies & Alan, 1973).

Hasil yang lebih tinggi pada jurnal [12] dapat disebabkan karena terdapat faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan besar dapat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan dan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [12] kombinasi metode tambahan yang digunakan berupa penyaringan dengan membran, derivatisasi dengan reagen PITC, evaporasi dengan teknologi vakum pada suhu 60°C, pelarutan dengan fase gerak yang akan digunakan, sedangkan pada jurnal [48], hasil hidrolisis tidak melalui proses tambahan. Hasil yang lebih rendah pada jurnal [48] sesuai dengan hasil pembahasan sub bab sebelumnya, dimana penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis dapat menjaga hasil hidrolisis pada proses selanjutnya. Namun, kombinasi metode tambahan pada jurnal [12] dapat dikatakan kurang tepat karena proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis tidak dilakukan segera setelah proses hidrolisis selesai, melainkan dilakukan setelah pemisahan senyawa berdasarkan ukurannya dengan membran dan proses derivatisasi. Meskipun begitu, konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tetap jauh lebih tinggi, artinya pengaruh perbedaan

penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis lebih kecil dibanding perbedaan pelarut utama (katalis), atau perbedaan penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis dapat dikatakan tidak terlalu memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Berbeda dengan jurnal [12], kombinasi metode tambahan pada jurnal [10] berupa pengeringan dengan metode *vacuum drying*, derivatisasi dengan reagen PITC, pengeringan dengan metode *vacuum drying*, pelarutan dengan *buffer* fosfat, pengaturan pH menjadi 7.4 dengan asetonitril, serta penyaringan, dan kombinasi metode tambahan pada jurnal [53] berupa pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Berdasarkan hasil pembahasan sub bab sebelumnya, diketahui bahwa penggunaan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah proses hidrolisis selesai cenderung menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tanpa penggunaan proses pemisahan pelarut segera dengan hasil hidrolisis setelah proses hidrolisis selesai. Namun, hasil yang diperoleh pada bagian ini bertentangan dengan hasil pembahasan sub bab sebelumnya. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan kombinasi metode tambahan memiliki pengaruh yang kecil atau tidak terlalu memengaruhi perbedaan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh antara jurnal [12] dengan jurnal [10] dan [53].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan penggunaan metode ekstraksi protein sebelum hidrolisis. Pada jurnal [10] *seaweed* melalui proses ekstraksi protein dengan alkali (NaOH 1N) pada suhu 80°C lalu didinginkan dan dinetralkan dengan HCl 6N, sedangkan *seaweed* jurnal [12] tidak melalui proses ekstraksi protein. Pada sub bab sebelumnya sudah dijelaskan bahwa *alkali-acid extraction* merupakan metode ekstraksi protein yang kurang tepat karena penggunaan HCl 6N sebagai pelarut kedua tidak lebih baik dibanding larutan alkali dalam melarutkan protein, bahkan berpotensi menyebabkan kehilangan protein sebelum hidrolisis (Barbarino & Lourenço, 2005). Selain itu, sampel yang digunakan untuk hidrolisis pada jurnal [10] merupakan sisa hasil proses ekstraksi berturut-turut getah, lipid, ulvan yang

dilakukan pada suhu tinggi sehingga jumlah protein yang diperoleh setiap proses selesai mengalami penurunan. Dari penjelasan tersebut dapat disimpulkan bahwa hasil yang bertentangan dengan teori disebabkan karena proses ekstraksi *seaweed* secara berturut-turut pada suhu tinggi serta jenis metode ekstraksi protein yang kurang tepat pada jurnal [10], sehingga konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tidak normal atau jauh lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [12].

Berbeda dengan jurnal [10], kisaran konsentrasi asam glutamat jurnal [53] terdiri dari empat data yang diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein dengan metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, *accelerated solvent* (ASE), dan satu data yang diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein kedua jurnal tersebut dibandingkan, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [12] (3.308 g/100g dw *seaweed*) tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (2.078 g/100g dw *seaweed*). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa metode ekstraksi protein pada jurnal [53] kurang tepat sehingga konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Selain itu, perbedaan penggunaan metode ekstraksi protein bukan faktor penyebab konsentrasi asam glutamat jurnal [53] jauh lebih rendah dibanding jurnal [12], karena pada kondisi sebelum hidrolisis yang sama, konsentrasi asam glutamat jurnal [12] tetap lebih tinggi dibanding jurnal [53].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* pada jurnal [12] berasal dari Spanyol, sedangkan *seaweed* pada jurnal [10] berasal dari India, *seaweed* pada jurnal [48] berasal dari Mesir, dan *seaweed* pada jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor,



2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Spanyol memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di India, Mesir, atau Swedia. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis, dimana analisis pada jurnal [12] dilakukan dengan UPLC, sedangkan analisis pada jurnal [10] dan [53] dilakukan dengan RP-HPLC dan analisis pada jurnal [48] dilakukan dengan LC3000 *amino acid analyzer*. Ketiga metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, selisih hasil yang besar antara jurnal [12] dan [10] disebabkan karena proses ekstraksi berturut-turut termasuk ekstraksi protein yang tidak tepat pada jurnal [10], perbedaan negara asal *seaweed*, dan/atau metode atau alat analisis. Kemudian, selisih hasil yang relatif kecil antara jurnal [12] dan jurnal [53] atau [48] disebabkan karena perbedaan negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis.

## 2) Perbandingan PCA 8N dengan HCl 12N

Hidrolisis *Ulva lactuca* dengan pelarut utama (katalis) asam perklorat (PCA) 8N (jurnal [12]: 3.308 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [20]: 1.220 g/100g dw *seaweed*). Sama seperti sebelumnya, hasil yang lebih tinggi pada jurnal [12] bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa PCA dalam proses hidrolisis memberikan hasil yang lebih baik dibanding HCl hanya pada asam amino alanin, valin, dan histidin, sedangkan sistein dan metionin akan mengalami degradasi total selama hidrolisis dan asam amino lain akan diperoleh dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan hidrolisis dengan HCl. Degradasi atau kerusakan asam glutamat dapat terjadi karena PCA memiliki konsentrasi asam lebih tinggi dibanding HCl dan merupakan senyawa oksidator kuat (senyawa yang dapat menghilangkan elektron dari senyawa lain). Oleh karena itu, PCA jarang digunakan untuk hidrolisis protein menjadi asam amino (Davies & Alan, 1973).

Hasil yang lebih tinggi pada jurnal [12] dapat disebabkan karena konsentrasi asam pelarut utama (katalis) jurnal [20] Pada jurnal [20], pelarut utama (katalis) yang digunakan memang memiliki konsentrasi asam yang lebih besar yaitu HCl 12N, tetapi sebenarnya pelarut utama (katalis) tersebut ditambah dengan pelarut lain yaitu air destilasi dan norleusin 20mM hingga konsentrasi akhirnya 6N. Artinya konsentrasi asam pada pelarut yang digunakan untuk hidrolisis pada jurnal [20] lebih rendah dibanding konsentrasi asam pada pelarut jurnal [12]. Jika bukan karena perbedaan konsentrasi, maka terdapat faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan besar dapat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [12] kombinasi metode tambahan yang digunakan berupa penyaringan dengan membran, derivatisasi dengan reagen PITC, evaporasi dengan teknologi vakum pada suhu 60°C, pelarutan dengan fase gerak yang akan digunakan, sedangkan kombinasi metode tambahan jurnal [20] berupa evaporasi menggunakan gas nitrogen (vakum) dan pelarutan dengan *buffer* litium sitrat pH 2.2 Pada sub bab sebelumnya sudah dijelaskan bahwa penggunaan proses penghilangan pelarut, salah satunya evaporasi, segera setelah proses hidrolisis selesai dapat menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari penggunaan proses pemisahan senyawa berdasarkan ukuran molekulnya setelah hidrolisis selesai. Namun pada bagian ini, hasil yang diperoleh bertentangan dengan hasil pembahasan sub bab sebelumnya. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis memiliki pengaruh yang kecil atau dapat dikatakan bukan penyebab utama perbedaan konsentrasi asam glutamat antara jurnal [12] dan [20].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* pada jurnal [12] berasal dari Spanyol, sedangkan *seaweed* pada jurnal [20] berasal dari Norwegia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi

dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Spanyol memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Norwegia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis, dimana analisis pada jurnal [12] dilakukan dengan UPLC, sedangkan analisis pada jurnal [20] dilakukan dengan Biochrom B30 *amino acid analyzer*. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, perbedaan hasil antara jurnal [12] dan [20] disebabkan karena perbedaan negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis.

### 3) Perbandingan PCA 8N dengan HCl Panas

Hidrolisis *Ulva lactuca* dengan pelarut utama (katalis) asam perklorat (PCA) 8N (jurnal [12]: 3.308 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl panas (jurnal [35]: 1.476 g/100g dw *seaweed*; jurnal [60]: 0.756 g/100g dw *seaweed*). Sama seperti sebelumnya, hasil yang lebih tinggi pada jurnal [12] bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa PCA dalam proses hidrolisis memberikan hasil yang lebih baik dibanding HCl hanya pada asam amino alanin, valin, dan histidin, sedangkan sistein dan metionin akan mengalami degradasi total selama hidrolisis dan asam amino lain akan diperoleh dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan hidrolisis dengan HCl. Degradasi atau kerusakan asam glutamat dapat terjadi karena PCA memiliki konsentrasi asam lebih tinggi dibanding HCl dan merupakan senyawa oksidator kuat (senyawa yang dapat menghilangkan elektron dari senyawa lain). Oleh karena itu, PCA jarang digunakan untuk hidrolisis protein menjadi asam amino (Davies & Alan, 1973).

Hasil yang lebih tinggi pada jurnal [12] dapat disebabkan karena terdapat faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan besar

dapat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah perbedaan suhu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [12] dilakukan pada suhu 110°C, sedangkan hidrolisis pada jurnal [60] dilakukan pada suhu 108°C. Meskipun suhu hidrolisis berbeda, tetapi perbedaan suhu bukan faktor utama penyebab penggunaan pelarut utama (katalis) HCl panas menghasilkan konsentrasi asam glutamat jurnal [60] lebih rendah. Hal ini disebabkan karena, pada suhu yang sama, konsentrasi asam glutamat jurnal [35] yang menggunakan pelarut utama (katalis) HCl panas juga lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [12] yang menggunakan pelarut utama (katalis) PCA 8N.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [12] kombinasi metode tambahan yang digunakan berupa penyaringan dengan membran, derivatisasi dengan reagen PITC, evaporasi dengan teknologi vakum pada suhu 60°C, pelarutan dengan fase gerak yang akan digunakan, sedangkan kombinasi metode tambahan jurnal [35] berupa evaporasi dan pelarutan dengan *buffer* NLE-100 (norleusin), dan kombinasi metode tambahan jurnal [60] berupa evaporasi dengan teknologi vakum dan derivatisasi dengan reagen PITC. Pada subbab sebelumnya sudah dijelaskan bahwa penggunaan proses penghilangan pelarut, salah satunya evaporasi, segera setelah proses hidrolisis selesai dapat menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari penggunaan proses pemisahan senyawa berdasarkan ukuran molekulnya setelah hidrolisis selesai. Namun pada bagian ini, hasil yang diperoleh bertentangan dengan hasil pembahasan sub bab sebelumnya. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis memiliki pengaruh yang kecil atau dapat dikatakan bukan penyebab utama perbedaan konsentrasi asam glutamat antara jurnal [12] dan jurnal [35] atau [60].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* pada jurnal [12] berasal dari Spanyol, sedangkan *seaweed* pada jurnal [35] berasal dari Afrika Selatan, dan *seaweed* pada jurnal [60] berasal dari Korea Selatan. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan

panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Spanyol memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Afrika Selatan atau Korea Selatan. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis, dimana analisis pada jurnal [12] dilakukan dengan UPLC, sedangkan analisis pada jurnal [35] dilakukan dengan IEC (CEC), dan analisis pada jurnal [60] dilakukan dengan RP-HPLC. Ketiga metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, perbedaan hasil antara jurnal [12] dan jurnal [35] atau [60] disebabkan karena perbedaan negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis.

### c. Asam Metanasulfonat (MSA) 4N

Asam metanasulfonat atau *methanesulfonic acid* (MSA) merupakan salah satu pelarut utama (katalis) yang digunakan untuk mempertahankan asam amino triptofan yang sebagian besar hancur atau terdegradasi selama proses hidrolisis dengan HCl 6N (Toldra & Leo, 2021; Greenfield & Southgate, 2003; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Umumnya penggunaan MSA diikuti dengan penggunaan reagen pelindung seperti triptamin atau asam tioglikolat untuk mencegah oksidasi selama hidrolisis (Toldra & Leo, 2021). Dalam proses hidrolisis asam (*acid hydrolysis*), triptamin ditambahkan ke pelarut asam sebagai agen pelindung sampel agar asam amino (khususnya triptofan) yang hilang akibat degradasi dapat diminimalkan selama proses hidrolisis sehingga asam amino yang diperoleh dapat meningkat (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Rutherford & Sarwar, 2009). Berdasarkan hasil *review*, penggunaan pelarut utama (katalis) MSA 4N ditemukan pada spesies *Chondrus crispus*, *Ascophyllum nodosum*, *Undaria pinnatifida*, dan *Ulva spp* (Tabel 3.2.1). Perbandingan antara konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) MSA 4N dan HCl 6N menunjukkan hasil yang beragam.

Hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) MSA 4N menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah, berada dalam kisaran, serta lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan HCl 6N. Berikut penjelasan masing-masing hasil hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) MSA 4N.

### 1) Hasil Hidrolisis Lebih Rendah

Sebagian besar data menunjukkan bahwa hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) MSA 4N (jurnal [2]: *Chondrus crispus*, *Ascophyllum nodosum*, *Undaria pinnatifida*, *Ulva spp.*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan HCl 6N (jurnal [44]: *Chondrus crispus*; jurnal [19]: *Ascophyllum nodosum*; jurnal [52]: *Undaria pinnatifida*; jurnal [39]: *Ulva spp.*). Konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah pada hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) MSA 4N, dapat disebabkan karena karakteristik pelarut MSA yang berbeda dengan HCl, yaitu tidak mudah menguap (titik didih: 443°C) (Toldra & Leo, 2021; NCBI<sup>b</sup>, 2021). Hal ini menyebabkan pelarut MSA tidak dapat dihilangkan dengan metode penguapan (evaporasi) setelah hidrolisis (Rutherford & Sarwar, 2009). Beberapa sumber menyebutkan bahwa hasil hidrolisis dengan pelarut (katalis) MSA tetap dapat dianalisis dengan syarat dilakukan pengenceran sebanyak empat kali dan pH diatur mendekati 2.3 dengan catatan jumlah sampel yang digunakan untuk hidrolisis lebih besar (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Toldra & Leo, 2021).

Selain pelarut utama (katalis), konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah pada jurnal [2] kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan metode ekstraksi protein pada spesies *Chondrus crispus*. Kisaran konsentrasi asam glutamat jurnal [44] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda yaitu dengan metode tradisional (*osmotic shock*, ultrasonikasi, presipitasi), metode HPP (*high pressure processing*), metode *autoclave pre-treatment*, serta satu data yang diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein, sedangkan konsentrasi asam glutamat jurnal [2] diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein. Jika

konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein dibandingkan, maka dapat diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [2] (0.618–0.684 g/100g dw *seaweed*) tetap lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [44] (3.522 g/100g dw *seaweed*). Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan metode ekstraksi protein pada jurnal [44] bukan faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil, karena pada kondisi yang sama (tanpa melalui proses ekstraksi protein), hasil yang diperoleh tetap sama.

Kemudian faktor kedua adalah perbedaan penggunaan dan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis pada spesies *Chondrus crispus*, *Ascophyllum nodosum* (jurnal [19]), *Undaria pinnatifida*, dan *Ulva spp.* (jurnal [39]). Pada jurnal [2], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa penyaringan dengan teknologi vakum, pengenceran dengan *ultrapure water* (air dengan tingkat kemurnian tinggi, senyawa organik dan anorganiknya sangat rendah), dan penyaringan dengan membran selulosa berukuran 0.45 $\mu$ m. Pada jurnal [44], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa presipitasi dengan 24% TCA, sentrifugasi, pengenceran dengan *buffer* natrium sitrat 0.2N pH 2.2, dan pengenceran dengan norleusin. Pada jurnal [19] dan [52], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan berukuran 0.45 $\mu$ m, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor. Pada jurnal [39], hasil hidrolisis tidak melalui metode tambahan setelah hidrolisis. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa tidak ada yang melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai, semuanya dimulai dengan pemisahan senyawa target berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang lebih sama. Selain itu, penjelasan ini menunjukkan bahwa pada kondisi setelah hidrolisis yang hampir sama, penggunaan HCl 6N memang lebih baik dibanding MSA 4N. Bahkan, meskipun hasil hidrolisis dengan HCl 6N tidak melalui proses tambahan, konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [2].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [2] berasal dari Portugal (*Chondrus crispus* dan *Ulva spp.*), Prancis (*Ascophyllum nodosum*), dan Spanyol (*Undaria pinnatifida*), sedangkan *seaweed* jurnal [44] (*Chondrus crispus*) berasal dari Irlandia, *seaweed* jurnal [19] (*Ascophyllum nodosum*) berasal dari Spanyol, *seaweed* jurnal [52] (*Undaria pinnatifida*) berasal dari Iberia, dan *seaweed* jurnal [39] (*Ulva spp.*) berasal dari Amerika Serikat. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Chondrus crispus* atau *Ulva spp.* yang dipanen di Portugal, *Ascophyllum nodosum* yang dipanen di Prancis, dan *Undaria pinnatifida* yang dipanen di Spanyol, memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *Chondrus crispus* yang dipanen di Irlandia, *Ulva spp.* yang dipanen di Amerika Serikat, *Ascophyllum nodosum* yang dipanen di Spanyol, dan *Undaria pinnatifida* yang dipanen di Iberia.

Selanjutnya, faktor keempat adalah perbedaan waktu hidrolisis pada spesies *Chondrus crispus* dan *Ulva spp.* Hidrolisis pada jurnal [2] dilakukan selama 24 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [44] (*Chondrus crispus*) dan jurnal [39] (*Ulva spp.*) dilakukan selama 23 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Lalu, faktor kelima adalah perbedaan metode atau alat analisis pada spesies *Chondrus crispus* dan *Ulva spp.* dimana analisis pada jurnal [2] dilakukan dengan RP-HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [44] dilakukan dengan Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer*, dan analisis pada jurnal [39] dilakukan dengan HPLC. Ketiga metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan



dibahas pada subbab lain. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [2] lebih rendah dibanding jurnal [44], [19], [52], atau [39] adalah perbedaan pelarut utama (katalis) yang digunakan dalam proses hidrolisis.

## 2) Hasil Hidrolisis Berada dalam Kisaran

Selain hasil yang lebih rendah, hidrolisis *Ascophyllum nodosum* dengan pelarut utama (katalis) MSA 4N (jurnal [2]: 0.446–0.680 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang dihidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [1]: 0.290–1.649 g/100g dw *seaweed*). Hasil yang berbeda dari sebelumnya dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat dari kedua jurnal tersebut berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [2] terdiri dari dua data, dimana satu data diperoleh dari *seaweed* yang dipanen pada bulan April–Juli (musim semi–panas) dan data yang lain diperoleh dari *seaweed* yang dipanen pada bulan Oktober–November (musim gugur). Di antara kedua data tersebut, konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi diperoleh dari *seaweed* yang dipanen pada bulan Oktober–November (musim gugur), meskipun begitu selisih hasilnya tidak terlalu jauh sehingga dapat dikatakan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [2] memang dalam kisaran tersebut.

Kemudian, kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [1] terdiri dari tiga data yang diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu *acid extraction*, *alkali extraction*, dan *acid–alkali extraction* sebelum proses hidrolisis. Di antara ketiga data tersebut, konsentrasi asam glutamat tertinggi diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein dengan metode *alkali extraction* (1.649 g/100g dw *seaweed*) dan hasil pembahasan jurnal [1] menunjukkan bahwa perbedaan metode ekstraksi protein sangat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh pada jurnal tersebut. Jika diasumsikan

peneliti pada masing–masing jurnal tersebut melakukan penelitian untuk mencari konsentrasi asam glutamat yang optimal (tertinggi), maka konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan MSA 4N (jurnal [2]: 0.680 g/100g dw *seaweed*) diketahui lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat dari hidrolisis dengan HCl 6N (jurnal [1]: 1.649 g/100g dw *seaweed*). Selain perbedaan pelarut utama (katalis) dan penggunaan metode ekstraksi protein yang tepat pada jurnal [1], selisih yang relatif besar kemungkinan juga dapat disebabkan oleh faktor lain di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis.

Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [2], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa penyaringan dengan teknologi vakum, pengenceran dengan *ultrapure water* (air dengan tingkat kemurnian tinggi, senyawa organik dan anorganiknya sangat rendah), dan penyaringan dengan membran selulosa berukuran 0.45 $\mu$ m. Lalu pada jurnal [1] kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa presipitasi dengan 24% TCA, sentrifugasi, pengenceran dengan *buffer* natrium sitrat 0.2N pH 2.2, pengenceran dengan norleusin, dan derivatisasi dengan ninhidrin. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa kombinasi metode tambahan kedua jurnal sama–sama dimulai dengan pemisahan senyawa target dari senyawa lain, bukan pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* pada jurnal [2] berasal dari Prancis sedangkan *seaweed* pada jurnal [1] berasal dari Irlandia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017).

Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada *Ascophyllum nodosum* yang dipanen di Prancis memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Irlandia. Selanjutnya faktor ketiga adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [2] dilakukan selama 24 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [1] dilakukan selama 23 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis, dimana analisis pada jurnal [2] dilakukan dengan RP-HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [1] dilakukan dengan Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer*. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [2] lebih rendah dibanding jurnal [1] adalah perbedaan pelarut utama (katalis) yang digunakan dalam proses hidrolisis dan penggunaan proses ekstraksi protein yang tepat pada jurnal [1].

### 3) Hasil Hidrolisis Lebih Tinggi

Selain hasil yang lebih rendah dan berada dalam kisaran, *Ulva spp.* dengan pelarut utama (katalis) MSA 4N (jurnal [2]: 0.836–1.216 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang dihidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [27]: 0.324–0.722 g/100g dw *seaweed*). Hasil yang lebih tinggi pada jurnal [2], kemungkinan dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [2], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa penyaringan dengan teknologi

vakum, pengenceran dengan *ultrapure water* (air dengan tingkat kemurnian tinggi, senyawa organik dan anorganiknya sangat rendah), dan penyaringan dengan membran selulosa berukuran 0.45 $\mu$ m. Lalu, pada jurnal [27] metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa pengaturan pH menjadi 2.2 (norleusin). Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan senyawa target dari senyawa lain juga penting untuk dilakukan, meskipun pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai memang lebih baik. Proses pemisahan senyawa target dengan kontaminan (garam, ion logam berat, protein, atau asam amino lain) penting untuk dilakukan agar tidak mengganggu proses selanjutnya dan senyawa target yang diperoleh murni. Hal ini penting dan harus dilakukan terutama saat hasil hidrolisis akan diolah menjadi produk pangan (Tzia & George, 2003; Rostagno & Juliana, 2013; Armarego & Christina, 2009).

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [2] berasal dari Portugal sedangkan *seaweed* pada jurnal [27] berasal dari Chili. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ascophyllum nodosum* yang dipanen di Portugal memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Chili. Selanjutnya faktor ketiga adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [2] dilakukan selama 24 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [27] dilakukan selama 22 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis, dimana analisis pada jurnal [2] dilakukan dengan RP-HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [27] dilakukan dengan HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan

waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [2] lebih tinggi dibanding jurnal [27] adalah salah satu dari empat faktor yang telah dijelaskan atau gabungan beberapa faktor jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

#### **d. HCl 0.01N**

Berdasarkan hasil *review*, pelarut utama (katalis) HCl 0.01N dapat dibandingkan dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N dan MSA 4N. Berikut penjelasan dari masing-masing perbandingan.

##### **1) Perbandingan HCl 0.01N dengan HCl 6N**

Dalam *review* ini, perbandingan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 0.01N dengan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N dapat ditemukan pada spesies *Ascophyllum nodosum* dan *Fucus vesiculosus*. Perbandingan antara konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 0.01N dan HCl 6N menunjukkan hasil yang cukup beragam. Hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 0.01N menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah serta berada dalam kisaran dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan HCl 6N. Berikut penjelasan masing-masing hasil hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 0.01N.

##### **a) Hasil Hidrolisis Lebih Rendah**

Dua dari tiga data yang ditemukan menunjukkan bahwa hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 0.01N (jurnal [4]) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (*Ascophyllum nodosum*: jurnal [19][1]; *Fucus vesiculosus*: jurnal [19]). Hasil yang lebih rendah dapat disebabkan karena konsentrasi HCl yang digunakan

jauh lebih kecil dibanding HCl 6N sehingga kemampuan pelarut untuk memutus ikatan kurang optimal atau tidak sebaik pelarut yang konsentrasinya lebih tinggi. Tidak hanya itu, pelarut tersebut ditambah lagi dengan air distilasi sehingga konsentrasinya menjadi lebih rendah, artinya kemampuan pelarut untuk memutus ikatan semakin kurang optimal.

Selain itu, suhu dan waktu hidrolisis yang digunakan juga jauh berbeda, dimana hidrolisis dengan HCl 0.01N dilakukan pada suhu dan waktu yang jauh lebih rendah (90°C) dan singkat (1.5 jam atau 90 menit) dibanding metode standar (110°C; 20-24 jam) (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009). Modifikasi proses hidrolisis, meliputi jenis pelarut, suhu, dan waktu, untuk memperoleh hasil yang lebih baik sangat disarankan tetapi perlu mempertimbangkan fakta bahwa suhu hidrolisis memang harus cukup tinggi agar asam amino dapat terurai dengan baik, tetapi juga tidak boleh terlalu tinggi agar tidak terjadi degradasi atau kerusakan pada senyawa target (Tzia & George, 2003). Selain itu, perlu diketahui bahwa waktu standar merupakan lama proses hidrolisis untuk menghidrolisis protein menjadi asam amino secara lengkap, dengan kata lain sebagian besar asam amino sudah terurai dengan baik (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Nollet, 2004).

Namun selain pelarut utama (katalis), suhu hidrolisis, dan waktu hidrolisis, perbedaan hasil antara hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 0.01N dan HCl 6N kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [4], metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa sentrifugasi. Pada jurnal [19], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan atau membran yang memiliki pori-pori berukuran 0.45µm, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor. Pada jurnal [1], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa presipitasi dengan 24% TCA, sentrifugasi, pengenceran dengan *buffer* natrium sitrat 0.2N pH 2.2, pengenceran dengan norleusin, dan

derivatisasi dengan ninhidrin. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan ketiga jurnal sama-sama dimulai dengan pemisahan senyawa target dari senyawa lain, bukan pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [4] berasal dari Britania Raya (Skotlandia), sedangkan *seaweed* jurnal [19] berasal dari Spanyol dan *seaweed* jurnal [1] berasal dari Irlandia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ascophyllum nodosum* & *Fucus vesiculosus* yang dipanen di Britania Raya (Skotlandia) memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Spanyol atau Irlandia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan alat pemanas, dimana hidrolisis pada jurnal [4] dilakukan dalam blok pemanas, sedangkan hidrolisis pada jurnal [19] dan [1] dilakukan dalam oven. Kedua alat pemanas tersebut memiliki prinsip pemanasan yang berbeda yang berkaitan dengan cepat-lambatnya proses pemanasan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan alat pemanas terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah metode atau alat analisis, dimana dimana analisis pada jurnal [4] dilakukan dengan GC/MSD, sedangkan analisis pada jurnal [19] dilakukan dengan RP-HPLC dan analisis pada jurnal [1] dilakukan dengan Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer*. Kedua metode atau alat analisis tersebut memiliki prinsip kerja yang berbeda, artinya kemungkinan besar tidak hanya

berpengaruh terhadap waktu analisis, tetapi juga berpengaruh terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [4] lebih rendah dibanding jurnal [19] dan [1] adalah perbedaan pelarut utama (katalis), negara asal *seaweed*, dan/atau metode atau alat analisis.

#### **b) Hasil Hidrolisis Berada dalam Kisaran**

Selain hasil yang lebih rendah, hidrolisis *Fucus vesiculosus* dengan pelarut utama (katalis) HCl 0.01N (jurnal [4]: 0.043–0.054 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang dihidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [44]: 0.032–0.757 g/100g dw *seaweed*). Hasil yang berbeda dari sebelumnya dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat dari kedua jurnal tersebut berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [44] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda yaitu dengan metode tradisional (*osmotic shock*, ultrasonikasi, presipitasi), metode HPP (*high pressure processing*), metode *autoclave pre-treatment*, serta satu data yang diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein, sedangkan *seaweed* pada jurnal [4] tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat dari *seaweed* tidak melalui proses ekstraksi protein dibandingkan, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan HCl 0.01N (jurnal [4]: 0.043–0.054 g/100g dw *seaweed*) memang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat dari hidrolisis dengan HCl 6N (jurnal [44]: 0.757 g/100g dw *seaweed*).

Hasil yang lebih rendah dapat disebabkan karena konsentrasi HCl yang digunakan jauh lebih kecil dibanding HCl 6N sehingga kemampuan pelarut



untuk memutus ikatan kurang optimal atau tidak sebaik pelarut yang konsentrasinya lebih tinggi. Tidak hanya itu, pelarut tersebut ditambah lagi dengan air distilasi sehingga konsentrasinya menjadi lebih rendah, artinya kemampuan pelarut untuk memutus ikatan semakin kurang optimal. Selain itu, suhu dan waktu hidrolisis yang digunakan juga jauh berbeda, dimana hidrolisis dengan HCl 0.01N dilakukan pada suhu dan waktu yang jauh lebih rendah (90°C) dan singkat (1.5 jam atau 90 menit) dibanding metode standar (110°C; 20-24 jam) (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009). Modifikasi proses hidrolisis, meliputi jenis pelarut, suhu, dan waktu, untuk memperoleh hasil yang lebih baik sangat disarankan tetapi perlu mempertimbangkan fakta bahwa suhu hidrolisis memang harus cukup tinggi agar asam amino dapat terurai dengan baik, tetapi juga tidak boleh terlalu tinggi agar tidak terjadi degradasi atau kerusakan pada senyawa target (Tzia & George, 2003). Selain itu, perlu diketahui bahwa waktu standar merupakan lama proses hidrolisis untuk menghidrolisis protein menjadi asam amino secara lengkap, dengan kata lain sebagian besar asam amino sudah terurai dengan baik (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Nollet, 2004).

Selain perbedaan pelarut utama (katalis), suhu hidrolisis, dan waktu hidrolisis, selisih yang besar kemungkinan juga dapat disebabkan oleh faktor lain di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [4], metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa sentrifugasi, sedangkan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis pada jurnal [44] berupa presipitasi dengan 24% TCA, sentrifugasi, pengenceran dengan *buffer* natrium sitrat 0.2N pH 2.2, dan pengenceran dengan norleusin.. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan kedua jurnal sama-sama dimulai dengan pemisahan senyawa target dari senyawa lain, bukan pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena

degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal.

Kemudian, faktor kedua adalah negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [4] berasal dari Britania Raya (Skotlandia), sedangkan *seaweed* jurnal [44] berasal dari Irlandia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Fucus vesiculosus* yang dipanen di Britania Raya (Skotlandia) memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Irlandia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan alat pemanas, dimana hidrolisis pada jurnal [4] dilakukan dalam blok pemanas, sedangkan hidrolisis pada jurnal [44] dilakukan dalam oven. Kedua alat pemanas tersebut memiliki prinsip pemanasan yang berbeda yang berkaitan dengan cepat-lambatnya proses pemanasan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan alat pemanas terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah metode atau alat analisis, dimana dimana analisis pada jurnal [4] dilakukan dengan GC/MSD, sedangkan analisis pada jurnal [44] dilakukan dengan Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer*. Kedua metode atau alat analisis tersebut memiliki prinsip kerja yang berbeda, artinya kemungkinan besar tidak hanya berpengaruh terhadap waktu analisis, tetapi juga berpengaruh terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [4] lebih rendah dibanding jurnal [44] adalah perbedaan pelarut utama (katalis), negara asal *seaweed*, dan/atau metode atau alat analisis.

## 2) Perbandingan HCl 0.01N dengan MSA 4N

Dalam *review* ini, perbandingan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 0.01N dengan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) MSA 4N dapat ditemukan pada spesies *Ascophyllum nodosum*. Lalu, hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 0.01N (jurnal [4]: 0.047–0.072 g/100g dw *seaweed*) diketahui menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) MSA 4N (jurnal [2]: 0.446–0.680 g/100g dw *seaweed*). Hasil yang lebih rendah dapat disebabkan karena konsentrasi HCl yang digunakan jauh lebih kecil dibanding MSA 4N sehingga kemampuan pelarut untuk memutus ikatan tidak optimal atau tidak sebaik pelarut yang konsentrasinya lebih tinggi. Tidak hanya itu, pelarut tersebut ditambah lagi dengan air distilasi sehingga konsentrasinya menjadi lebih rendah.

Selain itu, suhu dan waktu hidrolisis yang digunakan juga jauh berbeda, dimana hidrolisis dengan HCl 0.01N dilakukan pada suhu dan waktu (90°C; 1.5 jam) yang jauh lebih rendah dan singkat dibanding metode standar (110°C; 18-24 jam) (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009). Modifikasi proses hidrolisis (jenis pelarut, suhu, waktu) untuk memperoleh hasil yang lebih baik sangat disarankan tetapi perlu mempertimbangkan fakta bahwa suhu hidrolisis memang harus cukup tinggi agar asam amino dapat terurai dengan baik, tetapi juga tidak boleh terlalu tinggi agar tidak terjadi degradasi pada senyawa asam amino yang diinginkan (Tzia & George, 2003). Selain itu, waktu standar merupakan lama proses hidrolisis untuk menghidrolisis protein menjadi asam amino secara lengkap (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Nollet, 2004).

Selain perbedaan pelarut utama (katalis), suhu hidrolisis, dan waktu hidrolisis, selisih yang besar kemungkinan juga dapat disebabkan oleh faktor lain di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [4], metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa sentrifugasi, sedangkan kombinasi metode

tambahan setelah hidrolisis pada jurnal [2] berupa penyaringan dengan teknologi vakum, pengenceran dengan *ultrapure water*, dan penyaringan dengan membran selulosa dengan pori-pori berukuran 0.45 $\mu$ m. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan kedua jurnal sama-sama dimulai dengan pemisahan senyawa target dari senyawa lain, bukan pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal.

Kemudian, faktor kedua adalah negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [4] berasal dari Britania Raya (Skotlandia), sedangkan *seaweed* jurnal [2] berasal dari Prancis. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ascophyllum nodosum* yang dipanen di Britania Raya (Skotlandia) memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Prancis. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan alat pemanas, dimana hidrolisis pada jurnal [4] dilakukan dalam blok pemanas, sedangkan hidrolisis pada jurnal [2] dilakukan dalam oven. Kedua alat pemanas tersebut memiliki prinsip pemanasan yang berbeda yang berkaitan dengan cepat-lambatnya proses pemanasan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan alat pemanas terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah metode atau alat analisis, dimana analisis pada jurnal [4] dilakukan dengan GC/MSD, sedangkan analisis pada jurnal [2] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut memiliki prinsip kerja yang berbeda, artinya kemungkinan besar tidak hanya berpengaruh terhadap waktu analisis, tetapi juga berpengaruh terhadap konsentrasi asam glutamat yang

diperoleh. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [4] lebih rendah dibanding jurnal [2] adalah perbedaan pelarut utama (katalis), negara asal *seaweed*, dan/atau metode atau alat analisis.

#### e. HCl 12N

Berdasarkan hasil *review*, pelarut utama (katalis) HCl 12N dapat dibandingkan dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N, HCl 0.01N, dan HCl panas. Berikut penjelasan dari masing-masing perbandingan.

##### 1) Perbandingan HCl 12N dengan HCl 6N

Dalam *review* ini, perbandingan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N dengan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N dapat ditemukan pada spesies *Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*, dan *Ulva lactuca*. Perbandingan antara konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N dan HCl 6N menunjukkan hasil yang cukup beragam. Hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi serta lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan HCl 6N. Berikut penjelasan masing-masing hasil hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N.

##### a) Hasil Hidrolisis Lebih Tinggi

Sebagian besar data menunjukkan bahwa hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N (jurnal [20]: *Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*, *Ulva lactuca*; jurnal [21]: *Palmaria palmata* ; jurnal [25]: *Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan HCl 6N (jurnal [44]: *Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, *Fucus*

*vesiculosus*; jurnal [10]: *Ulva lactuca*; jurnal [48]: *Ulva lactuca*). Hasil yang lebih tinggi disebabkan karena sebenarnya HCl 12N yang digunakan sebagai pelarut utama (katalis) pada jurnal [20], [21], dan [25] ditambah dengan pelarut lain yaitu air destilasi dan/atau norleusin 20mM sehingga konsentrasi akhir pelarut menjadi 6N. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa konsentrasi asam yang digunakan sama tetapi komponen pelarutnya berbeda. Hasil yang lebih tinggi pada jurnal [20], [21], dan [25] disebabkan karena penggunaan pelarut tambahan berupa air distilasi dan/atau norleusin 20mM. Penggunaan kedua pelarut tersebut berkaitan dengan pelarutan dan pengenceran untuk menurunkan konsentrasi dan/atau perlindungan agar senyawa yang sudah terhidrolisis tidak mengalami degradasi atau kerusakan selama proses hidrolisis masih berlangsung (NCBI<sup>e</sup>, 2021; McTigue & James, 2010; Rutherford & Sarwar, 2009). Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan pelarut tambahan terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Selain perbedaan pelarut utama (katalis) dan komponennya, perbedaan hasil kemungkinan juga dapat disebabkan oleh faktor lain di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan proses ekstraksi protein pada spesies *Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*, dan *Ulva lactuca*. Pada jurnal [20], [21], dan [25], data konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Lalu, pada jurnal [44] (*Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*), tiga data konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu dengan metode tradisional (*osmotic shock*, ultrasonikasi, presipitasi), metode HPP (*high pressure processing*), metode *autoclave pre-treatment*, serta satu data yang diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein dibandingkan, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [20], [21], dan [25] tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [44] (*Palmaria palmata*: 1.700 g/100g dw *seaweed*; *Alaria esculenta*: 0.861 g/100g

dw seaweed; *Fucus vesiculosus*: 0.757 g/100g dw seaweed). Hasil tersebut menunjukkan bahwa penggunaan proses ekstraksi protein bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [20], [21], atau [25] dengan jurnal [44] pada spesies *Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, dan *Fucus vesiculosus*, karena pada kondisi yang sama hasil perbandingan yang diperoleh tetap sama.

Lalu, pada jurnal [10] (*Ulva lactuca*), data konsentrasi asam glutamat diperoleh dari seaweed yang melalui proses ekstraksi protein dengan alkali (NaOH 1N) pada suhu 80°C lalu didinginkan dan dinetralkan dengan HCl 6N. Pada sub bab sebelumnya sudah dijelaskan bahwa *alkali-acid extraction* merupakan metode ekstraksi protein yang kurang tepat karena penggunaan HCl 6N sebagai pelarut kedua tidak lebih baik dibanding larutan alkali dalam melarutkan protein, bahkan berpotensi menyebabkan kehilangan protein sebelum hidrolisis (Barbarino & Lourenço, 2005). Selain itu, sampel yang digunakan untuk hidrolisis pada jurnal [10] merupakan sisa hasil proses ekstraksi berturut-turut getah, lipid, ulvan yang dilakukan pada suhu tinggi sehingga jumlah protein yang diperoleh setiap proses selesai mengalami penurunan. Dari penjelasan tersebut dapat disimpulkan bahwa perbedaan hasil antara jurnal [20] dengan jurnal [10] dengan selisih yang besar juga disebabkan karena proses ekstraksi secara berturut-turut pada suhu tinggi serta jenis metode ekstraksi protein yang kurang tepat pada jurnal [10], sehingga konsentrasi asam glutamat yang diperoleh pada jurnal tersebut tidak normal atau jauh lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [20].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan penggunaan proses perebusan seaweed pada spesies *Palmaria palmata* dan *Alaria esculenta*. Pada jurnal [25], konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari seaweed yang melalui proses perebusan dengan waktu yang berbeda yaitu 15, 30, dan 60 menit, dan satu data diperoleh dari seaweed yang tidak melalui proses perebusan, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [44] diperoleh dari seaweed yang tidak melalui proses perebusan. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari seaweed yang tidak melalui proses perebusan

dibandingkan maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [25] (*Palmaria palmata*: 1.780 g/100g dw seaweed; *Alaria esculenta*: 1.460 g/100g dw seaweed) tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [44]. Hasil tersebut menunjukkan bahwa penggunaan proses perebusan seaweed bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [25] dengan jurnal [44] pada spesies *Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, karena pada kondisi yang sama hasil perbandingan yang diperoleh tetap sama.

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan penggunaan proses pemecahan sel seaweed pada spesies *Palmaria palmata*. Pada jurnal [21], konsentrasi asam glutamat terdiri dari lima data, dimana satu data diperoleh dari seaweed yang tidak melalui proses pemecahan sel, dan empat data diperoleh dari seaweed yang melalui proses pemecahan sel dengan metode yang berbeda, yaitu homogenisasi serta tiga kombinasi homogenisasi dan hidrolisis dengan enzim xylanase dan selulase (10U, 50U, 100U), sedangkan seaweed pada jurnal [44] tidak melalui proses pemecahan sel. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari seaweed yang tidak melalui proses pemecahan sel dibandingkan maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [21] (2.040 g/100g dw seaweed). tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [44]. Hasil tersebut menunjukkan bahwa penggunaan proses pemecahan sel seaweed bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [21] dengan jurnal [44] pada spesies *Palmaria palmata*, karena pada kondisi yang sama hasil perbandingan yang diperoleh tetap sama.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan penggunaan dan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis pada spesies *Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*, dan *Ulva lactuca*. Pada jurnal [20], [21], dan [25], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis sama, yaitu evaporasi dengan gas nitrogen (vakum) dan pelarutan dengan buffer litium sitrat pH 2.2. Pada jurnal [44] (*Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*), kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu presipitasi dengan 24% TCA, sentrifugasi, pengenceran dengan buffer natrium sitrat 0.2N



pH 2.2, dan pengenceran (norleusin). Pada jurnal [10] (*Ulva lactuca*), kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan teknologi vakum, derivatisasi dengan PITC, pengeringan dengan teknologi vakum, pelarutan dengan *buffer* fosfat, pH diatur menjadi 7.4 dengan asetonitril, dan penyaringan. Pada jurnal [48] (*Ulva lactuca*), hasil hidrolisis tidak melalui proses tambahan. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis menggunakan proses evaporasi (jurnal [20], [21], dan [25]) atau pengeringan (jurnal [10]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa penggunaan dan kombinasi metode tambahan juga dapat menjadi faktor penyebab perbedaan hasil antara jurnal [20] (*Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*, *Ulva lactuca*), [21] (*Palmaria palmata*), atau [25] (*Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*) dengan jurnal [44] (*Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*) atau jurnal [48] (*Ulva lactuca*), kecuali pada jurnal [10] (*Ulva lactuca*). Pengecualian tersebut disebabkan karena meskipun metode pengeringan pada jurnal [10] lebih baik dibanding pemanasan biasa seperti evaporasi, namun hasil perbandingan yang diperoleh tetap sama, yaitu konsentrasi asam glutamat jurnal [20] lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [10]. Hal ini disebabkan karena *seaweed* jurnal [10] melalui proses ekstraksi secara berturut-turut pada suhu tinggi serta jenis metode ekstraksi protein yang digunakan kurang tepat.

Kemudian, faktor kelima adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [20] berasal dari Norwegia dan *seaweed* jurnal [21] dan [25] berasal dari Islandia, sedangkan *seaweed* jurnal [44] berasal dari Irlandia, *seaweed* jurnal [10] berasal dari India, dan *seaweed* jurnal [48] berasal dari Mesir. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen,

karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*, atau *Ulva lactuca* yang dipanen di Norwegia dan/atau Islandia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Irlandia, India, dan/atau Mesir.

Selanjutnya, faktor keenam adalah perbedaan waktu hidrolisis pada spesies *Palmaria palmata*, *Fucus vesiculosus*, dan *Alaria esculenta*, dimana hidrolisis pada jurnal [20], [21], dan [25] dilakukan selama 23 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [44] dilakukan selama 24 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Lalu, faktor ketujuh adalah perbedaan metode atau alat analisis, dimana analisis pada jurnal [20], [21], dan [25] dilakukan dengan Biochrom B30 *amino acid analyzer*, sedangkan analisis pada jurnal [44] dilakukan dengan Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer*, analisis pada jurnal [10] dilakukan dengan RP-HPLC, dan analisis pada jurnal [48] dilakukan dengan LC3000 *amino acid analyzer*. Keempat metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

#### **b) Hasil Hidrolisis Lebih Rendah**

Selain hasil yang lebih tinggi, hidrolisis *Fucus vesiculosus* dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N (jurnal [20]: 1.790 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [19]: 1.974 g/100g dw *seaweed*). Hasil yang bertentangan dengan sebelumnya, kemungkinan dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam

maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [20], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dengan gas nitrogen (vakum) dan pelarutan dengan *buffer* litium sitrat pH 2.2. Pada jurnal [19] kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan atau membran yang memiliki pori-pori berukuran 0.45 $\mu$ m, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses evaporasi (jurnal [20]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Namun hasil yang diperoleh berkebalikan, artinya kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor penyebab konsentrasi asam glutamat jurnal [20] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [19].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [20] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [19] berasal dari Spanyol. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Fucus vesiculosus* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Spanyol. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [20] dilakukan dengan Biochrom B30 *amino acid analyzer*, sedangkan analisis pada jurnal [19] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam

glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil dengan selisih yang kecil antara jurnal [20] dengan jurnal [19] pada spesies *Fucus vesiculosus* adalah negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis, jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

### c) Hasil Hidrolisis Berada dalam Kisaran

Selain hasil yang lebih tinggi dan lebih rendah, hidrolisis *Ulva lactuca* dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N (jurnal [20]: 1.220 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [53]: 0.155–2.078 g/100g dw *seaweed*). Hasil yang berbeda dari sebelumnya dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat dari jurnal [53] berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [53] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Pada jurnal [20], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [20] (1.220 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (2.078 g/100g dw *seaweed*).

Hasil yang lebih rendah kemungkinan dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [20], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi

dengan gas nitrogen (vakum) dan pelarutan dengan *buffer* litium sitrat pH 2.2. Pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses evaporasi (jurnal [20]) atau pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Selain itu, sebelumnya juga sudah dijelaskan bahwa pengeringan atau pemanasan dengan teknologi vakum lebih baik dibanding pengeringan dengan *flushing with air* atau *convective (air) drying*. Hal ini disebabkan karena hasil hidrolisis dikeringkan atau diuapkan dengan cara menurunkan tekanan dan menghilangkan oksigen selama proses sehingga titik didih pelarut menjadi lebih rendah dan waktu pengeringan menjadi lebih singkat (Uribe et al., 2018 dalam Gressler et al., 2010; Devahastin, 2017; McNeil et al., 2013). Namun dapat dilihat hasil yang diperoleh berkebalikan, artinya kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor penyebab konsentrasi asam glutamat jurnal [20] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [20] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [20] dilakukan dengan Biochrom B30 *amino acid analyzer*, sedangkan analisis pada

jurnal [53] dilakukan dengan RP–HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil dengan selisih yang kecil antara jurnal [20] dengan jurnal [53] pada spesies *Ulva lactuca* adalah negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis, jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

## 2) Perbandingan HCl 12N dengan HCl 0.01N

Hidrolisis *Fucus vesiculosus* dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N (jurnal [20]: 1.790 g/100g dw *seaweed*) juga menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang jauh lebih tinggi dibanding hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 0.01N (jurnal [4]: 0.043–0.054 g/100g dw *seaweed*). Hasil yang lebih tinggi disebabkan karena sebenarnya HCl 12N yang digunakan sebagai pelarut utama (katalis) pada jurnal [20] ditambah dengan pelarut lain yaitu air destilasi dan/atau norleusin 20mM sehingga konsentrasi akhir pelarut menjadi 6N. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa konsentrasi asam yang digunakan sama tetapi komponen pelarutnya berbeda. Hasil yang lebih tinggi pada jurnal [20] disebabkan karena penggunaan pelarut tambahan berupa air distilasi dan/atau norleusin 20mM. Penggunaan kedua pelarut tersebut berkaitan dengan pelarutan dan pengenceran untuk menurunkan konsentrasi dan/atau perlindungan agar senyawa yang sudah terhidrolisis tidak mengalami degradasi atau kerusakan selama proses hidrolisis masih berlangsung (NCBI<sup>e</sup>, 2021; McTigue & James, 2010; Rutherford & Sarwar, 2009). Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan pelarut tambahan terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Selain itu, sebelumnya juga sudah dijelaskan bahwa hasil yang lebih rendah pada jurnal [4] dapat disebabkan karena konsentrasi HCl yang digunakan jauh lebih kecil dibanding pelarut utama (katalis) pada jurnal [20], sehingga kemampuan pelarut

untuk memutus ikatan kurang optimal atau tidak sebaik pelarut yang konsentrasinya lebih tinggi. Tidak hanya itu, pelarut tersebut ditambah lagi dengan air distilasi sehingga konsentrasinya menjadi lebih rendah, artinya kemampuan pelarut untuk memutus ikatan semakin kurang optimal. Lalu, suhu dan waktu hidrolisis yang digunakan juga jauh berbeda, dimana hidrolisis dengan HCl 0.01N dilakukan pada suhu dan waktu yang jauh lebih rendah (90°C) dan singkat (1.5 jam atau 90 menit) dibanding metode standar (110°C; 20-24 jam) (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009). Modifikasi proses hidrolisis, meliputi jenis pelarut, suhu, dan waktu, untuk memperoleh hasil yang lebih baik sangat disarankan tetapi perlu mempertimbangkan fakta bahwa suhu hidrolisis memang harus cukup tinggi agar asam amino dapat terurai dengan baik, tetapi juga tidak boleh terlalu tinggi agar tidak terjadi degradasi atau kerusakan pada senyawa target (Tzia & George, 2003). Selain itu, perlu diketahui bahwa waktu standar merupakan lama proses hidrolisis untuk menghidrolisis protein menjadi asam amino secara lengkap, dengan kata lain sebagian besar asam amino sudah terurai dengan baik (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Nollet, 2004).

Selain pelarut utama (katalis), perbedaan hasil kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [20] kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dengan gas nitrogen (vakum) dan pelarutan dengan *buffer* litium sitrat pH 2.2. Pada jurnal [4] metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu hanya sentrifugasi. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses evaporasi (jurnal [20]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [20] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [4] berasal dari Britania Raya (Skotlandia). Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed*

seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Fucus vesiculosus* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Britania Raya (Skotlandia).

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan alat pemanas yang digunakan untuk hidrolisis. dimana hidrolisis pada jurnal [20] dilakukan dalam oven, sedangkan hidrolisis pada jurnal [4] dilakukan dalam blok pemanas. Kedua alat pemanas tersebut memiliki prinsip pemanasan yang berbeda yang berkaitan dengan cepat-lambatnya proses pemanasan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan alat pemanas terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [20] dilakukan dengan Biochrom B30 *amino acid analyzer*, sedangkan analisis pada jurnal [4] dilakukan dengan GC/MSD. Kedua metode atau alat analisis tersebut memiliki prinsip kerja yang berbeda, artinya kemungkinan besar tidak hanya berpengaruh terhadap waktu analisis, tetapi juga berpengaruh terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [20] lebih tinggi dibanding jurnal [4] dengan selisih yang besar adalah pelarut utama (katalis) dan salah satu atau beberapa faktor yang telah dijelaskan jika masing-masing faktor tersebut memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

### 3) Perbandingan HCl 12N dengan HCl Panas

Selain HCl 6N dan HCl 0.01N, pelarut utama (katalis) HCl 12N dapat dibandingkan juga dengan pelarut utama (katalis) HCl panas. Hidrolisis *Ulva lactuca* dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N dan HCl panas menunjukkan hasil yang cukup beragam. Hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N menghasilkan



konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi serta lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan HCl panas. Berikut penjelasan masing-masing hasil hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N.

#### **a) Hasil Hidrolisis Lebih Tinggi**

Hidrolisis *Ulva lactuca* dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N (jurnal [20]: 1.220 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl panas (jurnal [60]: 0.756 g/100g dw *seaweed*). Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa hasil yang lebih tinggi pada jurnal [20] disebabkan karena penggunaan pelarut tambahan berupa air distilasi dan/atau norleusin 20mM hingga konsentrasi pelarut menjadi 6N, yang berkaitan dengan pelarutan dan pengenceran untuk menurunkan konsentrasi dan/atau perlindungan agar senyawa yang sudah terhidrolisis tidak mengalami degradasi atau kerusakan selama proses hidrolisis masih berlangsung. Pada jurnal [60] tidak ada keterangan mengenai konsentrasi yang digunakan tetapi ada penambahan pelarut lain (1% fenol) untuk melindungi senyawa yang sudah terhidrolisis. Hal inilah yang menyebabkan sulit untuk mengetahui dengan jelas apakah penggunaan pelarut utama (katalis) HCl 12N memang lebih baik dibanding penggunaan pelarut utama (katalis) HCl panas, atau justru hasil tersebut bertentangan.

Namun, selain pelarut utama (katalis), perbedaan hasil kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan suhu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [12] dilakukan pada suhu 110°C, sedangkan hidrolisis pada jurnal [60] dilakukan pada suhu 108°C. Berbeda dengan waktu, dalam metode hidrolisis standar, sampel yang telah ditambahkan pelarut umumnya dididihkan dan diinkubasi pada suhu 110°C (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009). Modifikasi proses hidrolisis, meliputi jenis pelarut, suhu, dan waktu, untuk memperoleh hasil yang lebih baik sangat disarankan tetapi perlu mempertimbangkan fakta bahwa suhu hidrolisis memang harus cukup tinggi agar asam amino dapat terurai dengan baik, tetapi

juga tidak boleh terlalu tinggi agar tidak terjadi degradasi atau kerusakan pada senyawa target (Tzia & George, 2003). Selain itu, umumnya modifikasi metode standar dilakukan dengan menaikkan suhu sekaligus mengurangi waktu hidrolisis. Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan besar penurunan suhu hidrolisis tanpa peningkatan waktu hidrolisis menyebabkan turunnya efektifitas proses hidrolisis, sehingga konsentrasi asam glutamat yang diperoleh kurang optimal.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [20] kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dengan gas nitrogen (vakum) dan pelarutan dengan *buffer* litium sitrat pH 2.2. Pada jurnal [60] metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dengan teknologi vakum dan derivatisasi (PITC). Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses evaporasi (jurnal [20] dan [60]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa metode tambahan yang digunakan kedua jurnal tersebut kurang lebih sama, sehingga kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis bukan merupakan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [20] dan jurnal [60]. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [20] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [60] berasal dari Korea Selatan. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Korea Selatan.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [20] dilakukan dengan Biochrom B30 *amino acid analyzer*, sedangkan analisis pada jurnal [60] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, cukup sulit untuk menyimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [20] dengan jurnal [60] pada spesies *Ulva lactuca* adalah pelarut utama (katalis), tetapi sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada hidrolisis secara kimiawi, pelarut utama (katalis) yang dipilih memiliki pengaruh yang besar terhadap efektifitas proses. Selain itu, berdasarkan penjelasan sebelumnya, perbedaan suhu hidrolisis, negara asal *seaweed*, dan/atau metode alat analisis juga dapat menjadi faktor utama, mengingat selisih hasil yang diperoleh antara jurnal [20] dengan jurnal [60] relatif besar.

#### **b) Hasil Hidrolisis Lebih Rendah**

Selain hasil yang lebih tinggi, hidrolisis *Ulva lactuca* dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N (jurnal [20]: 1.220 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl panas (jurnal [35]: 1.476 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut bertentangan dengan penjelasan sebelumnya yang menyatakan bahwa penggunaan pelarut tambahan pada jurnal [20] hingga konsentrasi menjadi 6N merupakan alasan mengapa konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dengan pelarut utama (katalis) HCl 12N dapat lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dengan pelarut utama (katalis) HCl panas. Lalu, sama seperti sebelumnya, pada jurnal [35] dimana hidrolisis dilakukan dengan pelarut utama (katalis) HCl panas, tidak ada keterangan mengenai konsentrasi yang digunakan tetapi ada penambahan pelarut lain (5% fenol) untuk melindungi senyawa yang sudah terhidrolisis. Hal inilah yang menyebabkan sulit untuk mengetahui dengan jelas apakah penggunaan pelarut utama (katalis) HCl 12N

memang tidak lebih baik dibanding penggunaan pelarut utama (katalis) HCl panas, atau justru hasil tersebut bertentangan.

Selain pelarut utama (katalis), hasil yang lebih rendah pada jurnal [20] kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [20] kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dengan gas nitrogen (vakum) dan pelarutan dengan *buffer* litium sitrat pH 2.2. Pada jurnal [35] metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dan pelarutan dengan *buffer* NLE-100/norleusin. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses evaporasi (jurnal [20] dan [35]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa metode tambahan kedua jurnal tersebut kurang lebih sama, sehingga kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis bukan merupakan faktor penyebab perbedaan hasil antara jurnal [20] dan jurnal [35].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [20] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [35] berasal dari Afrika Selatan. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Afrika Selatan. Lalu, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [20] dilakukan dengan Biochrom B30 *amino acid analyzer*,

sedangkan analisis pada jurnal [35] dilakukan dengan IEC (CEC). Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, cukup sulit untuk menyimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [20] dengan jurnal [35] pada spesies *Ulva lactuca* adalah pelarut utama (katalis), tetapi sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada hidrolisis secara kimiawi, pelarut utama (katalis) yang dipilih memiliki pengaruh yang besar terhadap efektifitas proses. Namun ada kemungkinan bahwa penggunaan kedua pelarut utama (katalis) memang tidak terlalu berpengaruh terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh atau dapat dikatakan pengaruhnya kecil, sehingga perbedaan negara asal *seaweed* dan/atau metode alat analisis dapat menjadi faktor utama, mengingat selisih hasil yang diperoleh antara jurnal [20] dengan jurnal [35] relatif kecil.

#### **f. HCl Panas**

Berdasarkan hasil *review*, perbandingan antara konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl panas dan HCl 6N menunjukkan hasil yang cukup beragam. Hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl panas menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah serta berada dalam kisaran dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan HCl 6N. Berikut penjelasan masing-masing hasil hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl panas.

##### **1) Hasil Hidrolisis Lebih Tinggi**

Hidrolisis *Ulva lactuca* dengan pelarut utama (katalis) HCl panas (jurnal [35]: 1.476 g/100g dw *seaweed*; jurnal [60]: 0.756 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [10]: 0.0026 g/100g dw *seaweed*; jurnal [48]: 0.012–0.019 g/100g dw *seaweed*). Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada jurnal [35] dan [60] tidak ada keterangan mengenai konsentrasi yang digunakan tetapi ada

penambahan pelarut lain (5% dan 1% fenol) yang umumnya digunakan untuk melindungi senyawa yang sudah terhidrolisis agar tidak mengalami degradasi atau kerusakan senyawa selama proses hidrolisis masih berlangsung. Dari penjelasan tersebut, kemungkinan besar penggunaan pelarut tambahan dapat mengoptimalkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, tetapi tidak bisa langsung disimpulkan bahwa penggunaan pelarut tambahan merupakan faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [35] dan [60] dengan jurnal [10] dan [48]. Hal ini disebabkan karena pelarut utama (katalis) berbeda, dimana konsentrasi pelarut yang digunakan pada jurnal [10] dan [48] diketahui sedangkan pada jurnal [35] dan [60] tidak diketahui sehingga cukup sulit untuk dibandingkan dan mengetahui dengan jelas apakah penggunaan pelarut utama (katalis) HCl panas memang lebih baik dibanding penggunaan pelarut utama (katalis) HCl 6N, atau justru hasil tersebut bertentangan.

Selain pelarut utama (katalis), hasil yang lebih rendah pada jurnal [35] dan/atau [60] kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan suhu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [60] dilakukan pada suhu 108°C, sedangkan hidrolisis pada jurnal [10] dan [48] dilakukan pada suhu 110°C. Berbeda dengan waktu, dalam metode hidrolisis standar, sampel yang telah ditambahkan pelarut umumnya dididihkan dan diinkubasi pada suhu 110°C (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009). Modifikasi proses hidrolisis, meliputi jenis pelarut, suhu, dan waktu, untuk memperoleh hasil yang lebih baik sangat disarankan tetapi perlu mempertimbangkan fakta bahwa suhu hidrolisis memang harus cukup tinggi agar asam amino dapat terurai dengan baik, tetapi juga tidak boleh terlalu tinggi agar tidak terjadi degradasi atau kerusakan pada senyawa target (Tzia & George, 2003). Selain itu, umumnya modifikasi metode standar dilakukan dengan menaikkan suhu sekaligus mengurangi waktu hidrolisis. Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan besar penurunan suhu hidrolisis tanpa peningkatan waktu hidrolisis menyebabkan turunnya efektifitas proses hidrolisis, sehingga konsentrasi asam glutamat yang diperoleh kurang

optimal. Namun, faktanya hasil perbandingan yang diperoleh bertentangan dengan penjelasan tersebut.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan penggunaan proses ekstraksi protein. Pada jurnal [35] dan [60], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Pada jurnal [10], data konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein dengan alkali (NaOH 1N) pada suhu 80°C lalu didinginkan dan dinetralkan dengan HCl 6N. Pada sub bab sebelumnya sudah dijelaskan bahwa *alkali-acid extraction* merupakan metode ekstraksi protein yang kurang tepat karena penggunaan HCl 6N sebagai pelarut kedua tidak lebih baik dibanding larutan alkali dalam melarutkan protein, bahkan berpotensi menyebabkan kehilangan protein sebelum hidrolisis (Barbarino & Lourenço, 2005). Selain itu, sampel yang digunakan untuk hidrolisis pada jurnal [10] merupakan sisa hasil proses ekstraksi berturut-turut getah, lipid, ulvan yang dilakukan pada suhu tinggi sehingga jumlah protein yang diperoleh setiap proses selesai mengalami penurunan. Dari penjelasan tersebut dapat disimpulkan bahwa perbedaan hasil antara jurnal [35] dan [60] dengan jurnal [10] dengan selisih yang sangat besar disebabkan karena proses ekstraksi secara berturut-turut pada suhu tinggi serta jenis metode ekstraksi protein yang kurang tepat pada jurnal [10], sehingga konsentrasi asam glutamat yang diperoleh pada jurnal tersebut tidak normal atau jauh lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [35] dan [60].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan penggunaan dan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [35], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dan pelarutan dengan *buffer* NLE-100/norleusin. Pada jurnal [60], metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dengan teknologi vakum dan derivatisasi (PITC). Pada jurnal [10], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan teknologi vakum, derivatisasi dengan PITC, pengeringan dengan teknologi vakum, pelarutan dengan *buffer* fosfat, pH diatur menjadi 7.4 dengan asetonitril, dan penyaringan. Pada jurnal [48], hasil hidrolisis tidak melalui proses tambahan.

Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa melalui proses tambahan yang tepat lebih baik dibanding tidak melalui proses tambahan setelah hidrolisis. Lalu, pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses evaporasi (jurnal [35] dan [60]) atau pengeringan (jurnal [10]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor penyebab konsentrasi asam glutamat jurnal [35] dan [60] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [10] dan [48].

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [35] berasal dari Afrika Selatan dan *seaweed* jurnal [60] berasal dari Korea Selatan, sedangkan *seaweed* jurnal [10] berasal dari India dan *seaweed* jurnal [48] berasal dari Mesir. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Afrika Selatan atau Korea Selatan memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di India atau Mesir. Kemudian, faktor kelima adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [35] dilakukan dengan IEC (CEC), sedangkan analisis pada jurnal [10] dan [48] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.



## 2) Hasil Hidrolisis Lebih Rendah

Hidrolisis *Ulva lactuca* dengan pelarut utama (katalis) HCl panas (jurnal [60]: 0.756 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [53]: 0.155–2.078 g/100g dw *seaweed*). Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada jurnal [60] tidak ada keterangan mengenai konsentrasi yang digunakan tetapi ada penambahan pelarut lain (1% fenol) yang umumnya digunakan untuk melindungi senyawa yang sudah terhidrolisis agar tidak mengalami degradasi atau kerusakan senyawa selama proses hidrolisis masih berlangsung. Dari penjelasan tersebut, kemungkinan besar penggunaan pelarut tambahan dapat mengoptimalkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, tetapi tidak bisa langsung disimpulkan bahwa penggunaan pelarut tambahan merupakan faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [60] dengan jurnal [53]. Hal ini disebabkan karena pelarut utama (katalis) berbeda, dimana konsentrasi pelarut yang digunakan pada jurnal [53] diketahui sedangkan pada jurnal [60] tidak diketahui sehingga cukup sulit untuk dibandingkan dan mengetahui dengan jelas apakah penggunaan pelarut utama (katalis) HCl panas memang tidak lebih baik dibanding penggunaan pelarut utama (katalis) HCl 6N, atau justru hasil tersebut bertentangan.

Selain pelarut utama (katalis), hasil yang lebih rendah pada jurnal [60] kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan proses ekstraksi protein. Pada jurnal [60], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Pada jurnal [53], konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [60] (0.756 g/100g dw *seaweed*) tetap lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (2.078 g/100g dw *seaweed*). Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa

penggunaan proses ekstraksi protein tidak memengaruhi hasil perbandingan yang diperoleh, karena pada kondisi yang sama, konsentrasi asam glutamat jurnal [60] tetap lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [60], metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dengan teknologi vakum dan derivatisasi (PITC). Pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses evaporasi (jurnal [60]) atau pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Selain itu, sebelumnya juga sudah dijelaskan bahwa pengeringan atau pemanasan dengan teknologi vakum lebih baik dibanding pengeringan dengan *flushing with air* atau *convective (air) drying*. Hal ini disebabkan karena hasil hidrolisis dikeringkan atau diuapkan dengan cara menurunkan tekanan dan menghilangkan oksigen selama proses sehingga titik didih pelarut menjadi lebih rendah dan waktu pengeringan menjadi lebih singkat (Uribe et al., 2018 dalam Gressler et al., 2010; Devahastin, 2017; McNeil et al., 2013). Namun dapat dilihat hasil yang diperoleh berkebalikan, artinya kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor penyebab konsentrasi asam glutamat jurnal [60] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [60] berasal dari Korea Selatan, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017).

Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Korea Selatan memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia. Dengan demikian, cukup sulit untuk menyimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [60] dengan jurnal [53] pada spesies *Ulva lactuca* adalah pelarut utama (katalis), tetapi sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada hidrolisis secara kimiawi, pelarut utama (katalis) yang dipilih memiliki pengaruh yang besar terhadap efektifitas proses. Selain itu, negara asal *seaweed* juga dapat menjadi faktor utama, mengingat selisih hasil yang diperoleh antara jurnal [60] dengan jurnal [53] relatif besar.

### 3) Hasil Hidrolisis Berada dalam Kisaran

Selain hasil lebih tinggi dan lebih rendah, terdapat hasil yang menunjukkan bahwa konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl panas berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N. Hasil tersebut dapat ditemukan pada spesies *Ulva lactuca* dan *Ulva rigida*. Berikut penjelasan dari masing-masing spesies.

#### a) *Ulva lactuca*

Hidrolisis *Ulva lactuca* dengan pelarut utama (katalis) HCl panas (jurnal [35]: 1.476 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [53]: 0.155–2.078 g/100g dw *seaweed*). Hasil yang berbeda dari sebelumnya dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat dari jurnal [53] berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [53] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data

diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Pada jurnal [35], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [35] (1.476 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (2.078 g/100g dw *seaweed*).

Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada jurnal [35] tidak ada keterangan mengenai konsentrasi yang digunakan tetapi ada penambahan pelarut lain (5% fenol) yang umumnya digunakan untuk melindungi senyawa yang sudah terhidrolisis agar tidak mengalami degradasi atau kerusakan senyawa selama proses hidrolisis masih berlangsung. Dari penjelasan tersebut, kemungkinan besar penggunaan pelarut tambahan dapat mengoptimalkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, tetapi tidak bisa langsung disimpulkan bahwa penggunaan pelarut tambahan merupakan faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [35] dengan jurnal [53]. Hal ini disebabkan karena pelarut utama (katalis) berbeda, dimana konsentrasi pelarut yang digunakan pada jurnal [53] diketahui sedangkan pada jurnal [35] tidak diketahui sehingga cukup sulit untuk dibandingkan dan mengetahui dengan jelas apakah penggunaan pelarut utama (katalis) HCl panas memang tidak lebih baik dibanding penggunaan pelarut utama (katalis) HCl 6N, atau justru hasil tersebut bertentangan.

Selain pelarut utama (katalis), hasil yang lebih rendah pada jurnal [35] kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [35], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dan pelarutan dengan *buffer* NLE-100/norleusin. Pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah

satunya dengan proses evaporasi (jurnal [35]) atau pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis pada kedua jurnal tersebut dapat dikatakan kurang lebih sama, sehingga metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [35] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [35] berasal dari Afrika Selatan, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Afrika Selatan memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia. Kemudian, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [35] dilakukan dengan IEC (CEC), sedangkan analisis pada jurnal [53] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, cukup sulit untuk menyimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [35] dengan jurnal [53] pada spesies *Ulva lactuca* adalah pelarut utama (katalis), tetapi sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada hidrolisis secara kimiawi, pelarut utama (katalis) yang dipilih memiliki pengaruh yang besar terhadap efektifitas proses. Selain itu, negara asal *seaweed* dan/atau metode atau

alat analisis juga dapat menjadi faktor utama, jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

**b) *Ulva rigida***

Hidrolisis *Ulva rigida* dengan pelarut utama (katalis) HCl panas (jurnal [35]: 1.636 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [16]: 1.060–2.260 g/100g dw *seaweed*). Hasil yang berbeda dari sebelumnya dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat dari jurnal [16] berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [16] sedangkan pada jurnal [35], tidak dijelaskan bagaimana kondisi tumbuh (suhu, nitrogen, karbondioksida) *seaweed*. Jika diasumsikan peneliti pada masing-masing jurnal tersebut melakukan penelitian untuk mencari konsentrasi asam glutamat yang optimal (tertinggi), maka konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari jurnal [35] (1.636 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari jurnal [16] (2.260 g/100g dw *seaweed*).

Selain pelarut utama (katalis), hasil yang lebih rendah pada jurnal [35] kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [35], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dan pelarutan dengan *buffer* NLE-100/norleusin. Pada jurnal [16], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan gas nitrogen (*vacuum drying*), pelarutan dengan air deionisasi, penambahan *buffer* borat, dan derivatisasi dengan etoksimetilen malonat. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan

proses evaporasi (jurnal [35]) atau pengeringan (jurnal [16]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Selain itu, sebelumnya juga sudah dijelaskan bahwa pengeringan dengan teknologi vakum lebih baik dibanding pengeringan atau pemanasan (evaporasi) biasa. Hal ini disebabkan karena hasil hidrolisis dikeringkan atau diuapkan dengan cara menurunkan tekanan dan menghilangkan oksigen selama proses sehingga titik didih pelarut menjadi lebih rendah dan waktu pengeringan menjadi lebih singkat (Uribe et al., 2018 dalam Gressler et al., 2010; Devahastin, 2017; McNeil et al., 2013).

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [35] berasal dari Afrika Selatan, sedangkan *seaweed* jurnal [16] berasal dari Britania Raya (Inggris). Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva rigida* yang dipanen di Afrika Selatan memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Britania Raya (Inggris). Kemudian, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [35] dilakukan dengan IEC (CEC), sedangkan analisis pada jurnal [16] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, cukup sulit untuk menyimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [35] dengan jurnal [16] pada spesies *Ulva lactuca* adalah pelarut utama (katalis), tetapi sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada hidrolisis secara kimiawi, pelarut utama (katalis) yang dipilih

memiliki pengaruh yang besar terhadap efektifitas proses. Selain itu, negara asal *seaweed*, metode tambahan setelah hidrolisis, dan/atau metode atau alat analisis juga dapat menjadi faktor utama, jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

#### **g. HCl**

Berdasarkan hasil *review*, pelarut utama (katalis) HCl dapat dibandingkan dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N dan MSA 4N. Berikut penjelasan dari masing-masing perbandingan.

##### **1) Perbandingan HCl dengan HCl 6N**

Hidrolisis *Undaria pinnatifida* dengan pelarut utama (katalis) HCl 6N (jurnal [52]: 2.030 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl (jurnal [56]: 0.570–2.110 g/100g dw *seaweed*). Hasil seperti itu dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat dari jurnal [56] berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [56] terdiri dari 14 data yang diperoleh dari *seaweed* yang dipanen pada waktu, lokasi, dan fase hidup yang berbeda, sedangkan pada jurnal [52], *seaweed* dipanen pada waktu, lokasi, dan fase hidup yang berbeda dari jurnal [56]. Jika diasumsikan peneliti pada masing-masing jurnal tersebut melakukan penelitian untuk mencari konsentrasi asam glutamat yang optimal (tertinggi), maka konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari jurnal [56] (2.110 g/100g dw *seaweed*) lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari jurnal [52] (2.030 g/100g dw *seaweed*). Pada jurnal [56] tidak ada keterangan mengenai konsentrasi yang digunakan sehingga cukup sulit untuk dibandingkan dan mengetahui dengan jelas apakah penggunaan pelarut utama (katalis) HCl memang lebih baik dibanding penggunaan pelarut utama (katalis) HCl 6N, atau justru hasil tersebut bertentangan.



Selain pelarut utama (katalis), hasil yang lebih tinggi pada jurnal [56] kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [56], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penyaringan dengan membran yang memiliki ukuran pori-pori  $0.45\mu\text{m}$ , pengenceran (Milli-Q water), dan derivatisasi dengan PITC. Pada jurnal [52], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan atau membran yang memiliki ukuran pori-pori  $0.45\mu\text{m}$ , dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa tidak ada yang melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai, semuanya dimulai dengan pemisahan senyawa target berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang lebih sama. Hal ini menunjukkan bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [56] dengan jurnal [52].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [56] berasal dari Selandia Baru, sedangkan *seaweed* jurnal [52] berasal dari Iberia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Undaria pinnatifida* yang dipanen di Selandia Baru memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Iberia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [56] dilakukan selama 22 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [52] dilakukan selama 24 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [56] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [52] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang dapat menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [56] dan jurnal [52] pada spesies *Undaria pinnatifida* adalah pelarut utama (katalis), waktu hidrolisis, negara asal *seaweed*, dan/atau metode atau alat analisis. Dengan demikian, cukup sulit untuk menyimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [56] dengan jurnal [52] pada spesies *Undaria pinnatifida* adalah pelarut utama (katalis), tetapi sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada hidrolisis secara kimiawi, pelarut utama (katalis) yang dipilih memiliki pengaruh yang besar terhadap efektifitas proses. Selain itu, negara asal *seaweed*, waktu hidrolisis, dan/atau metode atau alat analisis juga dapat menjadi faktor utama, jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

## 2) Perbandingan HCl dengan MSA 4N

Hidrolisis *Undaria pinnatifida* dengan pelarut utama (katalis) MSA 4N (jurnal [2]: 1.207 – 1.264 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut utama (katalis) HCl (jurnal [56]: 0.570–2.110 g/100g dw *seaweed*). Hasil seperti itu dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat dari kedua jurnal berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [56] terdiri dari 14 data yang diperoleh dari *seaweed* yang dipanen pada waktu, lokasi, dan fase hidup yang berbeda, sedangkan kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [2] terdiri dari dua data, dimana satu data diperoleh dari *seaweed* yang dipanen pada bulan April–Juli (musim semi–panas)

dan data yang lain diperoleh dari *seaweed* yang dipanen pada bulan Oktober–November (musim gugur). Di antara kedua data tersebut, konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi diperoleh dari *seaweed* yang dipanen pada bulan Oktober–November (musim gugur), meskipun begitu selisih hasilnya tidak terlalu jauh sehingga dapat dikatakan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [2] memang dalam kisaran tersebut. Jika diasumsikan peneliti pada masing–masing jurnal tersebut melakukan penelitian untuk mencari konsentrasi asam glutamat yang optimal (tertinggi), maka konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari jurnal [56] (2.110 g/100g dw *seaweed*) lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari jurnal [2] (1.264 g/100g dw *seaweed*). Pada jurnal [56] tidak ada keterangan mengenai konsentrasi yang digunakan sehingga cukup sulit untuk dibandingkan dan mengetahui dengan jelas apakah penggunaan pelarut utama (katalis) HCl memang lebih baik dibanding penggunaan pelarut utama (katalis) HCl 6N, atau justru hasil tersebut bertentangan.

Selain pelarut utama (katalis), hasil yang lebih tinggi pada jurnal [56] kemungkinan juga dapat dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [56], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penyaringan dengan membran yang memiliki ukuran pori–pori 0.45 $\mu$ m, pengenceran (Milli-Q water), dan derivatisasi dengan PITC. Pada jurnal [2], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penyaringan dengan teknologi vakum, pengenceran dengan *ultrapure water*, dan penyaringan dengan membran selulosa yang memiliki ukuran pori–pori 0.45 $\mu$ m. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa tidak ada yang melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai, semuanya dimulai dengan pemisahan senyawa target berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang lebih sama. Hal ini menunjukkan bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [56] dengan jurnal [2].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [56] berasal dari Selandia Baru, sedangkan *seaweed* jurnal [2] berasal dari Spanyol. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Undaria pinnatifida* yang dipanen di Selandia Baru memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Spanyol. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [56] dilakukan selama 22 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [2] dilakukan selama 24 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [56] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [2] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, cukup sulit untuk menyimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [56] dengan jurnal [2] pada spesies *Undaria pinnatifida* adalah pelarut utama (katalis), tetapi sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada hidrolisis secara kimiawi, pelarut utama (katalis) yang dipilih memiliki pengaruh yang besar terhadap efektifitas proses. Selain itu, negara asal *seaweed*, waktu hidrolisis, dan/atau metode atau alat analisis juga dapat menjadi faktor utama, jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

#### 4.2.2. Perbandingan Pelarut Tambahan pada Proses Hidrolisis secara Kimiawi

Penambahan pelarut lain ke dalam pelarut utama (katalis) bertujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi pada proses hidrolisis (Rutherford & Sarwar, 2009; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Oleh sebab itu penggunaan dan jenis pelarut tambahan yang digunakan juga dapat menjadi faktor yang memengaruhi efektifitas proses hidrolisis (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Sikorski, 2001). Namun, pelarut tambahan tidak selalu harus digunakan, tergantung dari senyawa yang ingin diperoleh (Rutherford & Sarwar, 2009). Berdasarkan hasil *review*, beberapa pelarut tambahan yang sudah pernah digunakan dan dapat dibandingkan adalah norleusin, norvalin & DTT, fenol (0.1%, 1%, 5%, fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M), serta merkaptoetanol (Tabel 3.2.2). Berikut penjelasan dari masing-masing pelarut tambahan yang sudah pernah digunakan dan dapat dibandingkan.

##### a. Norleusin

Norleusin atau *norleucine* ( $C_6H_{13}NO_2$ ) merupakan senyawa asam amino non-proteinogenik (asam amino tapi bukan 20 asam amino yang secara alami dapat tersusun menjadi protein), yang terdiri dari asam heksanoat ( $C_6H_{12}O_2$ ) yang mengikat gugus amino ( $NH_2$ ) pada C-2 (NCBI<sup>e</sup>, 2021). Dalam proses hidrolisis dan analisis asam amino, penambahan norleusin dapat dilakukan sebelum atau sesudah hidrolisis sesuai tujuan yang ingin dicapai. Selain menjaga asam amino selama proses hidrolisis, penambahan norleusin sebelum hidrolisis dilakukan untuk mengecek seberapa banyak asam amino yang terdegradasi selama hidrolisis, tetapi setiap asam amino memiliki sensitivitas yang berbeda terhadap kondisi proses hidrolisis, sehingga penggunaan larutan ini untuk mengecek asam amino yang terdegradasi dianggap kurang tepat (Rutherford & Sarwar, 2009). Perbandingan pelarut tambahan norleusin 20mM dengan pelarut tambahan air destilasi & norleusin 20mM dalam pelarut utama (katalis) HCl 12N (oven 110°C 24 jam) dapat ditemukan pada spesies *Palmaria palmata* dan *Alaria esculenta*. Berikut penjelasan dari masing-masing spesies.

### 1) *Alaria esculenta*

Pada *Alaria esculenta*, penambahan norleusin 20mM (jurnal [25]: 1.390–1.590 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* dengan penambahan air destilasi & norleusin 20mM (jurnal [20]: 2.010g/100g dw *seaweed*) ke dalam HCl 12N. Perbedaan antara kedua jurnal tersebut adalah penggunaan air distilasi, dimana pada pelarut utama (katalis) jurnal [20] tidak hanya ditambah dengan norleusin 20mM, tetapi sebelumnya juga ditambah dengan air distilasi, sedangkan pada jurnal [25] pelarut utama (katalis) hanya ditambah dengan norleusin 20mM tanpa air destilasi. Penambahan air distilasi sebelum penambahan norleusin 20mM dan HCl 12N pada jurnal [20] dilakukan untuk melarutkan sampel yang berupa *seaweed* kering, sedangkan pada jurnal [25], sampel tidak diberi air distilasi karena sudah berwujud cair, dimana sebelumnya *seaweed* sudah melalui proses perebusan. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa penggunaan air distilasi bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [25] dengan jurnal [20], karena wujud sampel yang akan ditambah dengan norleusin 20mM dan HCl 12N sama yaitu cairan.

Kemudian, dibandingkan dengan penggunaan air distilasi sebagai pelarut tambahan, penggunaan proses perebusan *seaweed* sebelum hidrolisis kemungkinan memiliki pengaruh yang lebih besar terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Pada jurnal [20], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses perebusan, sedangkan pada jurnal [25], konsentrasi asam glutamat terdiri empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses perebusan dalam kurun waktu yang berbeda (15, 30, 60 menit) dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses perebusan. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses perebusan dibandingkan, maka dapat diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat diperoleh dari hidrolisis *seaweed* dengan penambahan norleusin 20mM (jurnal [25]: 1.460 g/100g dw *seaweed*) tetap lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* dengan penambahan air destilasi & norleusin 20mM (jurnal [20]: 2.010g/100g dw *seaweed*) ke dalam HCl 12N. Hasil tersebut

menunjukkan bahwa penggunaan proses perebusan sebelum hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [25] dengan jurnal [20], karena pada kondisi yang sama, hasil perbandingannya tetap sama, yaitu konsentrasi asam glutamat jurnal [25] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [20].

Jika penggunaan proses perebusan *seaweed* sebelum hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [25] dengan jurnal [20], maka satu-satunya faktor yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [25] lebih rendah konsentrasi asam glutamat dibanding jurnal [20] adalah negara asal *seaweed*. *Seaweed* jurnal [25] berasal dari Islandia sedangkan *seaweed* jurnal [20] berasal dari Norwegia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa *Alaria esculenta* yang dipanen di Islandia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Norwegia.

## 2) *Palmaria palmata*

Berdasarkan hasil *review*, perbandingan antara konsentrasi asam glutamat *Palmaria palmata* yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* dengan penambahan norleusin 20mM dan penambahan air destilasi & norleusin 20mM ke dalam HCl 12N menunjukkan hasil yang cukup beragam. Berikut penjelasan masing-masing hasil hidrolisis dengan penambahan norleusin 20mM atau air destilasi & norleusin 20mM ke dalam HCl 12N.

### a) Hasil Hidrolisis Relatif Lebih Rendah

Pada *Palmaria palmata*, penambahan norleusin 20mM (jurnal [25]: 1.780–3.000 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang relatif lebih rendah konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* dengan penambahan air destilasi & norleusin 20mM (jurnal [21]: 2.040–5.030 g/100g dw *seaweed*) ke dalam HCl 12N. Hasil yang relatif lebih rendah dapat diperoleh

karena konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut tambahan terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat tersebut kedua jurnal perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [25] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses perebusan dalam kurun waktu yang berbeda (15, 30, 60 menit) dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses perebusan, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [21] diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses perebusan sebelum hidrolisis.

Kemudian, kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [21] terdiri dari lima data, dimana empat data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses pemecahan sel yang berbeda yaitu homogenisasi serta tiga kombinasi homogenisasi dan hidrolisis dengan enzim xylanase dan selulase (10U, 50U, 100U), lalu satu data yang lain diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses pemecahan sel, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [25] diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses pemecahan sel sebelum hidrolisis. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses perebusan dan proses pemecahan sel dibandingkan, maka dapat diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat diperoleh dari hidrolisis *seaweed* dengan penambahan norleusin 20mM (jurnal [25]: 1.780 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* dengan penambahan air destilasi & norleusin 20mM (jurnal [21]: 2.040 g/100g dw *seaweed*) ke dalam HCl 12N.

Sebelumnya, perbedaan antara kedua jurnal tersebut adalah penggunaan air destilasi, dimana pada pelarut utama (katalis) jurnal [21] tidak hanya ditambah dengan norleusin 20mM, tetapi sebelumnya juga ditambah dengan air destilasi, sedangkan pada jurnal [25] pelarut utama (katalis) hanya ditambah dengan norleusin 20mM tanpa air destilasi. Penambahan air destilasi sebelum penambahan norleusin 20mM dan HCl 12N pada jurnal [21] dilakukan untuk melarutkan sampel yang berupa *seaweed* kering, sedangkan pada jurnal [25],



sampel tidak diberi air distilasi karena sudah berwujud cair, dimana sebelumnya *seaweed* sudah melalui proses perebusan. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa penggunaan air distilasi bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [25] dengan jurnal [21], karena wujud sampel yang akan ditambah dengan norleusin 20mM dan HCl 12N sama yaitu cairan. Dengan demikian, satu-satunya faktor yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [25] lebih rendah konsentrasi asam glutamat dibanding jurnal [21] adalah waktu atau musim panen, tetapi dalam kedua jurnal tersebut tidak disebutkan kapan *seaweed* dari masing-masing jurnal tersebut dipanen.

#### **b) Hasil Hidrolisis Berada dalam Kisaran**

Pada *Palmaria palmata*, penambahan air destilasi & norleusin 20mM (jurnal [20]: 2.130 g/100g dw *seaweed*) juga menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* dengan penambahan norleusin 20mM (jurnal [25]: 1.780–3.000 g/100g dw *seaweed*) ke dalam HCl 12N. Hasil tersebut dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut tambahan terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [25] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses perebusan dalam kurun waktu yang berbeda (15, 30, 60 menit) dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses perebusan, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [20] diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses perebusan sebelum hidrolisis. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses perebusan dibandingkan, maka dapat diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat diperoleh dari hidrolisis *seaweed* dengan penambahan norleusin 20mM (jurnal [25]: 1.780 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* dengan penambahan air destilasi & norleusin 20mM (jurnal [20]: 2.130 g/100g dw *seaweed*) ke dalam HCl 12N.

Sebelumnya sudah dijelaskan, perbedaan antara kedua jurnal tersebut adalah penggunaan air distilasi, dimana pada pelarut utama (katalis) jurnal [20] tidak hanya ditambah dengan norleusin 20mM, tetapi sebelumnya juga ditambah dengan air distilasi, sedangkan pada jurnal [25] pelarut utama (katalis) hanya ditambah dengan norleusin 20mM tanpa air destilasi. Penambahan air distilasi sebelum penambahan norleusin 20mM dan HCl 12N pada jurnal [20] dilakukan untuk melarutkan sampel yang berupa *seaweed* kering, sedangkan pada jurnal [25], sampel tidak diberi air distilasi karena sudah berwujud cair, dimana sebelumnya *seaweed* sudah melalui proses perebusan. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa penggunaan air distilasi bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [25] dengan jurnal [20], karena wujud sampel yang akan ditambah dengan norleusin 20mM dan HCl 12N sama yaitu cairan. Dengan demikian, satu-satunya faktor yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [25] lebih rendah konsentrasi asam glutamat dibanding jurnal [20] adalah negara asal *seaweed*. *Seaweed* jurnal [25] berasal dari Islandia sedangkan *seaweed* jurnal [20] berasal dari Norwegia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa *Palmaria palmata* yang dipanen di Islandia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Norwegia.

#### **b. Norvalin & DTT**

Norvalin atau *norvaline* ( $C_5H_{11}NO_2$ ) merupakan asam 2-aminopentanoat yang memiliki konfigurasi S (sulfur). Reagen ini merupakan salah satu senyawa asam amino non-proteinogenik (asam amino tapi bukan 20 asam amino yang secara alami dapat tersusun menjadi protein), serta isomer dari asam amino valin (NCBI<sup>m</sup>, 2021). Selain norleusin, norvalin juga merupakan larutan standar internal yang dapat digunakan sebelum atau sesudah hidrolisis sesuai tujuan yang ingin dicapai, tetapi secara umum reagen ini digunakan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil

hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi pada proses hidrolisis (Rutherford & Sarwar, 2009; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Kemudian, ditiotreititol atau dithiothreititol (DTT/C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) merupakan reagen pereduksi yang digunakan sebagai agen pelindung asam amino sistein dalam proses hidrolisis protein menjadi komponen asam amino. Reagen tersebut dapat menjadi agen pelindung karena mampu mencegah oksidasi gugus tiol (-SH) pada asam amino sistein serta mampu mereduksi disulfida menjadi ditiol (NCBI<sup>o</sup>, 2022).

Perbandingan antara konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan *seaweed* dengan penambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M dan tanpa pelarut tambahan, menunjukkan hasil yang cukup beragam. Hidrolisis dengan penambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M ke dalam HCl 6N diketahui menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah, lebih tinggi, serta berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis tanpa pelarut tambahan. Berikut penjelasan masing-masing hasil hidrolisis dengan pelarut tambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M.

### 1) Hasil Hidrolisis Lebih Tinggi

Hasil hidrolisis dengan pelarut tambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M dalam pelarut utama (katalis) HCl 6N yang lebih tinggi dibanding hasil hidrolisis tanpa pelarut tambahan dapat ditemukan pada *Saccharina latissima* dan *Ulva lactuca*. Berikut penjelasan dari masing-masing spesies.

#### a) *Saccharina latissima*

Pada *Saccharina latissima*, penambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M ke dalam HCl 6N (jurnal [30]: 1.352 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* tanpa penambahan pelarut (jurnal [53]: 0.0091–0.758 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga

asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung. Selain pelarut tambahan, perbedaan hasil kemungkinan juga dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis.

Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan proses ekstraksi protein. Pada jurnal [30], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Pada jurnal [53], konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [30] (1.352 g/100g dw *seaweed*) tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.758 g/100g dw *seaweed*). Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa penggunaan proses ekstraksi protein tidak memengaruhi hasil perbandingan yang diperoleh, karena pada kondisi yang sama, konsentrasi asam glutamat jurnal [30] tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [30], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, pengenceran dengan air deionisasi, penyaringan, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Tag. Pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat

memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [30] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [30] dilakukan selama 22 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [53] dilakukan selama 24 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Kemudian, faktor kelima adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [30] dilakukan dengan UPLC, sedangkan analisis pada jurnal [53] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [30] dengan jurnal [53] pada spesies *Saccharina latissima* adalah pelarut tambahan, Selain itu, karena selisih hasil relatif besar, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain seperti negara asal *seaweed*, metode tambahan setelah hidrolisis, waktu analisis, dan/atau metode atau alat analisis.

**b) *Ulva lactuca***

Pada *Ulva lactuca*, penambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M ke dalam HCl 6N (jurnal [30]: 2.363 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* tanpa penambahan pelarut (jurnal [10]: 0.0026 g/100g dw *seaweed*; jurnal [53]: 0.155–2.078 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung. Selain pelarut tambahan, perbedaan hasil kemungkinan juga dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis.

Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan dan metode ekstraksi protein. Pada jurnal [30], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Pada jurnal [53], konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [30] (2.363 g/100g dw *seaweed*) tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (2.078 g/100g dw *seaweed*). Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa penggunaan proses ekstraksi protein tidak memengaruhi hasil perbandingan yang diperoleh, karena pada kondisi yang sama, konsentrasi asam glutamat jurnal [30] tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Kemudian, pada jurnal [10], konsentrasi asam glutamate diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein dengan alkali (NaOH 1N) pada suhu 80°C lalu didinginkan dan dinetralkan dengan HCl 6N. Pada sub bab sebelumnya

sudah dijelaskan bahwa *alkali-acid extraction* merupakan metode ekstraksi protein yang kurang tepat karena penggunaan HCl 6N sebagai pelarut kedua tidak lebih baik dibanding larutan alkali dalam melarutkan protein, bahkan berpotensi menyebabkan kehilangan protein sebelum hidrolisis (Barbarino & Lourenço, 2005). Selain itu, sampel yang digunakan untuk hidrolisis pada jurnal [10] merupakan sisa hasil proses ekstraksi berturut-turut getah, lipid, ulvan yang dilakukan pada suhu tinggi sehingga jumlah protein yang diperoleh setiap proses selesai mengalami penurunan. Dari penjelasan tersebut dapat disimpulkan bahwa selisih yang sangat besar pada perbedaan hasil antara jurnal [30] dengan jurnal [10] juga disebabkan karena proses ekstraksi secara berturut-turut pada suhu tinggi serta jenis metode ekstraksi protein yang kurang tepat pada jurnal [10], sehingga konsentrasi asam glutamat yang diperoleh pada jurnal tersebut tidak normal atau jauh lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] dan [30].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [30], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, pengenceran dengan air deionisasi, penyaringan, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Tag. Pada jurnal [10], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan teknologi vakum, derivatisasi dengan PITC, pengeringan dengan teknologi vakum, pelarutan dengan *buffer* fosfat, pH diatur menjadi 7.4 dengan asetonitril, dan penyaringan. Pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal 10 dan [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Namun, hasil yang diperoleh berkebalikan, dimana konsentrasi asam glutamat jurnal [30] lebih tinggi dibanding konsentrasi asam

glutamat jurnal [10] dan [53]. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa perbedaan komponen metode utama (hidrolisis) dan proses ekstraksi yang tidak tepat pada jurnal [10] memiliki pengaruh yang lebih besar terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, dibanding perbedaan kombinasi metode tambahan yang digunakan.

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [30] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [10] berasal dari India dan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di India atau Swedia. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [30] dilakukan selama 22 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [10] dan [53] dilakukan selama 24 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Kemudian, faktor kelima adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [30] dilakukan dengan UPLC, sedangkan analisis pada jurnal [10] dan [53] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [30] dengan jurnal



[10] atau jurnal [53] pada spesies *Ulva lactuca* adalah pelarut tambahan, Selain itu, karena selisih hasil sangat besar, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain seperti penggunaan metode ekstraksi yang tidak tepat pada jurnal [10], negara asal *seaweed*, waktu analisis, dan/atau metode atau alat analisis.

## 2) Hasil Hidrolisis Lebih Rendah

Hasil hidrolisis dengan pelarut tambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M dalam pelarut utama (katalis) HCl 6N yang lebih rendah dibanding hasil hidrolisis tanpa pelarut tambahan dapat ditemukan pada *Porphyra purpurea*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*. Berikut penjelasan dari masing-masing spesies.

### a) *Porphyra purpurea*

Pada *Porphyra purpurea*, penambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M ke dalam HCl 6N (jurnal [30]: 2.003 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* tanpa penambahan pelarut (jurnal [52]: 2.757 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung. Hasil yang lebih rendah dapat diperoleh karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan memiliki pengaruh lebih besar terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [30], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, pengenceran dengan air deionisasi, penyaringan, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Tag. Pada jurnal [52], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan atau membran yang memiliki ukuran pori-pori 0.45µm, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor. Dari penjelasan

tersebut dapat diketahui bahwa tidak ada yang melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai, semuanya dimulai dengan pemisahan senyawa target berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang lebih sama. Hal ini menunjukkan bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [30] dengan jurnal [52].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [30] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [52] berasal dari Iberia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Porphyra purpurea* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Iberia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [30] dilakukan selama 22 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [52] dilakukan selama 24 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [30] dilakukan dengan UPLC, sedangkan analisis pada jurnal [52] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang

menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [30] dengan jurnal [52] pada spesies *Porphyra purpurea* bukan pelarut tambahan, tetapi salah satu antara negara asal *seaweed*, waktu hidrolisis, atau metode atau alat analisis. Namun perbedaan hasil antara jurnal [30] dengan jurnal [52] pada spesies *Porphyra purpurea* juga dapat disebabkan oleh lebih dari satu faktor jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

**b) *Ascophyllum nodosum***

Pada *Ascophyllum nodosum*, penambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M ke dalam HCl 6N (jurnal [30]: 0.571 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* tanpa penambahan pelarut (jurnal [19]: 1.715 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung. Hasil yang lebih rendah dapat diperoleh karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan memiliki pengaruh lebih besar terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [30], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, pengenceran dengan air deionisasi, penyaringan, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Tag. Pada jurnal [19], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan atau membran yang memiliki ukuran pori-pori 0.45 $\mu$ m, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa tidak ada yang melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai, semuanya dimulai dengan pemisahan senyawa target berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang

lebih sama. Hal ini menunjukkan bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [30] dengan jurnal [19].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [30] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [19] berasal dari Spanyol. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ascophyllum nodosum* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Spanyol. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [30] dilakukan selama 22 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [19] dilakukan selama 24 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [30] dilakukan dengan UPLC, sedangkan analisis pada jurnal [19] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [30] dengan jurnal [19] pada spesies *Porphyra purpurea* bukan pelarut tambahan, tetapi negara asal *seaweed*, waktu hidrolisis, dan/atau metode atau alat analisis.

c) *Fucus vesiculosus*

Pada *Fucus vesiculosus*, penambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M ke dalam HCl 6N (jurnal [30]: 0.645 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *seaweed* tanpa penambahan pelarut (jurnal [19]: 1.974 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung. Hasil yang lebih rendah dapat diperoleh karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan memiliki pengaruh lebih besar terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [30], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, pengenceran dengan air deionisasi, penyaringan, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Tag. Pada jurnal [19], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan atau membran yang memiliki ukuran pori-pori 0.45 $\mu$ m, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa tidak ada yang melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai, semuanya dimulai dengan pemisahan senyawa target berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang lebih sama. Hal ini menunjukkan bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [30] dengan jurnal [19].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [30] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [19] berasal dari Spanyol. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat

tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ascophyllum nodosum* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Spanyol. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [30] dilakukan selama 22 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [19] dilakukan selama 24 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [30] dilakukan dengan UPLC, sedangkan analisis pada jurnal [19] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [30] dengan jurnal [19] pada spesies *Porphyra purpurea* bukan pelarut tambahan, tetapi negara asal *seaweed*, waktu hidrolisis, dan/atau metode atau alat analisis.

### 3) Hasil Hidrolisis Berada dalam Kisaran

Selain hasil yang lebih tinggi dan lebih rendah, penambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M ke dalam HCl 6N (jurnal [30]: 2.036 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis *Porphyra umbilicalis* tanpa penambahan pelarut (jurnal [53]: 0.289–2.830 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut berbentuk kisaran. Oleh

karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut tambahan terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut perlu dijabarkan. Pada jurnal [30], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Pada jurnal [53], konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [30] (2.036 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (2.830 g/100g dw *seaweed*).

Hasil tersebut bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung. Hasil yang lebih rendah dapat diperoleh karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan memiliki pengaruh lebih besar terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [30], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, pengenceran dengan air deionisasi, penyaringan, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Tag. Pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [30] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Porphyra umbilicalis* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [30] dilakukan selama 22 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [53] dilakukan selama 24 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [30] dilakukan dengan UPLC, sedangkan analisis pada jurnal [53] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [30] dengan jurnal [53] pada spesies *Saccharina latissima* adalah pelarut tambahan, Selain itu, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain seperti negara asal *seaweed*, metode tambahan setelah hidrolisis, waktu analisis, dan/atau metode atau alat analisis jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.



### c. Fenol

Fenol atau *phenol* ( $C_6H_5OH/C_6H_6O$ ) merupakan senyawa organik yang mengandung gugus hidroksil ( $-OH$ ) yang terikat langsung pada atom karbon dalam cincin benzena; karena bentuk cincin tersebut, pelarut fenol bersifat asam. Fenol menguap lebih lambat daripada air (titik didih:  $82^\circ C$ ), uapnya lebih berat dari udara (Daintith, 2008) (NCBI<sup>f</sup>, 2021). Dalam proses hidrolisis asam (*acid hydrolysis*), fenol ditambahkan ke pelarut asam sebagai agen pelindung sampel agar asam amino yang hilang akibat degradasi dapat berkurang selama hidrolisis sehingga hasil asam amino yang diperoleh dapat meningkat (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Rutherford & Sarwar, 2009). Penambahan fenol hingga 1% diketahui efektif untuk melindungi hampir semua asam amino kecuali triptofan dan sistein (Toldra & Leo, 2021). Berdasarkan hasil *review*, fenol digunakan dalam berbagai konsentrasi (0.1%, 1%, 5%) dan dapat dikombinasikan dengan pelarut lain (1% fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M). Berikut penjelasan dari masing-masing pelarut tambahan fenol.

#### 1) 0.1% Fenol

Dalam *review* ini, pelarut tambahan 0.1% fenol sudah pernah digunakan dalam proses hidrolisis *Ulva lactuca* dan konsentrasi asam glutamatnya dapat dibandingkan dengan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis tanpa pelarut tambahan serta hidrolisis dengan pelarut tambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M. Berikut penjelasan dari masing-masing perbandingan.

##### a) Perbandingan 0.1% Fenol dengan Tanpa Pelarut

Penambahan pelarut 0.1% fenol ke dalam HCl 6N (jurnal [9]: 1.095 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis tanpa pelarut tambahan (jurnal [10]: 0.0026 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung dan penambahan fenol hingga 1% diketahui efektif untuk melindungi hampir semua asam amino kecuali

triptofan dan sistein. Namun, tidak dapat langsung disimpulkan bahwa hasil yang lebih tinggi disebabkan karena penggunaan pelarut tambahan 0.1% fenol. Hal ini disebabkan karena pada jurnal [10], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein dengan alkali (NaOH 1N) pada suhu 80°C lalu didinginkan dan dinetralkan dengan HCl 6N. Pada sub bab sebelumnya sudah dijelaskan bahwa *alkali-acid extraction* merupakan metode ekstraksi protein yang kurang tepat karena penggunaan HCl 6N sebagai pelarut kedua tidak lebih baik dibanding larutan alkali dalam melarutkan protein, bahkan berpotensi menyebabkan kehilangan protein sebelum hidrolisis (Barbarino & Lourenço, 2005). Selain itu, sampel yang digunakan untuk hidrolisis pada jurnal [10] merupakan sisa hasil proses ekstraksi berturut-turut getah, lipid, ulvan yang dilakukan pada suhu tinggi sehingga jumlah protein yang diperoleh setiap proses selesai mengalami penurunan. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa sebelum hidrolisis, konsentrasi protein yang diperoleh sudah sangat rendah akibat proses ekstraksi secara berturut-turut pada suhu tinggi serta jenis metode ekstraksi protein yang kurang tepat pada jurnal [10], sehingga konsentrasi asam glutamat yang diperoleh pada jurnal tersebut tidak normal atau jauh lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] maupun jurnal [9].

Selain pelarut tambahan dan penggunaan proses ekstraksi secara berturut-turut pada suhu tinggi serta jenis metode ekstraksi protein yang kurang tepat pada jurnal [10], terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan dapat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [9], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penambahan *buffer* sitrat (pH 2.2), pH diatur antara 0.5–1 (NaOH 7.5N) & 2.2 (NaOH 1N), penambahan norleusin, pengenceran (*buffer* sitrat), dan penyaringan. Pada jurnal [10], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan teknologi vakum, derivatisasi dengan PITC, pengeringan dengan teknologi vakum, pelarutan dengan *buffer* fosfat, pH diatur menjadi 7.4 dengan asetonitril, dan penyaringan.

Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [10]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Namun hasil yang diperoleh bertentangan, sehingga dapat diketahui bahwa perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis tidak memengaruhi hasil perbandingan yang diperoleh, dimana konsentrasi asam glutamat jurnal [9] lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [10].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [9] berasal dari Tunisia, sedangkan *seaweed* jurnal [10] berasal dari India. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Tunisia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di India. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [9] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [10] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [9] dengan jurnal [10] pada spesies *Ulva lactuca* adalah penggunaan proses ekstraksi secara berturut-turut pada suhu tinggi serta jenis metode ekstraksi protein yang kurang tepat pada jurnal [10] dan pelarut tambahan. Selain itu, perbedaan hasil antara jurnal [9] dengan jurnal [10] juga

dapat disebabkan oleh faktor negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis.

Selain hasil yang lebih tinggi, penambahan pelarut 0.1% fenol ke dalam HCl 6N (jurnal [9]: 1.095 g/100g dw *seaweed*) juga menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis tanpa pelarut tambahan (jurnal [53]: 0.155–2.078 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung dan penambahan fenol hingga 1% diketahui efektif untuk melindungi hampir semua asam amino kecuali triptofan dan sistein. Hasil yang lebih rendah dapat diperoleh karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan memiliki pengaruh lebih besar terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan proses ekstraksi protein. Pada jurnal [9], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Pada jurnal [53], konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [9] (1.095 g/100g dw *seaweed*) tetap lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (2.078 g/100g dw *seaweed*). Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa penggunaan proses ekstraksi protein tidak memengaruhi hasil perbandingan yang diperoleh, karena pada kondisi yang sama, konsentrasi asam glutamat jurnal [9] tetap lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [9], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penambahan *buffer* sitrat (pH 2.2), pH diatur antara 0.5–1 (NaOH 7.5N) & 2.2 (NaOH 1N), penambahan norleusin, pengenceran (*buffer* sitrat), dan penyaringan. Pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis memengaruhi hasil perbandingan yang diperoleh, dimana konsentrasi asam glutamat jurnal [9] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [9] berasal dari Tunisia, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Tunisia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [9] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [53] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas

pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [9] dengan jurnal [53] pada spesies *Ulva lactuca* bukan pelarut tambahan, tetapi salah satu antara negara asal *seaweed*, waktu hidrolisis, dan/atau metode atau alat analisis. Namun selisih hasil yang relatif besar menunjukkan bahwa perbedaan hasil antara jurnal [9] dengan jurnal [53] juga dapat disebabkan oleh lebih dari satu faktor jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

#### **b) Perbandingan 0.1% Fenol dengan Norvalin 3.125mM & DTT 0.1M**

Penambahan pelarut 0.1% fenol ke dalam HCl 6N (jurnal [9]: 1.095 g/100g dw *seaweed*) diketahui menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M (jurnal [30]: 2.363 g/100g dw *seaweed*). Selain pelarut tambahan, terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan juga dapat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [9], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penambahan *buffer* sitrat (pH 2.2), pH diatur antara 0.5–1 (NaOH 7.5N) & 2.2 (NaOH 1N), penambahan norleusin, pengenceran (*buffer* sitrat), dan penyaringan. Pada jurnal [30], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, pengenceran dengan air deionisasi, penyaringan, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Tag. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa tidak ada yang melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai, semuanya dimulai dengan pemisahan senyawa target berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang lebih sama. Hal ini menunjukkan bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [9] dengan jurnal [30].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [9] berasal dari Tunisia, sedangkan *seaweed* jurnal [30] berasal dari

Norwegia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Tunisia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Norwegia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [9] dilakukan selama 24 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [30] dilakukan selama 22 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [9] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [30] dilakukan dengan UPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [9] dengan jurnal [30] pada spesies *Ulva lactuca* adalah pelarut tambahan, Selain itu, karena selisih hasil relatif besar, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain seperti negara asal *seaweed*, waktu analisis, dan/atau metode atau alat analisis.

## 2) 1% Fenol dan 5% Fenol

Dalam *review* ini, pelarut tambahan 1% dan 5% fenol sudah pernah digunakan dalam proses hidrolisis *Ulva lactuca* dan *Ulva rigida* serta konsentrasi asam glutamatnya dapat saling dibandingkan dan dibandingkan dengan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis tanpa pelarut tambahan. Berikut penjelasan dari masing-masing perbandingan.

### a) Perbandingan 1% Fenol dengan Tanpa Pelarut

Pada *Ulva rigida*, penambahan pelarut 1% fenol ke dalam HCl 6N (jurnal [50]: 0.120 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis tanpa pelarut tambahan (jurnal [22]: 0.947 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung dan penambahan fenol hingga 1% diketahui efektif untuk melindungi hampir semua asam amino kecuali triptofan dan sistein. Hasil yang lebih rendah dapat diperoleh karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan memiliki pengaruh lebih besar terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [50], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu derivatisasi dengan reagen PITC, sedangkan pada jurnal [22], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, penetralan dengan *buffer* borat pH 10.2. penambahan norvalin., dan sentrifugasi. Pemisahan, salah satunya sentrifugasi, dilakukan untuk menghilangkan senyawa yang tidak diinginkan atau senyawa yang dapat mengganggu proses analisis, sehingga senyawa target dapat dideteksi secara optimal dan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh juga optimal. Dari penjelasan tersebut, ada kemungkinan bahwa proses analisis asam amino pada jurnal [50] tidak berjalan



dengan baik karena setelah hidrolisis selesai tidak dilakukan proses pemisahan, akibatnya terdapat senyawa lain yang mengganggu selama proses analisis berlangsung, sehingga konsentrasi asam glutamat yang dideteksi tidak optimal.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kondisi tumbuh *seaweed*. *Seaweed* kedua jurnal berasal dari negara yang sama yaitu Portugal, tetapi kondisi tempat tumbuhnya berbeda. *Seaweed* jurnal [22] tumbuh dan dipanen di laut (liar/alami), sedangkan *seaweed* jurnal [50] tumbuh dan dipanen di laut IMTA (*Integrated Multi-Trophic Aquaculture*) (buatan/budidaya/terkontrol). Kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) diketahui dapat memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa penggunaan sistem IMTA untuk budidaya *seaweed* dapat menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding memanen *seaweed* (liar) di laut. Hal ini disebabkan karena dalam sistem budidaya, baik yang umum maupun IMTA, kondisi tumbuh *seaweed* yang optimal dapat dipilih dan diterapkan sehingga dapat diperoleh konsentrasi asam glutamat yang optimal. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [22] dengan jurnal [50] pada spesies *Ulva rigida* adalah kondisi tempat tumbuh *seaweed* dan/atau metode tambahan setelah hidrolisis.

#### **b) Perbandingan 1% Fenol dengan 5% Fenol**

Pada *Ulva lactuca*, penambahan pelarut 1% fenol (jurnal [60]: 0.756 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan penambahan pelarut 5% fenol ke dalam HCl panas (jurnal [35]: 1.476 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut bertentangan dengan teori yang menyatakan bahwa penambahan fenol hingga 1% diketahui efektif untuk melindungi hampir semua asam amino kecuali triptofan dan sistein. Hasil yang lebih rendah dapat diperoleh karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan memiliki pengaruh lebih besar terhadap konsentrasi asam

glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [60], metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dengan teknologi vakum dan derivatisasi (PITC). Pada jurnal [35], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dan pelarutan dengan *buffer* NLE-100/norleusin. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses evaporasi (jurnal [60] dan [35]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis pada kedua jurnal tersebut dapat dikatakan kurang lebih sama, sehingga metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [60] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [35].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan suhu hidrolisis, dimana hidrolisis hidrolisis pada jurnal [60] dilakukan pada suhu 108°C, sedangkan pada jurnal [35] dilakukan pada suhu 110°C. Berbeda dengan waktu, dalam metode hidrolisis standar, sampel yang telah ditambahkan pelarut umumnya dididihkan dan diinkubasi pada suhu 110°C (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009). Modifikasi proses hidrolisis, meliputi jenis pelarut, suhu, dan waktu, untuk memperoleh hasil yang lebih baik sangat disarankan tetapi perlu mempertimbangkan fakta bahwa suhu hidrolisis memang harus cukup tinggi agar asam amino dapat terurai dengan baik, tetapi juga tidak boleh terlalu tinggi agar tidak terjadi degradasi atau kerusakan pada senyawa target (Tzia & George, 2003). Selain itu, umumnya modifikasi metode standar dilakukan dengan menaikkan suhu sekaligus mengurangi waktu hidrolisis. Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan besar penurunan suhu hidrolisis tanpa peningkatan waktu hidrolisis menyebabkan

turunnya efektifitas proses hidrolisis, sehingga konsentrasi asam glutamat yang diperoleh kurang optimal.

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [60] berasal dari Korea Selatan, sedangkan *seaweed* jurnal [35] berasal dari Afrika Selatan. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Korea Selatan memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Afrika Selatan. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [60] dilakukan dengan RP-HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [35] dilakukan dengan IEC (CEC). Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [60] dengan jurnal [35] pada spesies *Ulva lactuca* adalah negara asal *seaweed*, suhu hidrolisis, dan/atau metode atau alat analisis.

### **3) 1% Fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M**

Dalam *review* ini, pelarut tambahan 0.1% fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M sudah pernah digunakan dalam proses hidrolisis *Saccharina latissima* dan konsentrasi asam glutamatnya dapat dibandingkan dengan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis tanpa pelarut tambahan serta hidrolisis dengan pelarut tambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M. Berikut penjelasan dari masing-masing perbandingan.

### a) Perbandingan 1% Fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M dengan Tanpa Pelarut

Penambahan pelarut 1% fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M ke dalam HCl 6N (jurnal [23]: 0.611–2.998 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis tanpa pelarut tambahan (jurnal [53]: 0.0091–0.758 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung. Penambahan fenol hingga 1% diketahui efektif untuk melindungi hampir semua asam amino kecuali triptofan dan sistein, sedangkan penambahan DTDPA (3,3'-asam ditiodipropionik) dilakukan untuk melindungi asam amino sistein agar tidak mengalami degradasi selama proses hidrolisis sehingga tetap dapat terdeteksi. Selain itu, dengan penambahan senyawa ini, dimungkinkan untuk melakukan deteksi tanpa proses penurunan atau derivatisasi (*derivatization*). Dalam penggunaannya dalam proses hidrolisis dengan asam, larutan DTDPA umumnya disiapkan dalam larutan NaOH 0.2M (Johns, 2021).

Selain pelarut tambahan, perbedaan hasil kemungkinan juga dipengaruhi oleh faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [23], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dan pelarutan dengan *buffer* A (natrium sitrat). Pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAC 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [23] dan [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dari penjelasan

tersebut, diketahui bahwa kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis pada kedua jurnal tersebut dapat dikatakan kurang lebih sama, sehingga metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [23] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [23] berasal dari Denmark, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Denmark memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [23] dilakukan dengan Waters *amino acid analyzer*, sedangkan analisis pada jurnal [53] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [23] dengan jurnal [53] pada spesies *Saccharina latissima* adalah pelarut tambahan, negara asal *seaweed*, dan/atau metode atau alat analisis.

#### **b) Perbandingan 1% Fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M dengan Norvalin 3.125mM & DTT 0.1M**

Penambahan pelarut norvalin 3.125mM & DTT 0.1M (jurnal [30]: 1.352 g/100g dw *seaweed*) diketahui menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan 1% fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M ke dalam HCl 6N (jurnal [23]:

0.611–2.998 g/100g dw *seaweed*). Pada jurnal [23], kisaran konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data yang diperoleh dari *seaweed* yang dipanen pada dua lokasi berbeda dan dua waktu yang berbeda. Jika diasumsikan peneliti pada masing–masing jurnal tersebut melakukan penelitian untuk mencari konsentrasi asam glutamat yang optimal (tertinggi), maka konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari jurnal [23] (2.998 g/100g dw *seaweed*) lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari jurnal [30] (1.352 g/100g dw *seaweed*). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa penggunaan pelarut tambahan 1% fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M ke dalam HCl 6N lebih baik dibanding pelarut tambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M. Selain pelarut tambahan, terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan juga dapat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [23], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dan pelarutan dengan *buffer* A (natrium sitrat). Pada jurnal [30], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, pengenceran dengan air deionisasi, penyaringan, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Tag. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [23]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan setelah hidrolisis merupakan faktor lain yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [23] lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [30].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [23] berasal dari Denmark, sedangkan *seaweed* jurnal [30] berasal dari Norwegia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat

tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Denmark memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Norwegia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [23] dilakukan selama 24 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [30] dilakukan selama 22 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [23] dilakukan dengan Waters *amino acid analyzer*, sedangkan analisis pada jurnal [30] dilakukan dengan UPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [23] dengan jurnal [30] pada spesies *Saccharina latissima* adalah pelarut tambahan, Selain itu, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain seperti metode tambahan setelah hidrolisis negara asal *seaweed*, waktu analisis, dan/atau metode atau alat analisis jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

#### **d. Merkaptoetanol**

Dalam proses hidrolisis asam (*acid hydrolysis*), merkaptoetanol atau *mercaptoethanol* ( $\text{ME}/\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ) berperan sebagai agen pelindung asam amino khususnya triptofan dan sistein yang berkurang atau hilang selama hidrolisis akibat degradasi (Fountoulakis &

Hans-Werner, 1998; Ishii & Giovanni, 2014). Penambahan 0.4% ME ke dalam pelarut asam diketahui dapat memulihkan triptofan sebesar 100% setelah hidrolisis kecuali pada sampel dengan konsentrasi karbohidrat yang tinggi (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa tujuan utama penambahan ME adalah menjaga asam amino triptofan karena sudah terbukti efektif, tapi belum diketahui apakah penambahan ME juga dapat menjaga asam glutamat seefektif triptofan. Kemudian, penambahan 0.4% merkaptotanol pada hidrolisis sampel dengan konsentrasi karbohidrat yang tinggi diketahui kurang efektif. *Seaweed* merupakan bahan pangan nabati yang secara umum memiliki ikatan kimia yang sangat kompleks (Speinght, 2018). Ikatan kompleks tersebut dapat ditemukan pada dinding sel *seaweed* yang tersusun dari berbagai jenis polisakarida (Walsh, 2002; Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2013). Oleh karena itu, ada kemungkinan penambahan 0.4% merkaptotanol ke dalam pelarut utama (katalis), tidak terlalu efektif atau tidak memengaruhi konsentrasi asam glutamat *seaweed*. Dalam *review* ini, pelarut tambahan 0.4% merkaptotanol sudah pernah digunakan dalam proses hidrolisis *Saccharina latissima* dan konsentrasi asam glutamatnya dapat dibandingkan dengan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis tanpa pelarut tambahan, hidrolisis dengan pelarut tambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M, serta hidrolisis dengan pelarut tambahan 1% fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M. Berikut penjelasan dari masing-masing perbandingan.

### **1) Perbandingan 0.4% Merkaptotanol dengan Tanpa Pelarut**

Penambahan pelarut 0.4% merkaptotanol ke dalam HCl 6N (jurnal [41]: 0.855–0.944 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis tanpa pelarut tambahan (jurnal [53]: 0.0091–0.758g/100g dw *seaweed*). Untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat jurnal [41] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang dikeringkan dengan metode *air drying* pada tiga suhu yang berbeda (25, 40, 70°C), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang dikeringkan dengan metode *freeze drying*, sedangkan konsentrasi



asam glutamat pada jurnal [53] diperoleh dari *seaweed* yang dikeringkan dengan metode *freeze drying*. Kemudian, kisaran konsentrasi asam glutamat jurnal [53] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [41] diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang dikeringkan dengan metode *freeze drying* dan tidak melalui proses ekstraksi protein dibandingkan, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [41] (0.855g/100g dw *seaweed*) lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.758 g/100g dw *seaweed*) dengan selisih yang kecil.

Hasil tersebut tidak sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan secara umum memang digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung, tetapi penambahan 0.4% merkptoetanol ke dalam pelarut utama (katalis) tidak terlalu efektif untuk *seaweed* yang tinggi akan karbohidrat dan penggunaan 0.4% merkptoetanol umumnya dilakukan khusus untuk menjaga asam amino triptofan dan sistein. Hasil yang lebih tinggi pada jurnal [41] dapat disebabkan karena adanya faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [41], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penyaringan, pengaturan pH menjadi 2.2, dan pengenceran *buffer* sitrat pH 2.2. Pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena

degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Namun, hasil yang diperoleh bertentangan dengan penjelasan tersebut, Namun hasil yang diperoleh bertentangan, sehingga dapat diketahui bahwa perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis tidak memengaruhi hasil perbandingan yang diperoleh, dimana konsentrasi asam glutamat jurnal [41] lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [41] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [41] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [53] dilakukan dengan RP-PLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [41] dengan jurnal [53] pada spesies *Saccharina latissima* bukan pelarut tambahan, melainkan salah satu antara negara asal *seaweed* dan metode atau alat analisis, atau kedua faktor tersebut, jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

## **2) Perbandingan 0.4% Merkptoetanol dengan Norvalin 3.125mM & DTT 0.1M**

Penambahan pelarut 0.4% merkptoetanol ke dalam HCl 6N (jurnal [41]: 0.855–0.944 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis

dengan pelarut tambahan norvalin 3.125mM & DTT 0.1M (jurnal [30]: 1.352 g/100g dw *seaweed*). Untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat jurnal [41] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang dikeringkan dengan metode *air drying* pada tiga suhu yang berbeda (25, 40, 70°C), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang dikeringkan dengan metode *freeze drying*, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [30] diperoleh dari *seaweed* yang dikeringkan dengan metode *freeze drying*. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang dikeringkan dengan metode *freeze drying* dan tidak melalui proses ekstraksi protein dibandingkan, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [41] (0.855g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [30] (1.352 g/100g dw *seaweed*) dengan selisih yang kecil.

Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan secara umum memang digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung, tetapi penambahan 0.4% merkaptotanol ke dalam pelarut utama (katalis) tidak terlalu efektif untuk *seaweed* yang tinggi akan karbohidrat dan penggunaan 0.4% merkaptotanol umumnya dilakukan khusus untuk menjaga asam amino triptofan dan sistein. Selain pelarut tambahan, perbedaan hasil antara jurnal [41] dan jurnal [30] juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [41], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penyaringan, pengaturan pH menjadi 2.2, dan pengenceran *buffer* sitrat pH 2.2. Pada jurnal [30], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, pengenceran dengan air deionisasi, penyaringan, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Tag. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah

kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Namun kedua jurnal tersebut, diketahui tidak melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai, semuanya dimulai dengan pemisahan senyawa target berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang lebih sama, Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa metode tambahan bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [41] dan jurnal [30].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kondisi tumbuh *seaweed*. *Seaweed* kedua jurnal berasal dari negara yang sama yaitu Norwegia, tetapi kondisi tempat tumbuhnya berbeda. *Seaweed* jurnal [41] tumbuh dan dipanen di lokasi budidaya (buatan/terkontrol), sedangkan *seaweed* jurnal [30] tumbuh dan dipanen di laut (liar/alami). Kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen yang diketahui dapat memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). *Seaweed* yang dibudidayakan umumnya dapat menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di laut (liar). Hal ini disebabkan karena dalam sistem budidaya, kondisi tumbuh *seaweed* yang optimal dapat dipilih dan diterapkan sehingga dapat diperoleh konsentrasi asam glutamat yang optimal. Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa kondisi tumbuh *seaweed* bukan faktor penyebab konsentrasi asam glutamat jurnal [41] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [30].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan waktu panen, dimana *seaweed* jurnal [41] dipanen pada bulan Mei 2014 (akhir musim semi), sedangkan *seaweed* jurnal [30] dipanen pada bulan Oktober 2016 (musim gugur). Waktu panen juga berkaitan kondisi tumbuh *seaweed* dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen yang diketahui dapat memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Kemudian, pengaruh perbedaan tahun panen kemungkinan besar

berkaitan dengan suhu air laut yang mengalami peningkatan setiap tahun akibat pemanasan global. Peningkatan suhu lokasi tumbuh *seaweed* diketahui dapat menyebabkan proses metabolisme, termasuk proses asimilasi nitrat yang berkaitan dengan proses pembentukan asam amino mengalami peningkatan, efeknya konsentrasi asam amino termasuk asam glutamat dalam *seaweed* juga meningkat (Iken, 2012 dalam jurnal [16]; Mohsen, et al., 1973 dalam jurnal [16]). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa jika dilihat dari bulan panen maka hasil yang diperoleh tidak sesuai, tetapi jika dilihat dari tahun panennya maka hasil yang diperoleh sesuai dengan penjelasan mengenai perbedaan tahun panen, artinya konsentrasi asam glutamat jurnal [41] yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [30] juga dapat disebabkan oleh perbedaan tahun panen.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan waktu hidrolisis, dimana hidrolisis pada jurnal [41] dilakukan selama 24 jam, sedangkan hidrolisis pada jurnal [30] dilakukan selama 22 jam. Kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan waktu hidrolisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Kemudian, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis, dimana analisis pada jurnal [41] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [30] dilakukan dengan UPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [41] dengan jurnal [30] pada spesies *Saccharina latissima* adalah pelarut tambahan. Selain itu, tahun panen *seaweed*, waktu hidrolisis, dan/atau metode atau alat analisis juga dapat menjadi faktor penyebab perbedaan hasil antara antara jurnal [41] dengan jurnal [30] jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

### 3) Perbandingan 0.4% Merkaptoetanol dengan 1% fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M

Penambahan pelarut 0.4% merkaptoetanol ke dalam HCl 6N (jurnal [41]: 0.855–0.944 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan pelarut tambahan 1% fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M (jurnal [23]: 0.611–2.998 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut tambahan terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat jurnal [41] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang dikeringkan dengan metode *air drying* pada tiga suhu yang berbeda (25, 40, 70°C), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang dikeringkan dengan metode *freeze drying*, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [23] diperoleh dari *seaweed* yang dikeringkan dengan metode *oven drying*. Lalu, kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [23] terdiri dari empat data yang diperoleh dari *seaweed* yang dipanen pada dua lokasi berbeda dan dua waktu yang berbeda. Jika diasumsikan peneliti pada masing–masing jurnal tersebut melakukan penelitian untuk mencari konsentrasi asam glutamat yang optimal (tertinggi), maka konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari jurnal [41] (0.944 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari jurnal [23] (2.998 g/100g dw *seaweed*).

Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa penggunaan pelarut tambahan 0.4% merkaptoetanol tidak lebih baik dibanding pelarut tambahan 1% fenol & DTDPA dalam NaOH 0.2M ke dalam HCl 6N. Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pelarut tambahan secara umum memang digunakan dengan tujuan untuk memperbaiki atau meningkatkan asam amino hasil hidrolisis dengan menjaga asam amino yang mudah terdegradasi akibat penggunaan pelarut asam dan suhu tinggi selama proses hidrolisis masih berlangsung, tetapi penambahan 0.4% merkaptoetanol ke dalam pelarut utama (katalis) tidak terlalu efektif untuk *seaweed*

yang tinggi akan karbohidrat dan penggunaan 0.4% merkaptotanol umumnya dilakukan khusus untuk menjaga asam amino triptofan dan sistein. Selain pelarut tambahan, perbedaan hasil antara jurnal [41] dan jurnal [23] juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [41], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penyaringan, pengaturan pH menjadi 2.2, dan pengenceran *buffer* sitrat pH 2.2. Pada jurnal [23], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dan pelarutan dengan *buffer* A (natrium sitrat). Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [23]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan setelah hidrolisis merupakan faktor lain yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [41] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [23].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [41] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [23] berasal dari Denmark. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Denmark. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [41] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [23] dilakukan dengan Waters *amino acid analyzer*. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan

metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [41] dengan jurnal [23] pada spesies *Saccharina latissima* adalah pelarut tambahan. Selain itu, metode tambahan setelah hidrolisis, negara asal *seaweed*, dan/atau metode atau alat analisis juga dapat menjadi faktor penyebab perbedaan hasil antara antara jurnal [41] dengan jurnal [23] jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Kemudian, hal yang perlu diketahui adalah pelarut merkaptoetanol bersifat racun jika tertelan, artinya merkaptoetanol bukan pelarut *food grade*. Semua senyawa yang diperoleh dengan menggunakan pelarut tersebut, tidak dapat dikonsumsi meskipun merkaptoetanol sudah dihilangkan dengan pencucian menggunakan air distilasi dan hanya meninggalkan sedikit residu. Oleh karena itu, pelarut ini hanya dapat digunakan untuk penelitian saja, bukan untuk ekstraksi senyawa yang akan dikembangkan menjadi produk pangan tertentu (Wexler, 2014; Rutherford & Sarwar, 2009; jurnal [8]; Wong & Peter, 2001).

### **4.3. Proses Hidrolisis**

#### **4.3.1. Perbandingan Alat Pemanas pada Proses Hidrolisis secara Kimiawi**

Berdasarkan hasil *review* (Tabel 3.3.1.), alat pemanas yang sudah pernah digunakan untuk hidrolisis adalah oven, blok pemanas, *waterbath*, dan *microwave*. Oven (konvensional) atau umumnya disebut oven merupakan alat pemanas yang digunakan dalam metode standar hidrolisis protein dengan pelarut asam (Rostagno & Juliana, 2013; Marconi, 1995; Nollet, 2004). Pada oven, energi panas disalurkan dari lingkungan ke bahan melalui pelat konduktor (konduksi) atau udara (konveksi), namun umumnya oven yang digunakan dalam laboratorium menggunakan prinsip pemanasan secara konveksi (Varzakas & Constantina, 2016). Konveksi merupakan salah satu prinsip pemanasan, dimana energi panas (kalor) dialirkan melalui media perantara (air atau udara) yang partikel penyusunnya ikut berpindah atau bergerak membawa energi panas mendekati objek yang akan dipanaskan (Varzakas & Constantina, 2016; Janna, 2009). Pemilihan



alat pemanas berkaitan dengan pengaturan suhu dan waktu hidrolisis (Lee & Choung, 2011; Marconi, 1995). Pada metode standar, hidrolisis dilakukan di dalam oven pada suhu 110°C selama 18–24 jam atau 20–24 jam, dimana 24 jam merupakan waktu yang paling umum digunakan (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009). Berdasarkan hasil *review*, penggunaan alat pemanas untuk hidrolisis yang berbeda ditemukan pada spesies *Gracilaria corticata* dan *Porphyra umbilicalis* (*rhodophyta* atau *seaweed* merah), *Saccharina latissima* (*phaeophyta* atau *seaweed* coklat), serta *Ulva rigida* (*chlorophyta* atau *seaweed* hijau).

#### a. Perbandingan Blok Pemanas dengan Oven

Blok pemanas (*heating block* atau *dry block heater*) merupakan alat pemanasan yang tersusun dari banyak lubang berbentuk tabung dengan diameter yang beragam dan umumnya terbuat dari pelat aluminium. Pelat tersebut berperan sebagai penghantar panas (konduktor) menuju wadah sampel yang akan hidrolisis (Merck<sup>c</sup>, 2022). Dengan kata lain, prinsip pemanasan yang digunakan dalam blok pemanas adalah konduksi. Konduksi merupakan salah satu prinsip pemanasan, dimana energi panas (kalor) dialirkan melalui media perantara yang memiliki konduktivitas tinggi (konduktor), dimana media perantara tersebut berkontak langsung atau menempel dengan objek yang dipanaskan tetapi partikel dari media perantara tersebut tidak ikut berpindah atau bergerak dengan energi panas (Janna, 2009; Smith et al., 2013). Pada pemanasan secara konduksi, karena partikel media perantara tidak ikut berpindah, maka energi panas (kalor) berpindah dari satu partikel ke partikel lain dengan cara merambat hingga mencapai partikel objek yang dituju (Varzakas & Constantina, 2016; Vaclavik & Elizabeth, 2008). Panas cenderung dapat mengalir atau merambat karena adanya perbedaan suhu antar partikel (Janna, 2009). Hal inilah yang menyebabkan pemanasan secara konduksi disebut pemanasan yang relatif lambat (Vaclavik & Elizabeth, 2008). Perbandingan penggunaan blok pemanas dengan oven untuk hidrolisis dapat ditemukan pada spesies *Porphyra umbilicalis*, *Saccharina latissima*, dan *Ulva rigida*. Berikut penjelasan dari masing-masing spesies.

### 1) *Porphyra umbilicalis*

Pada *Porphyra umbilicalis* hidrolisis (HCl 6N 110°C 24 jam) dengan blok pemanas (jurnal [22]: 2.107–2.591 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan oven (jurnal [53]: 0.289–2.830 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut tambahan terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat jurnal [22] terdiri dari dua data yang diperoleh dari *seaweed* dengan fase hidup yang berbeda yaitu *blades* (yang umum dipanen) dan *conchocelis*. Kemudian, kisaran konsentrasi asam glutamat jurnal [53] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [22] diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* dengan fase hidup yang sama dan tidak melalui proses ekstraksi protein dibandingkan, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [22] (2.107 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (2.830 g/100g dw *seaweed*) dengan selisih yang kecil.

Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pemanasan dengan blok pemanas (konduksi) berjalan relatif lebih lambat dibanding pemanasan dengan oven (konveksi), artinya pada suhu dan waktu yang sama, jumlah energi panas yang dialirkan dari blok pemanas lebih kecil dibanding jumlah energi panas yang dialirkan dari oven. Jika penggunaan oven dijadikan metode standar artinya untuk dapat menghidrolisis hampir seluruh asam amino secara efektif dibutuhkan energi panas sebesar yang dialirkan dari oven. Dengan kata lain, jika jumlah energi panas yang dialirkan kurang dari jumlah standar, maka kemungkinan besar efektifitas proses hidrolisis akan mengalami penurunan, akibatnya konsentrasi asam glutamat

yang diperoleh kurang optimal. Lalu, umumnya pemanasan atau perpindahan panas pada suatu proses tidak hanya terdiri dari satu prinsip saja melainkan melalui kombinasi beberapa prinsip pemanasan (Janna, 2009). Jika diuraikan maka dapat dilihat bahwa proses hidrolisis sampel merupakan gabungan proses pemanasan secara konduksi dan konveksi. Pada hidrolisis dengan blok pemanas (jurnal [22]), proses pemanasan dari sumber panas hingga sampel meliputi konduksi–konduksi–konveksi, sedangkan pada hidrolisis dengan oven (jurnal [53]), proses pemanasan dari sumber panas hingga sampel meliputi konveksi–konduksi–konveksi.

Selain alat pemanas, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [22], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, penetralan dengan *buffer* borat pH 10.2. penambahan norvalin., dan sentrifugasi. Pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan setelah hidrolisis merupakan faktor lain yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [22] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Kemudian, faktor kedua adalah negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [22] berasal dari Portugal, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut

menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Porphyra umbilicalis* yang dipanen di Portugal memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [22] dengan jurnal [53] pada spesies *Porphyra umbilicalis* adalah alat pemanas. Selain itu, metode tambahan setelah hidrolisis dan/atau negara asal *seaweed* juga dapat menjadi faktor penyebab perbedaan hasil antara antara jurnal [22] dengan jurnal [53] jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

## 2) *Saccharina latissima*

Pada *Saccharina latissima*, hidrolisis (HCl 6N 110°C) dengan blok pemanas (jurnal [3]: 0.00012–0.017 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang relatif lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan oven (jurnal [53]: 0.0091–0.758 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut tambahan terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat jurnal [3] terdiri dari 18 data, dimana 12 data diperoleh dari *seaweed* yang melalui enam proses pengawetan yang berbeda (*sun drying*, *oven drying*, *freezing* –20°C, *freezing* –80°C, *ensiling*, *freeze drying*) dan dua proses ekstraksi protein yang berbeda (*pH-shift* klasik, *pH-shift* yang telah dimodifikasi dengan *freeze thaw aided precipitation*.), serta enam data yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Lalu, kisaran konsentrasi asam glutamat jurnal [53] terdiri dari empat data yang melalui proses pengeringan dengan metode *freeze drying*, tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein.

Pertama, jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses pengeringan dengan metode *freeze drying* dan tidak melalui proses ekstraksi protein dibandingkan, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [3] (0.00165 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.758 g/100g dw *seaweed*) dengan selisih yang besar. Kedua, jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses pengeringan dengan metode *freeze drying* dan melalui proses ekstraksi protein dengan metode *pH-shift* dibandingkan, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [3] (0.00298 g/100g dw *seaweed*) juga lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.349 g/100g dw *seaweed*) dengan selisih yang besar. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa pada kondisi yang sama, hidrolisis dengan blok pemanas (jurnal [3]) memang menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang jauh lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang dihidrolisis dengan oven (jurnal [53]).

Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pemanasan dengan blok pemanas (konduksi) berjalan relatif lebih lambat dibanding pemanasan dengan oven (konveksi), artinya pada suhu dan waktu yang sama, jumlah energi panas yang dialirkan dari blok pemanas lebih kecil dibanding jumlah energi panas yang dialirkan dari oven. Jika penggunaan oven dijadikan metode standar artinya untuk dapat menghidrolisis hampir seluruh asam amino secara efektif dibutuhkan energi panas sebesar yang dialirkan dari oven. Dengan kata lain, jika jumlah energi panas yang dialirkan kurang dari jumlah standar, maka kemungkinan besar efektifitas proses hidrolisis akan mengalami penurunan, akibatnya konsentrasi asam glutamat yang diperoleh kurang optimal. Lalu, umumnya pemanasan atau perpindahan panas pada suatu proses tidak hanya terdiri dari satu prinsip saja melainkan melalui kombinasi beberapa prinsip pemanasan (Janna, 2009). Jika diuraikan maka dapat dilihat bahwa proses hidrolisis sampel merupakan gabungan proses pemanasan secara konduksi dan konveksi. Pada hidrolisis dengan blok pemanas (jurnal [3]), proses pemanasan dari sumber panas hingga sampel meliputi konduksi–konduksi–konveksi, sedangkan pada hidrolisis dengan oven (jurnal [53]), proses pemanasan dari sumber panas hingga sampel meliputi konveksi–konduksi–konveksi.

Selain alat pemanas, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [3], tidak ada proses tambahan setelah hidrolisis selesai, sedangkan pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan setelah hidrolisis merupakan faktor lain yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [3] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53]. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [3] dengan jurnal [53] pada spesies *Saccharina latissima* adalah alat pemanas dan metode tambahan setelah hidrolisis.

Selain dibandingkan dengan jurnal [53], hidrolisis (HCl 6N 110°C) dengan blok pemanas (jurnal [3]: 0.00012–0.017 g/100g dw *seaweed*) juga menghasilkan konsentrasi asam glutamat *Saccharina latissima* yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan oven pada jurnal [54] (1.680–3.650 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pemanasan dengan blok pemanas (konduksi) berjalan relatif lebih lambat dibanding pemanasan dengan oven (konveksi), artinya pada suhu dan waktu yang sama, jumlah energi panas yang dialirkan dari blok pemanas lebih kecil dibanding jumlah energi panas yang dialirkan dari oven. Jika penggunaan oven dijadikan metode standar artinya untuk dapat menghidrolisis hampir seluruh asam amino secara efektif dibutuhkan energi panas sebesar yang dialirkan dari oven. Dengan kata lain, jika jumlah energi panas yang dialirkan kurang dari jumlah standar, maka kemungkinan besar efektifitas proses hidrolisis akan mengalami penurunan, akibatnya konsentrasi asam glutamat yang diperoleh kurang optimal.

Namun waktu hidrolisis jurnal [3] (24 jam) diketahui lebih lama dibanding jurnal [54] (23 jam). Meskipun begitu, kedua waktu hidrolisis tersebut termasuk dalam metode standar, artinya ada kemungkinan selisih hasil yang diperoleh relatif kecil atau perbedaannya tidak signifikan, sedangkan selisih hasil antara jurnal [3] dengan jurnal [54] sangat besar.

Selain alat pemanas, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [3], tidak ada proses tambahan setelah hidrolisis selesai, sedangkan pada jurnal [54], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengaturan pH menjadi 2.2. Hasil yang lebih rendah pada jurnal [3] sesuai dengan penjelasan pada sub bab sebelumnya bahwa penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis dapat menjaga hasil hidrolisis pada proses selanjutnya. Namun, metode tambahan pada jurnal [54] dapat dikatakan kurang tepat karena proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis tidak dilakukan segera setelah proses hidrolisis selesai, melainkan langsung melakukan pengaturan pH. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan setelah hidrolisis merupakan faktor lain yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [3] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [54].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [3] berasal dari Swedia, sedangkan *seaweed* jurnal [54] berasal dari Norwegia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Porphyra umbilicalis* yang dipanen di Swedia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Norwegia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [3] dilakukan dengan RP-HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [54] dilakukan dengan

Biochrom B30 *amino acid analyzer*. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [3] dengan jurnal [54] pada spesies *Saccharina latissima* adalah alat pemanas, metode tambahan setelah hidrolisis, negara asal *seaweed*, dan/atau metode atau alat analisis.

### 3) *Ulva rigida*

Pada *Ulva rigida*, hidrolisis (HCl 6N 110°C 24 jam) dengan blok pemanas (jurnal [22]: 0.947 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan oven (jurnal [16]: 1.060–2.260 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa pemanasan dengan blok pemanas (konduksi) berjalan relatif lebih lambat dibanding pemanasan dengan oven (konveksi), artinya pada suhu dan waktu yang sama, jumlah energi panas yang dialirkan dari blok pemanas lebih kecil dibanding jumlah energi panas yang dialirkan dari oven. Jika penggunaan oven dijadikan metode standar artinya untuk dapat menghidrolisis hampir seluruh asam amino secara efektif dibutuhkan energi panas sebesar yang dialirkan dari oven. Dengan kata lain, jika jumlah energi panas yang dialirkan kurang dari jumlah standar, maka kemungkinan besar efektifitas proses hidrolisis akan mengalami penurunan, akibatnya konsentrasi asam glutamat yang diperoleh kurang optimal. Lalu, umumnya pemanasan atau perpindahan panas pada suatu proses tidak hanya terdiri dari satu prinsip saja melainkan melalui kombinasi beberapa prinsip pemanasan (Janna, 2009). Jika diuraikan maka dapat dilihat bahwa proses hidrolisis sampel merupakan gabungan proses pemanasan secara konduksi dan konveksi. Pada hidrolisis dengan blok pemanas (jurnal [22]), proses pemanasan dari sumber panas hingga sampel meliputi konduksi–konduksi–konveksi, sedangkan pada hidrolisis dengan oven (jurnal [16]), proses pemanasan dari sumber panas hingga sampel meliputi konveksi–konduksi–konveksi.



Selain alat pemanas, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [22], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, penetralan dengan *buffer* borat pH 10.2. penambahan norvalin., dan sentrifugasi. Pada jurnal [16], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan gas nitrogen (*vacuum drying*), pelarutan dengan air deionisasi, penambahan *buffer* borat, dan derivatisasi dengan etoksimetilen malonat. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [16]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan setelah hidrolisis merupakan faktor lain yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [22] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [16].

Kemudian, faktor kedua adalah negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [22] berasal dari Portugal, sedangkan *seaweed* jurnal [16] berasal dari Britania Raya (Inggris). Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva rigida* yang dipanen di Portugal memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Britania Raya (Inggris). Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [22] dengan jurnal [16] pada spesies *Ulva rigida* adalah alat pemanas. Selain itu, metode tambahan setelah hidrolisis dan/atau negara asal *seaweed* juga dapat menjadi faktor penyebab perbedaan hasil antara antara jurnal [22] dengan jurnal [16] jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

## b. Perbandingan *Waterbath* dengan Oven

*Waterbath* merupakan salah satu alat pemanas yang umum digunakan dalam laboratorium untuk berbagai tujuan, dimana energi panas disalurkan ke objek yang dituju melalui media perantara berupa air (Memmert, 2022; Merck<sup>d</sup>, 2022). Pada *Gracilaria corticata*, hidrolisis (HCl 6N 24 jam) dengan *waterbath* (jurnal [33]: 0.254 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan oven (jurnal [24]: 0.964 g/100g dw *seaweed*). Hampir sama seperti oven, *waterbath* menggunakan prinsip pemanasan konveksi, tetapi media perantara kedua alat tersebut berbeda, dimana *waterbath* menggunakan air sebagai media perantara sedangkan oven menggunakan udara sebagai media perantara. Meskipun begitu, prinsip serta proses pemanasan kedua alat tersebut sama. Konveksi merupakan salah satu prinsip pemanasan, dimana energi panas (kalor) dialirkan melalui media perantara (air atau udara) yang partikel penyusunya ikut berpindah/bergerak membawa energi panas mendekati objek yang akan dipanaskan (Varzakas & Constantina, 2016; Janna, 2009). Ketika air atau udara dipanaskan, maka partikel penyusunnya akan mengalami perubahan massa jenis. Partikel air atau udara yang menyerap energi panas memiliki massa jenis yang lebih rendah sehingga partikel air atau udara bergerak membawa energi panas menuju objek yang suhunya lebih dingin dibanding air atau udara tersebut. Pada saat yang bersamaan, partikel air atau udara di sekitar objek yang lebih dingin (massa jenisnya normal) tergeser oleh partikel air atau udara yang membawa energi panas menuju sumber panas dan mengalami pemanasan. Partikel air atau udara yang sudah melepaskan energi panas ke objek yang dituju akan tergeser dengan partikel air atau udara yang membawa energi panas, menuju ke sumber panas untuk menerima lagi energi panas dan siklus tersebut terus berulang (Janna, 2009; Smith et al., 2013; Vaclavik & Elizabeth, 2008).

Meskipun prinsip dan proses pemanasannya sama, tetapi kedua alat pemanas tersebut tetap berbeda. Perbedaan kedua alat pemanas tersebut adalah suhu hidrolisis yang digunakan. Pada jurnal [24], hidrolisis dengan oven dilakukan pada suhu standar yaitu 110°C, sedangkan pada jurnal [33], hidrolisis dengan *waterbath* dilakukan pada suhu 100°C. Berbeda dengan oven, suhu *waterbath* hanya dapat diatur hingga 100°C yaitu

titik didih dari air (Mimmert, 2022; Merck<sup>d</sup>, 2022). Suhu 110°C adalah suhu standar, dimana HCl 6N yang dihidrolisis pada suhu tersebut selama waktu standar diketahui mampu menghidrolisis hampir semua asam amino secara efektif. Berdasarkan beberapa penelitian mengenai modifikasi suhu dan waktu hidrolisis, hasil hidrolisis yang optimal (sebaik menggunakan 110°C 24 jam) diperoleh dari kombinasi peningkatan suhu dan pengurangan waktu, bukan dari pengurangan suhu dan peningkatan atau penurunan waktu (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Toldra & Leo, 2021; Nollet, 2004). Pada proses hidrolisis, suhu memang harus cukup tinggi agar asam amino dapat terurai dengan baik, tetapi juga tidak boleh terlalu tinggi agar tidak terjadi degradasi/kerusakan pada senyawa asam amino yang diinginkan, sedangkan waktu hidrolisis yang cukup lama memang dibutuhkan untuk mengurai sebagian besar komponen asam amino, tetapi waktu yang terlalu lama juga menyebabkan degradasi/kerusakan pada senyawa asam amino yang telah terhidrolisis serta butuh energi dan biaya yang besar (Tzia & George, 2003). Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa penggunaan suhu yang lebih kecil (*waterbath*) dibanding suhu standar tanpa menambah waktu hidrolisis kemungkinan besar menyebabkan efektifitas proses hidrolisis menurun, akibatnya konsentrasi asam glutamat yang diperoleh kurang optimal.

Selain alat pemanas, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan proses ekstraksi protein. Pada jurnal [24], *seaweed* tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan pada jurnal [33], *seaweed* melalui proses ekstraksi protein dengan metode presipitasi menggunakan 10% TCA dan setelah hidrolisis dilakukan pemisahan asam amino dari senyawa lain dengan metode sentrifugasi dan penyaringan. Seharusnya, hasil yang diperoleh jurnal [33] lebih tinggi dibanding jurnal [24], tetapi hasil yang diperoleh bertentangan. Hal ini disebabkan karena proses pemecahan sel tidak dilakukan terlebih dahulu pada jurnal [33]. *Seaweed* merupakan bahan pangan nabati yang secara umum memiliki ikatan kimia yang sangat kompleks (Speinght, 2018). Ikatan kompleks tersebut dapat ditemukan pada dinding sel *seaweed* yang tersusun dari berbagai jenis polisakarida (Walsh, 2002; Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2013). Secara umum polisakarida yang mendominasi *seaweed* merah

(*rhodophyta*) adalah agar atau karagenan (El-Sheekh and Abd El-Fatah, 2021). Pada genus *Gracilaria*, agar merupakan polisakarida utama yang menyusun dinding sel. Struktur dinding sel yang kompleks pada *seaweed* memiliki beberapa fungsi, salah satunya adalah untuk bertahan dalam kondisi salinitas, pH, dan suhu yang ekstrem (Lee et al., 2017). Hal inilah yang menyebabkan proses ekstraksi protein dan asam amino dari dalam sel menjadi sulit. Salah satu cara yang umum dilakukan ketika ingin mengekstraksi protein untuk diambil asam glutamatnya adalah dengan merusak ikatan dalam dinding sel *seaweed* (*cell disruption*) dan memisahkannya dari senyawa yang akan hidrolisis (Bonner, 2019).

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [33], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu sentrifugasi, penyaringan, penetralan dengan NaOH 0.1N, dan pengenceran air deionisasi, sedangkan pada jurnal [24] tidak ada proses tambahan setelah hidrolisis selesai. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis dapat menjaga hasil hidrolisis pada proses selanjutnya, tetapi hasil yang diperoleh bertentangan. Hal ini disebabkan karena metode tambahan pada jurnal [33] dapat dikatakan kurang tepat karena proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis atau proses penetralan tidak dilakukan segera setelah proses hidrolisis selesai, melainkan langsung melakukan pemisahan senyawa berdasarkan ukuran molekulnya. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [33] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [24]. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [33] berasal dari India, sedangkan *seaweed* jurnal [24] berasal dari Iran. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Gracilaria corticata* yang dipanen di India memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Iran.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [33] dilakukan dengan RP-HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [24] dilakukan dengan HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [33] dengan jurnal [24] pada spesies *Gracilaria corticata* adalah alat pemanas dan proses ekstraksi protein jurnal [33] kurang tepat. Selain itu, negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis juga dapat menjadi faktor penyebab perbedaan hasil antara antara jurnal [33] dengan jurnal [24] jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

### c. Perbandingan *Microwave* dengan Oven dan Blok Pemanas

*Microwave* merupakan alat pemanas selain oven, blok pemanas, dan *waterbath*, yang menggunakan energi gelombang mikro ( $f:2450\text{MHz}$ ;  $\lambda:12.2\text{cm}$ ; energi: $0.94\text{J/mol}$ ) untuk hidrolisis protein dengan pelarut asam (Lee & Choung, 2011; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Rostagno & Juliana, 2013). Mekanisme pemanasan oleh *microwave* dan oven sangat berbeda (Hui, 2006). Pada oven, energi panas disalurkan dari lingkungan ke bahan melalui udara (konveksi), sedangkan pada *microwave*, energi panas dapat terbentuk dengan cepat dari dalam bahan karena efek dari paparan gelombang mikro (Varzakas & Constantina, 2016; Lee & Choung, 2011). Pada suhu yang sama yang diterapkan pada oven, penggunaan *microwave* dapat mempercepat perpindahan massa senyawa target dari sampel hingga menyebabkan waktu hidrolisis berkurang drastis dari satu hari atau lebih (oven) menjadi hanya beberapa jam hingga beberapa menit saja (Lee & Choung, 2011; Rutherford & Sarwar, 2009).

Penyerapan gelombang mikro pada bahan tergantung dari senyawa kimia yang ada dalam bahan tersebut dan senyawa kimia yang berbeda menyerap gelombang mikro pada tingkat yang berbeda (Rostagno & Juliana, 2013). Bahan yang mengandung senyawa polar seperti air, dapat menyerap gelombang mikro dengan kuat karena memiliki konstanta dielektrik yang tinggi ( $K_d$  air 80.1) (Rostagno & Juliana, 2013).

Meskipun begitu, penggunaan pelarut dengan konstanta dielektrik yang rendah seperti HCl (Kd HCl 4.6), memungkinkan pemanasan hanya terjadi di dalam bahan, sedangkan diluar bahan (pelarut) tidak terjadi pemanasan sehingga senyawa target tidak mengalami pemanasan yang berlebihan (Rostagno & Juliana, 2013). Oleh karena itu, penggunaan *microwave* sebagai alat pemanas dalam proses hidrolisis merupakan salah satu cara untuk mengurangi waktu hidrolisis dari satu hari menjadi hanya beberapa jam bahkan dapat kurang dari satu jam, dan sekaligus mencegah degradasi atau kerusakan senyawa target selama hidrolisis berlangsung (Rutherford & Sarwar, 2009; Rostagno & Juliana, 2013). Berdasarkan hasil *review*, hidrolisis dengan *microwave* sudah pernah digunakan dalam proses hidrolisis *Saccharina latissima* dan konsentrasi asam glutamatnya dapat dibandingkan dengan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis oven (jurnal [53] dan [54]) serta blok pemanas. Berikut penjelasan dari masing-masing perbandingan.

### **1) Perbandingan dengan Oven (Jurnal [53])**

Perbandingan antara konsentrasi asam glutamat *Saccharina latissima* yang diperoleh dari hidrolisis dengan *microwave* dan oven (jurnal [53]), menunjukkan hasil yang cukup beragam. Hidrolisis (HCl 6N 110°C) dengan *microwave* diketahui menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi serta cenderung lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan oven. Berikut penjelasan masing-masing hasil hidrolisis dengan *microwave* dan oven (jurnal [53]).

#### **a) Hasil Hidrolisis Lebih Tinggi**

Hidrolisis dengan *microwave* (1 jam) (jurnal [43]: 1.001–2.495 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang cenderung lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan oven (24 jam) (jurnal [53]: 0.0091–0.758 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai teori yang menyatakan bahwa selain mengurangi waktu hidrolisis secara drastis, penggunaan *microwave* untuk hidrolisis dapat mengoptimalkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Hal ini disebabkan karena pemanasan hanya terjadi pada molekul air (Kd air 80.1) baik di dalam atau di luar bahan,

sedangkan pada pelarut HCl 6N (Kd HCl 4.6) tidak terjadi pemanasan, sehingga senyawa target yang telah terhidrolisis tidak mengalami pemanasan yang berlebihan selama proses hidrolisis masih berlangsung.

Selain alat pemanas, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan proses ekstraksi protein. Pada jurnal [43], seaweed tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan pada jurnal [53], konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [43] (1.001–2.495 g/100g dw *seaweed*) tetap lebih tinggi dibanding bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.758 g/100g dw *seaweed*). Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa penggunaan proses ekstraksi protein bukan faktor yang dapat menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [43] dengan jurnal [53], karena pada kondisi yang sama, konsentrasi asam glutamat jurnal [43] tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [43], metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu Penambahan EZ:faast *amino acid analysis kit*, sedangkan pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAC 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Namun, hasil yang

diperoleh bertentangan, artinya metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [43] lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [43] berasal dari Kepulauan Faroe (wilayah dependensi Denmark), sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Kepulauan Faroe (wilayah dependensi Denmark), memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia.

Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [43] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [53] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [43] dengan jurnal [53] pada spesies *Saccharina latissima* adalah alat pemanas. Selain itu, negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis juga dapat menjadi faktor penyebab perbedaan hasil antara antara jurnal [43] dengan jurnal [53] jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.



### b) Hasil Hidrolisis Cenderung Lebih Tinggi

Hidrolisis (HCl 6N 110°C) dengan *microwave* (1 jam) (jurnal [15]: 0.470–1.265 g/100g dw *seaweed*; jurnal [62]: 0.240–3.313 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang cenderung lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan oven (24 jam) (jurnal [53]: 0.0091–0.758 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat dari ketiga jurnal tersebut berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat ketiga jurnal tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [15] terdiri dari 13 data yang diperoleh dari *seaweed* yang dipanen di dua lokasi, dua kedalaman, dan tujuh waktu panen yang berbeda, serta tidak melalui proses ekstraksi protein. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [62] terdiri dari 13 data yang diperoleh dari *seaweed* yang dipanen di dua lokasi dan tujuh waktu panen, serta tidak melalui proses ekstraksi protein. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [53] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein.

Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [15] (1.001–2.495 g/100g dw *seaweed*) lebih tinggi dibanding bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.758 g/100g dw *seaweed*), tetapi konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.758 g/100g dw *seaweed*) diketahui masih berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat jurnal [62] (0.240–3.313 g/100g dw *seaweed*). Jika diasumsikan peneliti pada jurnal [53] dan jurnal [62] melakukan penelitian untuk mencari konsentrasi asam glutamat yang optimal (tertinggi), maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [62] (3.313 g/100g dw *seaweed*) lebih tinggi dibanding bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.758 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai teori yang

menyatakan bahwa selain mengurangi waktu hidrolisis secara drastis, penggunaan *microwave* untuk hidrolisis dapat mengoptimalkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Hal ini disebabkan karena pemanasan hanya terjadi pada molekul air (Kd air 80.1) baik di dalam atau di luar bahan, sedangkan pada pelarut HCl 6N (Kd HCl 4.6) tidak terjadi pemanasan, sehingga senyawa target yang telah terhidrolisis tidak mengalami pemanasan yang berlebihan selama proses hidrolisis masih berlangsung.

Selain alat pemanas, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [15] dan [62], metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu Penambahan EZ:faast *amino acid analysis kit*, sedangkan pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Namun, hasil yang diperoleh bertentangan, artinya metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [15] dan [62] lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [15] berasal dari Kepulauan Faroe (wilayah dependensi Denmark) dan *seaweed* jurnal [62] berasal dari Denmark, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed*

(O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Kepulauan Faroe (wilayah dependensi Denmark) atau Denmark, memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia.

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. Dimana analisis pada jurnal [15] dan [62] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [53] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [15] dan [62] dengan jurnal [53] pada spesies *Saccharina latissima* adalah alat pemanas. Selain itu, negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis juga dapat menjadi faktor penyebab perbedaan hasil antara antara jurnal [15] dan [62] dengan jurnal [53] jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

## **2) Perbandingan dengan Oven (Jurnal [54])**

Perbandingan antara konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan *microwave* dan oven (jurnal [54]), menunjukkan hasil yang cukup beragam. Hidrolisis (HCl 6N 110°C) dengan *microwave* diketahui menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi serta cenderung lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan oven. Berikut penjelasan masing-masing hasil hidrolisis dengan *microwave* dan oven (jurnal [54]).

### **a) Hasil Hidrolisis Lebih Rendah**

Hidrolisis dengan *microwave* (1 jam) (jurnal [15]: 0.470–1.265 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis oven (23 jam) (jurnal [54]: 1.680–3.650 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut tidak sesuai teori yang

menyatakan bahwa selain mengurangi waktu hidrolisis secara drastis, penggunaan *microwave* untuk hidrolisis dapat mengoptimalkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Hasil tersebut dapat diperoleh karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang pengaruhnya lebih besar dibanding perbedaan alat pemanas. Faktor pertama adalah perbedaan metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [15], metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penambahan EZ:faast *amino acid analysis kit*, sedangkan pada jurnal [54], metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengaturan pH menjadi 2.2. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa tidak ada yang melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai maupun proses pemisahan senyawa berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang lebih sama. Hal ini menunjukkan bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [15] dengan jurnal [54].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [15] berasal dari Kepulauan Faroe (wilayah dependensi Denmark), sedangkan *seaweed* jurnal [54] berasal dari Norwegia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Kepulauan Faroe (wilayah dependensi Denmark) memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Norwegia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [15] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [54] dilakukan dengan Biochrom B30 *amino acid analyzer*. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap

konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [15] dengan jurnal [54] pada spesies *Saccharina latissima* bukan alat pemanas, melainkan negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis.

#### **b) Hasil Hidrolisis Cenderung Lebih Rendah**

Hidrolisis dengan *microwave* (1 jam) (jurnal [43]: 1.001–2.495 g/100g dw *seaweed*; jurnal [62]: 0.240–3.313 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang cenderung lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan oven (23 jam) (jurnal [54]: 1.680–3.650 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat dari ketiga jurnal tersebut berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat ketiga jurnal tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [43] terdiri dari 11 data yang diperoleh dari *seaweed* yang dipanen di tiga lokasi dan empat waktu panen. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [62] terdiri dari 13 data yang diperoleh dari *seaweed* yang dipanen di dua lokasi dan tujuh waktu panen. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [54] terdiri dari 6 data yang diperoleh dari *seaweed* yang dipanen di dua kedalaman dan tiga waktu panen. Jika diasumsikan peneliti pada ketiga jurnal melakukan penelitian untuk mencari konsentrasi asam glutamat yang optimal (tertinggi), maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [43] (2.495 g/100g dw *seaweed*) dan jurnal [62] (3.313 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [54] (3.650 g/100g dw *seaweed*).

Hasil tersebut tidak sesuai teori yang menyatakan bahwa selain mengurangi waktu hidrolisis secara drastis, penggunaan *microwave* untuk hidrolisis dapat mengoptimalkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Hasil tersebut dapat diperoleh karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang pengaruhnya lebih besar dibanding perbedaan alat

pemanas. Faktor pertama adalah perbedaan metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [43] dan [62], metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penambahan EZ:faast *amino acid analysis kit*, sedangkan pada jurnal [54], metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengaturan pH menjadi 2.2. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa tidak ada yang melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai maupun proses pemisahan senyawa berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang lebih sama. Hal ini menunjukkan bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [43] dan [62] dengan jurnal [54].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [43] berasal dari Kepulauan Faroe (wilayah dependensi Denmark) dan *seaweed* jurnal [62] berasal dari Denmark, sedangkan *seaweed* jurnal [54] berasal dari Norwegia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Kepulauan Faroe (wilayah dependensi Denmark) atau Denmark memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Norwegia. Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [43] dan [62] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [54] dilakukan dengan Biochrom B30 *amino acid analyzer*. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [43] dan [62] dengan jurnal [54] pada spesies *Saccharina latissima* bukan alat pemanas, melainkan negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis.

### 3) Perbandingan dengan Blok Pemanas

Selain perbandingan *microwave* dengan oven, hidrolisis dengan *microwave* (1 jam) (jurnal [15]: 0.470–1.265 g/100g dw *seaweed*; jurnal [43]: 1.001–2.495 g/100g dw *seaweed*; jurnal [62]: 0.240–3.313 g/100g dw *seaweed*) diketahui juga menghasilkan konsentrasi asam glutamat *Saccharina latissima* yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis dengan blok pemanas (jurnal [3]: 0.00012–0.017 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai teori yang menyatakan bahwa selain mengurangi waktu hidrolisis secara drastis, penggunaan *microwave* untuk hidrolisis dapat mengoptimalkan konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Hal ini disebabkan karena pemanasan hanya terjadi pada molekul air (Kd air 80.1) baik di dalam atau di luar bahan, sedangkan pada pelarut HCl 6N (Kd HCl 4.6) tidak terjadi pemanasan, sehingga senyawa target yang telah terhidrolisis tidak mengalami pemanasan yang berlebihan selama proses hidrolisis masih berlangsung. Selain itu, blok pemanas menggunakan prinsip pemanasan konduksi dimana hanya energi panas yang bergerak melewati partikel-partikel sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama dibanding dua prinsip pemanasan lain dan waktu hidrolisis yang lebih lama tidak terlalu diharapkan karena kontak senyawa dengan pelarut asam yang lebih lama beresiko menyebabkan degradasi atau kerusakan senyawa yang telah terhidrolisis serta biaya operasional akan meningkat.

Selain alat pemanas, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan metode pengawetan dan penggunaan metode ekstraksi protein. Pada ketiga jurnal tersebut, konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses pengeringan *oven drying* (jurnal [15]) atau *freeze drying* (jurnal [43] dan [62]), serta tidak melalui proses ekstraksi protein. Pada jurnal [3], konsentrasi asam glutamat terdiri dari 18 data, dimana 12 data diperoleh dari *seaweed* yang melalui enam proses pengawetan yang berbeda (*sun drying*, *oven drying*, *freezing*  $-20^{\circ}\text{C}$ , *freezing*  $-80^{\circ}\text{C}$ , *ensiling*, *freeze drying*) dan dua proses ekstraksi protein yang berbeda (*pH-shift* klasik, *pH-shift* yang telah dimodifikasi dengan *freeze thaw aided precipitation*.), serta enam data yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui

proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses pengeringan yang sama serta tidak melalui proses ekstraksi protein, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [15] (0.470–1.265 g/100g dw *seaweed*) tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [3] (0.00149 g/100g dw *seaweed*), dan konsentrasi asam glutamat jurnal [43] (1.001–2.495 g/100g dw *seaweed*) dan jurnal [62] (0.240–3.313 g/100g dw *seaweed*) juga tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [3] (0.00165 g/100g dw *seaweed*). Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa perbedaan metode pengawetan dan penggunaan metode ekstraksi protein bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [15], jurnal [43], dan jurnal [62] dengan jurnal [3].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [15], jurnal [43], dan jurnal [62], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu penambahan EZ:faast *amino acid analysis kit*, sedangkan pada jurnal [3] tidak ada proses tambahan setelah hidrolisis selesai. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis dapat menjaga hasil hidrolisis pada proses selanjutnya, tetapi hasil yang diperoleh bertentangan. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan setelah hidrolisis merupakan faktor lain yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [15], jurnal [43], dan jurnal [62] lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [3]. Selanjutnya faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [15] dan [43] berasal dari Kepulauan Faroe (wilayah dependensi Denmark) dan *seaweed* jurnal [62] berasal dari Denmark, sedangkan *seaweed* jurnal [3] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Kepulauan Faroe (wilayah dependensi Denmark) atau Denmark memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia.



Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [15], [43], dan [62] dilakukan dengan HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [3] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [15], [43], dan [62] pada spesies *Saccharina latissima* adalah alat pemanas, metode tambahan setelah hidrolisis, negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis.

#### **4.3.2. Perbandingan Suhu pada Proses Hidrolisis secara Kimiawi**

Pengaturan suhu memiliki pengaruh yang signifikan pada suatu proses atau reaksi kimia karena dapat mengubah sifat senyawa target dan pelarut, memengaruhi kelarutan dan difusivitas senyawa target, termasuk memberikan energi untuk mengganggu interaksi antar molekul (Rostagno & Juliana, 2013). Pada proses hidrolisis, penggunaan suhu tinggi diketahui cenderung lebih efektif dibandingkan suhu rendah atau suhu ruang (Rutherford & Sarwar, 2009). Selain itu, suhu memang harus cukup tinggi agar asam amino dapat terurai dengan baik, tetapi juga tidak boleh terlalu tinggi agar tidak terjadi degradasi atau kerusakan pada senyawa asam amino yang diinginkan (Tzia & George, 2003). Dalam metode hidrolisis standar, suhu yang digunakan adalah 110°C (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Toldra & Leo, 2021). Kemudian, berdasarkan beberapa penelitian mengenai modifikasi suhu dan waktu hidrolisis, hasil hidrolisis yang optimal (sebaik menggunakan suhu 110°C dan waktu 24 jam) diperoleh dari kombinasi peningkatan suhu dan pengurangan waktu, bukan dari pengurangan suhu dan peningkatan atau penurunan waktu (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Toldra & Leo, 2021; Nollet, 2004).

Berdasarkan hasil *review* (Tabel 3.3.2.), penggunaan suhu hidrolisis yang berbeda ditemukan pada spesies *Ulva lactuca* (*seaweed* hijau atau *chlorophyta*). Hidrolisis (HCl panas oven 24 jam) pada suhu 108°C (jurnal [60]: 0.756 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding hidrolisis pada

suhu 110°C (jurnal [35]: 1.476 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa hasil hidrolisis yang optimal (sebaik menggunakan suhu 110°C dan waktu 24 jam) diperoleh dari kombinasi peningkatan suhu dan pengurangan waktu, bukan dari pengurangan suhu dan peningkatan atau penurunan waktu. Selain itu, 110°C dan 24 jam merupakan suhu dan waktu standar hidrolisis, artinya pada suhu dan waktu tersebut, hampir semua asam amino dapat terhidrolisis secara efektif. Penurunan suhu hidrolisis pada kondisi waktu hidrolisis yang sama, dapat menyebabkan efektifitas proses hidrolisis menurun, akibatnya konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tidak optimal.

Selain suhu hidrolisis, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah perbedaan pelarut tambahan. Pada sub bab sebelumnya sudah diketahui bahwa pelarut tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [60] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [35], karena tidak sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa penambahan fenol hingga 1% diketahui efektif untuk melindungi hampir semua asam amino kecuali triptofan dan sistein, serta belum ada sumber yang menyatakan bahwa penambahan lebih dari 1% dapat menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi. Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada sub bab sebelumnya sudah diketahui bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [60] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [35], karena kombinasi metode tambahan kedua jurnal tersebut mirip, yaitu dilakukan proses pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis dengan proses evaporasi segera setelah hidrolisis. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal.

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [60] berasal dari Korea Selatan, sedangkan *seaweed* jurnal [35] berasal dari Afrika Selatan. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan

panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Korea Selatan memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Afrika Selatan. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [60] dilakukan dengan RP-HPLC, sedangkan analisis pada jurnal [35] dilakukan dengan IEC (CEC). Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [60] dengan jurnal [35] pada spesies *Ulva lactuca* adalah suhu hidrolisis, negara asal *seaweed*, dan/atau metode atau alat analisis.

#### **4.3.3. Perbandingan Waktu pada Proses Hidrolisis secara Kimiawi**

Pengaturan waktu hidrolisis berkaitan langsung dengan suhu hidrolisis, dimana waktu tidak hanya berpengaruh pada efektifitas tetapi juga efisiensi proses hidrolisis (Rostagno & Juliana, 2013). Waktu yang digunakan dalam metode standar hidrolisis protein menjadi komponen asam amino (HCl 6N; 110°C) adalah 18–24 jam, dimana 24 jam merupakan waktu yang paling umum digunakan (FAO/WHO, 1991; Ozols, 1990; Darragh & Moughan 2005 dalam Rutherford & Sarwar, 2009). Meskipun begitu, beberapa sumber juga menyebutkan bahwa waktu yang paling umum digunakan untuk hidrolisis dimulai dari 20 jam (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Toldra & Leo, 2021). Selain itu, sumber lain menyebutkan bahwa *acid hydrolysis* juga dilakukan dalam kurun waktu lebih dari 24 jam bahkan hingga 96 jam (Nollet, 2004). Hal ini disebabkan karena beberapa ikatan asam amino seperti isoleusin, valin, leusin, dan fenilalanin bersifat hidrofobik sehingga sangat sulit untuk diurai. Oleh karena itu hidrolisis lengkap asam amino membutuhkan waktu yang relatif lama (24 jam) bahkan bisa lebih lama dari 24 jam (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Nollet, 2004).

Penggunaan suhu tinggi sekaligus waktu proses yang lama memang dapat menghidrolisis asam amino yang sulit diurai, tetapi di sisi lain, asam amino yang sensitif dengan suhu tinggi sekaligus waktu proses yang lama dapat terdegradasi dan kehilangan fungsinya (Nollet, 2004; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa kemungkinan besar 24 jam merupakan waktu hidrolisis dengan HCl 6N pada suhu 110°C menggunakan oven atau blok pemanas yang paling umum digunakan karena dianggap paling efektif, artinya sebagian besar asam amino sudah terhidrolisis dengan baik dalam kurun waktu tersebut. Pada suhu yang sama, waktu yang lebih pendek kemungkinan dapat menyebabkan proses hidrolisis yang kurang optimal dan waktu yang lebih panjang kemungkinan dapat menyebabkan degradasi atau kerusakan asam amino yang telah terhidrolisis. Akibatnya konsentrasi asam glutamat yang diperoleh menjadi tidak optimal. Berdasarkan hasil *review* (Tabel 3.3.3.), waktu yang sudah pernah digunakan untuk hidrolisis (HCl 6N 110°C) dan dapat dibandingkan yaitu 24 jam, 23 jam, dan 22 jam. Berikut penjelasan masing-masing waktu hidrolisis.

#### **a. Perbandingan 23 Jam dengan 24 Jam**

Perbandingan waktu hidrolisis selama 23 jam dan 24 jam dapat ditemukan pada spesies *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, dan *Saccharina latissima* (*phaeophyta* atau *seaweed* coklat). Berikut penjelasan dari masing-masing spesies.

##### **1) *Ascophyllum nodosum***

Pada *Ascophyllum nodosum*, hidrolisis (HCl 6N pada suhu 110°C) selama 23 jam (jurnal [1]: 0.290–1.649 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis selama 24 jam (jurnal [19]: 1.715 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai dengan teori dan penjelasan sebelumnya yang menyatakan bahwa waktu yang digunakan dalam metode standar hidrolisis protein menjadi komponen asam amino (HCl 6N; 110°C) adalah 20–24 jam. Namun, 24 jam merupakan waktu yang paling umum digunakan, artinya 24 jam adalah waktu paling efektif atau optimal untuk menghidrolisis sebagian besar asam amino. Dengan kata lain, penggunaan pelarut dan suhu yang sama, waktu yang lebih pendek kemungkinan dapat

menyebabkan proses hidrolisis menjadi kurang efektif sehingga kandungan asam glutamat yang diperoleh menjadi tidak optimal.

Selain waktu hidrolisis, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah penggunaan proses ekstraksi protein. Konsentrasi asam glutamat jurnal [19] diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [1] diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu *acid extraction*, *alkali extraction*, atau *acid-alkali extraction* sebelum proses hidrolisis. Di antara ketiga data tersebut, konsentrasi asam glutamat tertinggi diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein dengan metode *alkali extraction* (1.649 g/100g dw *seaweed*) dan hasil pembahasan jurnal [1] menunjukkan bahwa perbedaan metode ekstraksi protein sangat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh pada jurnal tersebut. Jika diasumsikan peneliti pada masing-masing jurnal tersebut melakukan penelitian untuk mencari konsentrasi asam glutamat yang optimal (tertinggi), maka konsentrasi asam glutamat jurnal [1] (1.649 g/100g dw *seaweed*) diketahui tetap lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [19] (1.715 g/100g dw *seaweed*) dengan selisih yang kecil.

Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa meskipun 24 jam adalah waktu yang paling umum digunakan karena efektif untuk menghidrolisis hampir semua asam amino, tetapi waktu yang dicantumkan dalam metode standar cukup beragam yaitu 18–24 jam. Berdasarkan hasil perbandingan dan pernyataan tersebut menunjukkan bahwa waktu yang lebih rendah dari 24 jam memang dapat mengurangi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tetapi selama waktu yang digunakan termasuk dalam waktu standar maka dapat dikatakan perbedaan hasil yang diperoleh tidak signifikan atau perbedaan waktu tidak terlalu memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Perbedaan hasil yang diperoleh tidak signifikan dapat diketahui dengan melihat selisih antar konsentrasi asam glutamat yang kecil.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [1], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa presipitasi dengan 24% TCA, sentrifugasi, pengenceran dengan *buffer* natrium sitrat 0.2N pH 2.2, pengenceran dengan norleusin, dan derivatisasi dengan ninhidrin. Lalu, pada jurnal [19], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan berukuran 0.45 $\mu$ m, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa kombinasi metode tambahan kedua jurnal sama-sama dimulai dengan pemisahan senyawa target dari senyawa lain, bukan pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [1] dengan jurnal [19].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [1] berasal dari Irlandia, sedangkan *seaweed* jurnal [19] berasal dari Spanyol. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ascophyllum nodosum* yang dipanen di Irlandia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Spanyol. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [1] dilakukan dengan Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer*, sedangkan analisis pada jurnal [19] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat

analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [1] dengan jurnal [19] pada spesies *Ascophyllum nodosum* adalah waktu hidrolisis. Selain itu, negara asal *seaweed* dan/atau metode atau alat analisis juga dapat menjadi faktor penyebab perbedaan hasil antara antara jurnal [1] dengan jurnal [19] jika masing-masing faktor memiliki pengaruh yang kecil terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

## 2) *Fucus vesiculosus*

Pada *Fucus vesiculosus*, hidrolisis (HCl 6N pada suhu 110°C) selama 23 jam (jurnal [44]: 0.032–0.757 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis selama 24 jam (jurnal [19]: 1.974 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai dengan teori dan penjelasan sebelumnya yang menyatakan bahwa waktu yang digunakan dalam metode standar hidrolisis protein menjadi komponen asam amino (HCl 6N; 110°C) adalah 20–24 jam. Namun, 24 jam merupakan waktu yang paling umum digunakan, artinya 24 jam adalah waktu paling efektif atau optimal untuk menghidrolisis sebagian besar asam amino. Dengan kata lain, pada penggunaan pelarut dan suhu yang sama, waktu yang lebih pendek kemungkinan dapat menyebabkan proses hidrolisis menjadi kurang efektif sehingga kandungan asam glutamat yang diperoleh menjadi tidak optimal.

Selain waktu hidrolisis, perbedaan hasil juga dapat disebabkan oleh faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis. Faktor pertama adalah penggunaan proses ekstraksi protein. Konsentrasi asam glutamat jurnal [19] diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [44] terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda yaitu dengan metode tradisional (*osmotic shock*, ultrasonikasi, presipitasi), metode HPP (*high pressure processing*), metode *autoclave pre-treatment*, serta satu data yang diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka

konsentrasi konsentrasi asam glutamat jurnal [44] (0.757 g/100g dw *seaweed*) diketahui tetap lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [19] (1.974 g/100g dw *seaweed*) dengan selisih yang relatif relatif besar.

Hasil tersebut tidak sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa meskipun 24 jam adalah waktu yang paling umum digunakan karena efektif untuk menghidrolisis hampir semua asam amino, tetapi waktu yang dicantumkan dalam metode standar cukup beragam yaitu 18–24 jam. Berdasarkan hasil perbandingan dan pernyataan tersebut menunjukkan bahwa waktu yang lebih rendah dari 24 jam memang dapat mengurangi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh tetapi selama waktu yang digunakan termasuk dalam waktu standar maka dapat dikatakan perbedaan hasil yang diperoleh tidak signifikan atau perbedaan waktu tidak terlalu memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Perbedaan hasil yang diperoleh tidak signifikan dapat diketahui dengan melihat selisih antar konsentrasi asam glutamat yang kecil. Hasil dengan selisih yang relatif besar menunjukkan bahwa terdapat faktor selain waktu hidrolisis yang memengaruhi konsentrasi asam glutamat.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [44], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa presipitasi dengan 24% TCA, sentrifugasi, pengenceran dengan *buffer* natrium sitrat 0.2N pH 2.2, dan pengenceran dengan norleusin. Lalu, pada jurnal [19], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan berukuran 0.45 $\mu$ m, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa kombinasi metode tambahan kedua jurnal sama-sama dimulai dengan pemisahan senyawa target dari senyawa lain, bukan pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dengan demikian, dapat diketahui bahwa metode tambahan setelah



hidrolisis bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [44] dengan jurnal [19].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [44] berasal dari Irlandia, sedangkan *seaweed* jurnal [19] berasal dari Spanyol. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Fucus vesiculosus* yang dipanen di Irlandia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Spanyol. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [44] dilakukan dengan Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer*, sedangkan analisis pada jurnal [19] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [44] dengan jurnal [19] pada spesies *Fucus vesiculosus* adalah waktu hidrolisis, negara asal *seaweed*, dan/atau metode atau alat analisis.

### 3) *Saccharina latissima*

Pada *Saccharina latissima*, hidrolisis (HCl 6N pada suhu 110°C) selama 23 jam (jurnal [54]: 1.680–3.650 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis selama 24 jam (jurnal [53]: 0.0091–0.758 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut tidak sesuai dengan teori dan penjelasan sebelumnya yang menyatakan bahwa waktu yang digunakan dalam metode standar hidrolisis protein menjadi komponen asam amino (HCl 6N; 110°C) adalah 20–24 jam. Namun, 24 jam merupakan waktu yang paling umum digunakan, artinya 24 jam adalah waktu

paling efektif atau optimal untuk menghidrolisis sebagian besar asam amino. Dengan kata lain, pada penggunaan pelarut dan suhu yang sama, waktu yang lebih pendek kemungkinan dapat menyebabkan proses hidrolisis menjadi kurang efektif sehingga kandungan asam glutamat yang diperoleh menjadi tidak optimal. Hasil yang lebih tinggi dapat disebabkan karena terdapat faktor lain baik di dalam atau di luar proses ekstraksi dan analisis yang lebih memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Faktor pertama adalah penggunaan proses ekstraksi protein. Konsentrasi asam glutamat jurnal [54] diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [53] konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka konsentrasi konsentrasi asam glutamat jurnal [54] (1.680–3.650 g/100g dw *seaweed*) diketahui tetap lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.758 g/100g dw *seaweed*) dengan selisih yang besar. Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa waktu hidrolisis bukan faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil serta perbedaan hasil antara jurnal [54] dengan jurnal [53] dapat disebabkan oleh beberapa faktor, melihat selisih konsentrasi asam glutamat kedua jurnal tersebut besar.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [54], metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis hanya pengaturan pH menjadi 2.2, sedangkan pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan metode *flushing with air* dan pelarutan hasil pengeringan dengan HAc 0.2N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil

hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Namun, hasil yang diperoleh bertentangan, artinya metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [54] lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [54] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia. Lalu, faktor keempat adalah perbedaan metode atau alat analisis. dimana analisis pada jurnal [54] dilakukan dengan Biochrom B30 *amino acid analyzer*, sedangkan analisis pada jurnal [53] dilakukan dengan RP-HPLC. Kedua metode atau alat analisis tersebut termasuk dalam analisis kromatografi cair, artinya kemungkinan besar perbedaannya berkaitan dengan waktu analisis. Penjelasan lengkap mengenai pengaruh perbedaan metode atau alat analisis terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh akan dibahas pada subbab lain. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [54] dengan jurnal [53] pada spesies *Saccharina latissima* bukan waktu hidrolisis, melainkan negara asal *seaweed* dan metode atau alat analisis.

#### **b. Perbandingan Hidrolisis selama 22 Jam dengan 23 Jam**

Perbandingan waktu hidrolisis selama 22 jam dan 23 jam dapat ditemukan pada spesies *Ulva spp.* (*chlorophyta* atau *seaweed* hijau). Berdasarkan hasil *review*, hidrolisis (HCl 6N pada suhu 110°C) selama 22 jam (jurnal [27]: 0.324–0.722 g/100g dw *seaweed*) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding konsentrasi

asam glutamat yang diperoleh dari hidrolisis selama 23 jam (jurnal [39]: 2.750 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut menunjukkan jika benar bahwa pada penggunaan pelarut dan suhu yang sama, waktu yang lebih pendek dapat menyebabkan proses hidrolisis menjadi kurang efektif sehingga kandungan asam glutamat yang diperoleh menjadi tidak optimal. Selain itu, meskipun kedua waktu tersebut lebih rendah dari 24 jam, tetapi kedua waktu tersebut termasuk dalam waktu standar, sehingga perbedaan hasil yang diperoleh tidak signifikan atau dapat dikatakan bahwa perbedaan waktu tidak terlalu memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Perbedaan hasil yang diperoleh tidak signifikan dapat diketahui dengan melihat selisih antar konsentrasi asam glutamat yang kecil.

Selisih yang besar antara konsentrasi asam glutamat jurnal [27] dengan jurnal [39], menunjukkan bahwa selain waktu hidrolisis, terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang juga memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah perbedaan metode pengeringan *seaweed*. Pada jurnal [39], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses pengeringan dengan metode *oven drying*, sedangkan konsentrasi asam glutamat jurnal [27] diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses pengeringan dengan metode *freeze drying* (0.324 g/100g dw *seaweed*), *vacuum drying* (0.722 g/100g dw *seaweed*), *solar drying* (0.672 g/100g dw *seaweed*), dan *convective drying* (0.388 g/100g dw *seaweed*). Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa *vacuum drying*, *freeze drying*, *convective drying* merupakan metode pengeringan yang lebih baik dibanding metode *oven drying* karena waktu proses yang singkat dan/atau penggunaan tekanan serta suhu yang lebih rendah. Namun perbandingan antara konsentrasi asam glutamat jurnal [27] dengan jurnal [39] menunjukkan hasil yang bertentangan, artinya perbedaan metode pengeringan *seaweed* bukan faktor yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [27] dengan jurnal [39].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [39], tidak ada proses tambahan setelah hidrolisis selesai, sedangkan pada jurnal [27], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu hanya pengaturan pH menjadi 2.2 dengan norleusin. Sebelumnya

sudah dijelaskan bahwa penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis dapat menjaga hasil hidrolisis pada proses selanjutnya, tetapi hasil yang diperoleh bertentangan. Hal ini disebabkan karena metode tambahan pada jurnal [27] dapat dikatakan kurang tepat karena proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis atau proses penetralan tidak dilakukan segera setelah proses hidrolisis selesai, melainkan langsung melakukan penambahan larutan standar untuk persiapan sampel analisis. Dari penjelasan tersebut, diketahui bahwa metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor yang dapat menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [27] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [39].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [27] berasal dari Chili, sedangkan *seaweed* jurnal [39] berasal dari Amerika Serikat. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva spp.* yang dipanen di Chili memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Amerika Serikat. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [54] dengan jurnal [53] pada spesies *Saccharina latissima* adalah waktu hidrolisis dan negara asal *seaweed*.

#### 4.4. Metode atau Alat Analisis

Proses setelah senyawa target diperoleh tergantung pada tujuan proses ekstraksi senyawa tersebut. Salah satu proses yang umum dilakukan baik dalam skala laboratorium maupun industri adalah analisis senyawa untuk mengetahui atau mengontrol kualitas serta kuantitas senyawa yang diperoleh (Rostagno & Juliana, 2013). Metode analisis asam amino termasuk asam glutamat cukup beragam, oleh karena itu pemilihan metode analisis dilakukan dengan mempertimbangkan beberapa hal, seperti rekomendasi organisasi internasional dan kehandalan (penerapan, spesifitas, akurasi, presisi, serta sensitivitas) suatu metode dalam menganalisis senyawa target (Greenfield & Southgate, 2003). Selama 50 tahun terakhir, perkembangan metode analisis asam amino tidak terlalu banyak, umumnya berkaitan pengurangan waktu analisis, penyederhanaan metode, dan pengurangan variabilitas data (Rutherford & Sarwar, 2009). Terdapat dua metode analisis asam amino yang dapat digunakan yaitu metode elektroforesis dan kromatografi, tetapi yang paling populer adalah metode kromatografi (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Metode analisis dengan kromatografi merupakan penemuan yang cukup besar karena saat ini sudah banyak digunakan dalam berbagai industri, salah satunya industri pangan (Rutherford & Sarwar, 2009; Syed, 2010).

Terdapat dua jenis metode kromatografi yaitu kromatografi cair (*liquid chromatography* atau LC) dan kromatografi gas (*gas chromatography* atau GC). Kromatografi cair (LC) terdiri dari berbagai jenis metode yang berbeda, namun yang paling umum digunakan adalah HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dan RP-HPLC (*Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography*). HPLC merupakan teknik pemisahan sekaligus analisis campuran yang sensitif, dimana sampel dipaksa melalui kolom kromatografi (fase diam) di bawah tekanan (Daintith, 2008). HPLC merupakan konversi pertama dari metode kromatografi cair tradisional yang mulai dikembangkan pada akhir tahun 1960-an. Pengembangan ini dilakukan karena metode kromatografi cair tradisional (LC-MS: kombinasi kromatografi cair dan spektrofotometri massa) memiliki kekurangan, dimana efektivitas kolom (fase diam) rendah dan prosesnya membutuhkan waktu yang lama (Galluzzi & Guido, 2014). Penemuan metode HPLC diketahui dapat mengurangi waktu analisis hidrolisat protein (asam amino) serta meningkatkan batas deteksi menjadi sekitar 1 *picomole* (pmol) sehingga metode ini menggeser penggunaan

metode IEC (*Ion Exchange Chromatography*) sejak tahun 1990 (Greenfield & Southgate, 2003; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Waktu analisis diketahui berkurang dari 16 jam (metode IEC awal) menjadi hanya 1–2 jam (HPLC atau kombinasi) (Rutherford & Sarwar, 2009).

HPLC menjadi metode pemisahan sekaligus analisis campuran yang paling sering digunakan (Dabrowski, 1999). Hal ini disebabkan karena metode ini cocok diaplikasikan pada berbagai proses, seperti penelitian produk, control kualitas, pelabelan nutrisi, dan deteksi senyawa aditif dan kontaminan. Selain itu jumlah sampel yang dapat digunakan dalam metode ini sangat bervariasi, mulai dari picogram dan nanogram (skala analitik), mikrogram dan miligram (skala semipreparatif), hingga multigram (skala preparatif). Kemudian, metode HPLC dapat digunakan untuk berbagai jenis sampel, mulai dari ion dan molekul organik kecil hingga biomolekul dan polimer besar. Penggunaan metode HPLC memungkinkan analisis berbagai senyawa dengan sifat atau karakteristik yang berbeda, misalnya senyawa dengan kisaran polaritas yang luas dapat dianalisis dalam sekali proses. Metode ini juga cocok untuk senyawa yang mudah terdegradasi karena suhu tinggi, karena proses analisis dilakukan pada atau sedikit di atas suhu lingkungan (Zhong & Xichang, 2019).

Selanjutnya, RP-HPLC merupakan salah satu perkembangan dari metode HPLC yang juga mendukung penggantian metode IEC, dimana karakteristik fase diam (kolom) dan fase geraknya berkebalikan dengan metode HPLC fase normal. Kolom fase terbalik (*reverse phase column*) digunakan ketika fase gerak berupa senyawa polar karena kolom tersebut memiliki sifat non-polar dan dapat menahan senyawa non-polar lebih lama dibanding senyawa polar. (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Waldron, 1989; Makowski, 2019). Penggunaan kolom fase terbalik dapat mengurangi lebih banyak waktu analisis dibandingkan IEC dan HPLC fase normal, yaitu menjadi kurang dari 1 jam (Rutherford & Sarwar, 2009; Makowski, 2019). Selain itu, RP-HPLC cocok digunakan untuk memisahkan senyawa dalam jumlah yang lebih kecil (sekitar 20 senyawa) dalam satu kali proses, khususnya memisahkan senyawa non polar dan polar (Fountoulakis & Hans-Werner, 1998; Vekey et al., 2008). Selain itu, metode ini dapat digunakan untuk analisis berbagai jenis senyawa, salah satunya sangat umum digunakan untuk analisis

komponen protein seperti peptida dan asam amino karena dapat terpisah dengan baik (Caballero et al., 2016; Wilson, 2000; Vekey et al., 2008; Caballero, 2003).

Berdasarkan hasil *review* (Tabel 3.3.3.), metode atau alat analisis yang sudah pernah digunakan setelah hidrolisis dan dapat dibandingkan yaitu RP-HPLC, UPLC, Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer*, Biochrom B30 *amino acid analyzer*, dan LC3000 *amino acid analyzer*. Berikut penjelasan masing-masing metode atau alat analisis hidrolisis.

#### **a. Perbandingan Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer* dengan RP-HPLC**

Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer* merupakan alat yang memiliki sistem analisis asam amino secara otomatis (*fully automatic*) yang disediakan secara komersial oleh Perusahaan Jeol Ltd. Prinsip yang digunakan oleh metode atau alat tersebut adalah prinsip kromatografi cair (LC) yang mirip dengan HPLC. Kemudian Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer* terdiri dari berbagai komponen alat seperti pompa, kolom, penangas suhu kontan untuk kolom, detektor, dan unit pemrosesan data. Kolom yang disediakan berupa kolom *tandem* yaitu kolom tipe dispersi tekanan berlapis multi-tahap yang memiliki kemampuan pemisahan atau daya pisah yang tinggi. Selain itu, dengan menggunakan kolom *tandem*, masa pakai kolom dapat diperpanjang karena kolom jenis ini mencegah penghancuran dan penyumbatan karena tekanan tinggi dan kecepatan tinggi. Selanjutnya, pompa aliran yang disediakan berupa pompa aliran tunggal yaitu pompa tipe umpan balik sensor aliran yang konstan dan presisi. Penggunaan pompa jenis ini yang dikombinasikan dengan teknologi *degasser* vakum, yang dapat menghilangkan gas terlarut dalam larutan *buffer* dalam fase gerak, serta metode pencampuran fase terkontrol yang dapat mencampur ninhidrin dan eluen secara efisien (Jeol Ltd., 2022)

Kelebihan alat analisis ini adalah pengoperasiannya mudah, kemampuan pemisahan atau daya pisah tinggi, reproduktifitas tinggi, dapat digunakan untuk analisis kuantitatif maupun kualitatif, desain alat ringkas sehingga tidak memerlukan meja komputer, serta kompatibel dengan GLP (*good laboratory practice*) dimana terdapat perangkat lunak bawaan untuk mengecek dan validasi kinerja alat, menguji kesesuaian



sistem saat analisis rutin, serta mengatur pemeliharaan alat. Selanjutnya, Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer* dapat menganalisis lebih dari 18 komponen asam amino penyusun protein termasuk asam glutamat dan 52 jenis asam amino yang lain. Derivatisasi yang digunakan pada sistem ini adalah metode paska-kolom dengan reagen ninhidrin yang dilanjutkan dengan deteksi pada tiga panjang gelombang yang berbeda (440nm, 570nm, 690nm) dengan batas deteksi terkecil 2.5 pmol untuk aspartat. Waktu analisis asam amino yang dibutuhkan untuk analisis asam amino penyusun protein berkisar antara 18–40 menit, sedangkan asam amino lain 60–132 menit. Namun, saat ini Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer* sudah tidak tersedia secara komersial. (Jeol Ltd., 2022). Perbandingan Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer* dengan RP-HPLC dapat ditemukan pada spesies *Ascophyllum nodosum* dan *Fucus vesiculosus*. Berikut penjelasan dari masing-masing spesies.

### 1) *Ascophyllum nodosum*

Pada *Ascophyllum nodosum*, analisis dengan Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer* (jurnal [1]: 0.290–1.649 g/100g dw *seaweed*) setelah hidrolisis (HCl 6N oven 110°C) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding analisis dengan RP-HPLC (jurnal [19]: 1.715 g/100g dw *seaweed*). Pada jurnal [19], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan pada jurnal [1], konsentrasi asam glutamat terdiri dari tiga data yang diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu *acid extraction*, *alkali extraction*, dan *acid-alkali extraction* sebelum proses hidrolisis. Di antara ketiga data tersebut, konsentrasi asam glutamat tertinggi diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein dengan metode *alkali extraction* (1.649 g/100g dw *seaweed*) dan hasil pembahasan jurnal [1] menunjukkan bahwa perbedaan metode ekstraksi protein sangat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh pada jurnal tersebut. Jika diasumsikan peneliti pada masing-masing jurnal tersebut melakukan penelitian untuk mencari konsentrasi asam glutamat yang optimal (tertinggi), maka dapat diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [1] (1.649 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [19] (1.715 g/100g dw *seaweed*) dengan selisih yang sangat kecil. Hasil tersebut sesuai dengan teori yang

menyatakan bahwa RP-HPLC merupakan perkembangan dari metode HPLC, artinya kemampuan kedua metode atau alat tersebut hampir sama, perbedaannya hanya penggunaan kolom fase terbalik pada RP-HPLC yang diketahui dapat mengurangi lebih waktu analisis hingga kurang dari 1 jam (waktu analisis dengan HPLC).

Hasil yang lebih rendah pada jurnal [1], dapat disebabkan karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan dapat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah perbedaan waktu hidrolisis. Pada subbab sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada penggunaan pelarut dan suhu yang sama, waktu yang lebih pendek memang dapat menyebabkan proses hidrolisis kurang efektif sehingga kandungan asam glutamat yang diperoleh menjadi tidak optimal. Namun, meskipun 23 jam lebih rendah dari 24 jam, tetapi kedua waktu tersebut termasuk dalam waktu standar, sehingga perbedaan hasil yang diperoleh tidak signifikan atau dapat dikatakan bahwa perbedaan waktu tidak terlalu memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [1], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa presipitasi dengan 24% TCA, sentrifugasi, pengenceran dengan *buffer* natrium sitrat 0.2N pH 2.2, pengenceran dengan norleusin, dan derivatisasi dengan ninhidrin. Pada jurnal [19], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan berukuran 0.45 $\mu$ m, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa tidak ada yang melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai, semuanya dimulai dengan pemisahan senyawa target berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang lebih sama. Selain itu, penjelasan ini menunjukkan bahwa perbedaan kombinasi metode tambahan bukan faktor yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [1] lebih rendah dibanding jurnal [19].

Selanjutnya faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [1] berasal dari Irlandia, sedangkan *seaweed* jurnal [19] berasal dari Spanyol. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ascophyllum nodosum* yang dipanen di Irlandia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Spanyol. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa penggunaan UPLC, HPLC, atau RP-HPLC untuk analisis tidak terlalu memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Selain itu, kemungkinan besar selisih hasil yang kecil disebabkan oleh perbedaan negara asal *seaweed*.

## 2) *Fucus vesiculosus*

Pada *Fucus vesiculosus*, analisis dengan Jeol JLC-500/V *amino acid analyzer* (jurnal [44]: 0.032–0.757 g/100g dw *seaweed*) setelah hidrolisis (HCl 6N oven 110°C) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding analisis dengan RP-HPLC (jurnal [19]: 1.715 g/100g dw *seaweed*). Pada jurnal [19], konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan pada jurnal [44], konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda yaitu dengan metode tradisional (*osmotic shock*, ultrasonikasi, presipitasi), metode HPP (*high pressure processing*), metode *autoclave pre-treatment*, serta satu data yang diperoleh tanpa melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein dibandingkan, maka dapat diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [44] (1.649 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [19] (1.715 g/100g dw *seaweed*) dengan selisih yang sangat kecil. Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa RP-HPLC merupakan perkembangan dari metode HPLC, artinya kemampuan kedua metode atau alat tersebut hampir sama, perbedaannya hanya penggunaan kolom fase

terbalik pada RP-HPLC yang diketahui dapat mengurangi lebih waktu analisis hingga kurang dari 1 jam (waktu analisis dengan HPLC).

Hasil yang lebih rendah pada jurnal [44], dapat disebabkan karena terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan dapat memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah perbedaan waktu hidrolisis. Pada subbab sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada penggunaan pelarut dan suhu yang sama, waktu yang lebih pendek memang dapat menyebabkan proses hidrolisis kurang efektif sehingga kandungan asam glutamat yang diperoleh menjadi tidak optimal. Namun, meskipun 23 jam lebih rendah dari 24 jam, tetapi kedua waktu tersebut termasuk dalam waktu standar, sehingga perbedaan hasil yang diperoleh tidak signifikan atau dapat dikatakan bahwa perbedaan waktu tidak terlalu memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [44], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa presipitasi dengan 24% TCA, sentrifugasi, pengenceran dengan *buffer* natrium sitrat 0.2N pH 2.2, dan pengenceran dengan norleusin. Pada jurnal [19], kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis yang dilakukan berupa pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan berukuran 0.45 $\mu$ m, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa tidak ada yang melakukan proses pemisahan pelarut dengan hasil hidrolisis segera setelah hidrolisis selesai, semuanya dimulai dengan pemisahan senyawa target berdasarkan ukuran molekul, sehingga dapat dikatakan kombinasi metode tambahan yang digunakan kurang lebih sama. Selain itu, penjelasan ini menunjukkan bahwa perbedaan kombinasi metode tambahan bukan faktor yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [44] lebih rendah dibanding jurnal [19].

Selanjutnya faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [44] berasal dari Irlandia, sedangkan *seaweed* jurnal [19] berasal dari

Spain. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Fucus vesiculosus* yang dipanen di Irlandia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Spanyol. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa penggunaan UPLC, HPLC, atau RP-HPLC untuk analisis tidak terlalu memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Selain itu, kemungkinan besar selisih hasil yang kecil disebabkan oleh perbedaan negara asal *seaweed*.

#### **b. Perbandingan UPLC dengan RP-HPLC**

UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) merupakan pengembangan dari metode HPLC dan RP-HPLC, yang mulai digunakan sejak sekitar satu dekade yang lalu (Galluzzi & Guido, 2014; Rutherford & Sarwar, 2009; Atta-ur-Rahman, 2021). Pengembangan metode kromatografi cair terus dilakukan karena kromatografi cair memiliki koefisien difusi yang lebih rendah dibandingkan kromatografi gas yang berakibat pada lambatnya difusi senyawa dalam fase gerak ke fase diam (Taleuzzaman et al., 2015). Oleh karena itu, UPLC diciptakan dengan tujuan utama yaitu untuk mempercepat proses analisis dengan mengatur ukuran partikel dalam fase diam (Taleuzzaman et al., 2015; Chawla & Chanda, 2016). Metode UPLC sudah cukup banyak digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif di berbagai bidang termasuk pangan, karena alat dan komponen sistemnya sudah tersedia secara komersial, waktu proses singkat, dan hasil yang diperoleh juga tinggi, dimana metode ini sangat cocok untuk analisis campuran kompleks seperti asam amino (Taleuzzaman et al., 2015; Chawla & Chanda, 2016; Fanali et al., 2017).

Salah satu kelebihan yang menonjol dari metode ini adalah waktu proses yang lebih cepat dibandingkan metode HPLC dan RP-HPLC yaitu kurang dari 30 menit (Taleuzzaman et al., 2015; Makowski, 2019). Selain waktu proses yang lebih cepat, penggunaan UPLC untuk analisis diketahui meningkatkan sensitivitas, resolusi (daya pisah), serta kapasitas atau retensi secara signifikan dibandingkan HPLC dan RP-

HPLC (Galluzzi & Guido, 2014). Selain itu dengan menggunakan UPLC, volume fase gerak (*buffer* atau pelarut) yang digunakan dapat berkurang atau lebih sedikit dibanding menggunakan HPLC dan RP-HPLC, sehingga biaya analisis dapat berkurang sekaligus lebih ramah lingkungan (Chawla & Chanda, 2016; Taleuzzaman et al., 2015). Meskipun penggunaan *buffer* atau pelarut lebih sedikit tetapi laju aliran tetap lebih cepat dibanding metode kromatografi cair yang lain (Fanali et al., 2017).

Pada *Ulva ohnoi*, analisis dengan RP-HPLC (jurnal [40]: 2.000 g/100g dw *seaweed*) setelah hidrolisis (HCl 6N oven 110°C 24 jam) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang berada dalam kisaran konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari analisis dengan UPLC (jurnal [58]: 1.822–2.188 g/100g dw *seaweed*). Hasil seperti itu dapat diperoleh karena konsentrasi asam glutamat dari jurnal [58] berbentuk kisaran. Oleh karena itu, untuk mengetahui pengaruh perbedaan pelarut utama (katalis) terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh, maka data kisaran konsentrasi asam glutamat tersebut perlu dijabarkan. Kisaran konsentrasi asam glutamat pada jurnal [58] terdiri dari sembilan data yang diperoleh dari *seaweed* yang tumbuh dan dipanen pada lokasi dengan salinitas yang berbeda (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 *part per thousand*), sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [40] diperoleh dari *seaweed* yang tumbuh dan dipanen pada lokasi dengan salinitas 35 *part per thousand* atau salinitas air laut pada umumnya.

Jika konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari *seaweed* yang tumbuh dan dipanen pada lokasi dengan salinitas 35 *part per thousand* dibandingkan, maka diketahui bahwa konsentrasi asam glutamat jurnal [58] (1.833 g/100g dw *seaweed*) lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [40] (2.000 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut tidak sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa selain waktu analisis yang lebih cepat, penggunaan UPLC diketahui meningkatkan sensitivitas, resolusi (daya pisah), serta kapasitas atau retensi secara signifikan dibanding HPLC dan RP-HPLC. Hal ini disebabkan karena selisih hasil antara jurnal [58] dengan jurnal [40] kecil. Namun, jika teori tersebut diperhatikan lagi, belum ada yang menyatakan bahwa senyawa target yang diperoleh dari analisis dengan UPLC pasti lebih tinggi dibanding HPLC dan RP-HPLC, satu-satunya pernyataan yang ditekankan dalam teori tersebut

adalah penggunaan UPLC menyebabkan waktu analisis menjadi jauh lebih singkat dibanding waktu analisis dengan HPLC dan RP-HPLC.

Pada jurnal [58] dan [40], waktu hidrolisis (24 jam), kombinasi metode tambahan (pengenceran dengan air distilasi, penyaringan dengan saringan atau membran yang memiliki ukuran pori-pori 0.45 $\mu$ m, dan derivatisasi dengan reagen AccQ-Fluor), negara asal *seaweed* (Australia), serta lokasi panen *seaweed* (James Cook University) diketahui sama. Oleh karena itu, dapat diketahui bahwa kemungkinan besar satu-satunya perbedaan antara kedua jurnal yang dapat menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [58] dengan jurnal [40] adalah waktu panen. Namun, hanya waktu panen *seaweed* jurnal [58] yang diketahui (Mei 2010), sedangkan waktu panen *seaweed* jurnal [40] tidak disebutkan dalam jurnal. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa penggunaan UPLC, HPLC, atau RP-HPLC untuk analisis tidak terlalu memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Selain itu, kemungkinan besar selisih hasil yang kecil disebabkan oleh perbedaan waktu panen *seaweed*.

### c. Perbandingan LC3000 *amino acid analyzer* dengan RP-HPLC

LC3000 *amino acid analyzer* merupakan metode atau alat yang dibuat oleh Perusahaan Eppendorf. Prinsip yang digunakan dalam metode atau alat ini adalah kromatografi cair, lebih tepatnya adalah IEC (*Ion Exchange Chromatography*) (Medwaw, 2022). Kromatografi pertukaran ion (IEC) termasuk salah satu metode kromatografi tertua dengan kemampuan pemisahan yang sangat kuat untuk analisis dan pemurnian protein dan asam amino (Valko, 2020; Syed, 2010; Jagschies et al., 2017). IEC memiliki prinsip kerja dimana senyawa target dipisahkan berdasarkan perbedaan muatan ion yang dapat dimodulasi oleh pH dan kekuatan (konsentrasi) ion dalam larutan atau fase gerak (Syed, 2010; Wei & Sangamesh, 2020; Ciborowski & Silberring, 2016). Ion pada permukaan molekul senyawa akan mengalami interaksi elektrostatik dengan ion yang menempel pada fase diam, gaya tolak menolak antar ion akan muncul jika muatannya sejenis, tetapi gaya tarik menarik akan muncul jika muatannya berlawanan (Jagschies et al., 2017).

Dalam metode ini, fase diam yang digunakan berupa resin penukar ion yang terbuat dari berbagai kopolimer organik sintetik atau anorganik, polisakarida yang terikat silang, serta ligan yang bermuatan positif atau negatif (Ciborowski & Silberring, 2016; Daintith, 2008). Berdasarkan jenis resin penukar ion yang digunakan, metode IEC dikelompokkan menjadi *anion exchange chromatography* (AEC) dan *cation exchange chromatography* (CEC) (Fanali et al., 2017). Metode AEC digunakan jika senyawa yang diinginkan menghasilkan ion negatif (anion) ketika diionisasi, seperti asam glutamat dan asam aspartat (Wei & Sangamesh, 2020). Oleh karena itu, dalam metode AEC, resin penukar ion yang digunakan adalah resin yang memiliki ion positif (resin kation atau penukar anion) (Daintith, 2008; Valko, 2020). Kemudian, metode CEC digunakan jika senyawa yang diinginkan menghasilkan ion positif (kation) ketika diionisasi, seperti histidin, lisin, dan arginin (Wei & Sangamesh, 2020). Berbeda dengan metode AEC, resin penukar ion yang digunakan dalam metode CEC adalah resin yang memiliki ion negatif (resin anion atau penukar kation) (Daintith, 2008; Valko, 2020).

Selanjutnya, fase gerak dalam metode ini berupa larutan *buffer* karena dalam proses ini dibutuhkan proses pembentukan ion (ionisasi) (Ciborowski & Silberring, 2016; Valko, 2020). Ion pada resin dengan kemampuan yang kuat dapat terbentuk sempurna saat *buffer* memiliki rentang pH 2–12, sedangkan ion pada resin dengan kemampuan yang lemah dapat terbentuk hanya saat *buffer* memiliki pH rendah (asam). Secara umum, resin penukar ion yang kuat lebih sering digunakan karena ion pada resin dapat terbentuk pada fase gerak (*buffer*) dengan rentang pH yang luas (Valko, 2020). Selain itu pH fase gerak (*buffer*) umumnya berada pada kisaran mendekati normal hingga basa, bukan asam. Fase gerak pada metode AEC umumnya memiliki pH 8.5, sedangkan fase gerak pada metode CEC memiliki pH 6.5 (Ciborowski & Silberring, 2016). *Buffer* yang sering digunakan dalam metode IEC adalah *buffer* Tris, fosfat, asam asetat, atau trietanolamin (Abbott & Ellison, 2008). Selain itu, kuat lemahnya interaksi elektrostatik juga dipengaruhi oleh kekuatan ionik (konsentrasi ion) *buffer* yang digunakan pada fase gerak. Umumnya, interaksi elektrostatik menjadi sangat kuat jika kekuatan ionik *buffer* rendah (10–100 mM; umumnya sekitar 25 mM) (Jagschies et al., 2017; Ciborowski & Silberring, 2016; Valko, 2020). Perubahan



konsentrasi *buffer* menjadi lebih tinggi (mencapai 1.5 M) dan perubahan pH dibutuhkan hanya saat molekul yang terikat pada resin penukar ion akan dielusi (dipisahkan atau dicuci) dari kolom setelah proses pemisahan selesai (Ciborowski & Silberring, 2016; Fanali et al., 2017).

Pada LC3000 *amino acid analyzer* yang dibuat oleh Perusahaan Eppendorf, komponen alat yang dibutuhkan disediakan secara lengkap. Komponen alat tersebut meliputi kolom, injektor, pompa eluen, perangkat lunak penyimpanan data, dan detektor cahaya. Kolom (resin) yang digunakan terbuat dari baja tahan karat yang dilapisi polimer penukar kation. Kemudian injektor memiliki *loop* tetap, bekerja secara otomatis, serta dilengkapi dengan pembilasan otomatis. Selanjutnya pompa eluen yang digunakan merupakan jenis piston ganda dengan laju aliran 0.01–1ml/menit dan tekanan maksimal 2000 psi. Lalu, detektor yang digunakan secara umum adalah UVD atau UV-VIS dan kadang dikombinasikan dengan detektor fluoresensi. Selain itu, proses derivatisasi juga dilakukan dengan metode paska-kolom menggunakan reagen ninhydrin selama 30–120 menit.. Selain komponen alat dan reagen derivatisasi, juga disediakan komponen yang lain seperti *buffer* bebas sitrat dan klorida, sistem kontrol yang terintegrasi, pelarut lain yang dibutuhkan, serta pendingin sampel (Medwow, 2022).

Kemudian, sebelumnya sudah dijelaskan bahwa penemuan metode HPLC dan RP-HPLC yang dapat mengurangi waktu analisis hidrolisat protein (asam amino) serta meningkatkan batas deteksi menjadi sekitar 1 *picomole* (pmol) dapat menggeser penggunaan metode kromatografi pertukaran ion atau IEC (*Ion Exchange Chromatography*) sejak tahun 1990 (Greenfield & Southgate, 2003; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa waktu analisis dan sensitivitas IEC tidak sebaik HPLC dan RP-HPLC. Perbandingan antara konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari analisis dengan LC3000 *amino acid analyzer* dan RP-HPLC, menunjukkan hasil yang cukup beragam. Analisis dengan LC3000 *amino acid analyzer* diketahui menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah serta lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat yang diperoleh dari analisis

dengan RP-HPLC. Berikut penjelasan masing-masing hasil analisis dengan LC3000 *amino acid analyzer* dan RP-HPLC.

### 1) Hasil Hidrolisis Lebih Rendah

Pada *Ulva lactuca*, analisis dengan LC3000 *amino acid analyzer* (jurnal [48]: 0.012–0.019 g/100g dw *seaweed*) setelah hidrolisis (HCl 6N oven 110°C 24 jam) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding analisis dengan RP-HPLC (jurnal [53]: 0.155–2.078 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa penemuan metode HPLC dan RP-HPLC yang dapat mengurangi waktu analisis hidrolisat protein (asam amino) serta meningkatkan batas deteksi menjadi sekitar 1 *picomole* (pmol) dapat menggeser penggunaan metode IEC (*Ion Exchange Chromatography*) sejak tahun 1990 (Greenfield & Southgate, 2003; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa sensitivitas IEC tidak sebaik HPLC dan RP-HPLC, sehingga konsentrasi asam glutamat yang dapat dideteksi terbatas.

Selain metode atau alat analisis, perbedaan hasil dengan selisih yang besar menunjukkan bahwa terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan juga memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan proses ekstraksi protein. Konsentrasi asam glutamat jurnal [48] diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [53] konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka konsentrasi konsentrasi asam glutamat jurnal [48] (0.012–0.019 g/100g dw *seaweed* g/100g dw *seaweed*) diketahui tetap lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.758 g/100g dw *seaweed*). Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa penggunaan proses

ekstraksi protein bukan faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [48] dengan jurnal [53].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [48], hasil hidrolisis tidak melalui proses tambahan, sedangkan pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu evaporasi dan pelarutan dengan *buffer* NLE-100/norleusin. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa melalui proses tambahan yang tepat lebih baik dibanding tidak melalui proses tambahan setelah hidrolisis. Lalu, pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis juga merupakan faktor penyebab konsentrasi asam glutamat jurnal [48] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [48] berasal dari Mesir, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Mesir memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [48] dengan jurnal [53] pada spesies *Ulva lactuca* adalah metode atau alat analisis, metode tambahan setelah hidrolisis, dan negara asal *seaweed*.

## 2) Hasil Hidrolisis Lebih Tinggi

Pada *Ulva lactuca*, analisis dengan LC3000 *amino acid analyzer* (jurnal [48]: 0.012–0.019 g/100g dw *seaweed*) setelah hidrolisis (HCl 6N oven 110°C 24 jam) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding analisis dengan RP–HPLC (jurnal [10]: 0.0026 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut tidak sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa penemuan metode HPLC dan RP–HPLC yang dapat mengurangi waktu analisis hidrolisat protein (asam amino) serta meningkatkan batas deteksi menjadi sekitar 1 *picomole* (pmol) dapat menggeser penggunaan metode IEC (*Ion Exchange Chromatography*) sejak tahun 1990 (Greenfield & Southgate, 2003; Fountoulakis & Hans-Werner, 1998). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa sensitivitas IEC tidak sebaik HPLC dan RP–HPLC, sehingga konsentrasi asam glutamat yang dapat dideteksi terbatas.

Hasil yang bertentangan dapat disebabkan karena terdapat faktor lain di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang lebih memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah penggunaan proses ekstraksi protein. Pada jurnal [48] konsentrasi asam glutamat diperoleh dari seaweed yang tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan pada jurnal [10] seaweed melalui proses ekstraksi protein dengan alkali (NaOH 1N) pada suhu 80°C lalu didinginkan dan dinetralkan dengan HCl 6N. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa *alkali-acid extraction*, metode ekstraksi protein yang digunakan pada jurnal [10] merupakan metode ekstraksi protein yang kurang tepat karena penggunaan HCl 6N sebagai pelarut kedua tidak lebih baik dibanding larutan alkali dalam melarutkan protein. Bahkan justru berpotensi menyebabkan kehilangan protein sebelum hidrolisis (Barbarino & Lourenço, 2005). Selain itu, sampel yang digunakan untuk hidrolisis pada jurnal [10] merupakan sisa hasil proses ekstraksi berturut-turut getah, lipid, ulvan yang dilakukan pada suhu tinggi sehingga jumlah protein yang diperoleh setiap proses selesai mengalami penurunan. Dari penjelasan tersebut dapat diketahui bahwa penggunaan ekstraksi protein pada jurnal [10] merupakan faktor yang menyebabkan konsentrasi asam glutamat jurnal [48] lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [10].

Kemudian, faktor kedua adalah perbedaan penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [48], hasil hidrolisis tidak melalui proses tambahan, sedangkan pada jurnal [10], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu pengeringan dengan teknologi vakum, derivatisasi dengan PITC, pengeringan dengan teknologi vakum, pelarutan dengan *buffer* fosfat, pH diatur menjadi 7.4 dengan asetonitril, dan penyaringan. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa melalui proses tambahan yang tepat lebih baik dibanding tidak melalui proses tambahan setelah hidrolisis. Lalu, pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [10]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Namun hasil perbandingan yang diperoleh bertentangan, artinya metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor penyebab konsentrasi asam glutamat jurnal [48] lebih tinggi dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [10].

Selanjutnya, faktor ketiga adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [48] berasal dari Mesir, sedangkan *seaweed* jurnal [10] berasal dari India. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Ulva lactuca* yang dipanen di Mesir memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding *seaweed* yang dipanen di India. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [48] dengan jurnal [10] pada spesies *Ulva lactuca* adalah penggunaan proses ekstraksi berturut-turut dan metode ekstraksi yang tidak tepat pada jurnal [10] serta negara asal *seaweed*.

#### d. Perbandingan Biochrom B30 *amino acid analyzer* dengan RP–HPLC

Biochrom B30 *amino acid analyzer* merupakan metode atau alat analisis asam amino khusus yang dibuat oleh Perusahaan Biochrom. Prinsip kerja metode atau alat tersebut adalah kromatografi cair, lebih tepatnya kromatografi pertukaran ion atau IEC (*Ion Exchange Chromatography*). Berbeda dengan LC3000 *amino acid analyzer*, metode atau alat ini dikembangkan karena adanya kesulitan dalam analisis asam amino dengan HPLC konvensional yang disebabkan oleh karakteristik sampel yang kompleks dan sifat kimia yang unik dari asam amino yaitu senyawa ionik tanpa panjang gelombang serapan spesifik. Penerapan prinsip IEC dan derivatisasi paska-kolom dengan reagen ninhidrin memungkinkan metode atau alat ini digunakan untuk analisis kuantitatif dan kualitatif 56 asam amino dan turunannya, termasuk asam amino penyusun protein seperti asam glutamate (Biochrom, 2022).

Biochrom B30 *amino acid analyzer* memiliki tiga jenis sistem yang dapat dipilih, yaitu *physiological accelerated system* (kecepatan analisis adalah faktor utama dan resolusi puncak dapat dikompromi; waktu proses: 1.5 jam), *physiological high-performance system* (kompromi terbaik antara kecepatan, resolusi, dan masa pakai kolom; waktu proses: 2 jam 5 menit), serta *physiological high resolution* (pemisahan dasar dilakukan 100%, jumlah asam amino yang dipisahkan maksimum, waktu proses selama 2.5 jam). Kemudian, sama seperti metode atau alat komersial lainnya, setiap jenis sistem disediakan berbagai komponen yaitu pompa, *autosampler* yang dilengkapi dengan pendingin, kolom (kolom analisis, kolom *prewash*, isi ulang resin penukar ion), reagen ninhidrin, botol *buffer* litium, reagen lain yang cocok untuk berbagai analisis, sistem deteksi, suku cadang, standar kalibrasi, kabel daya, kontrol perangkat keras dan lunak untuk penanganan data, komputer dengan Windows dan layar LED, serta dokumen panduan penggunaan (Biochrom, 2022).

Kelebihan dari Biochrom B30 *amino acid analyzer* yaitu mampu mengidentifikasi dan menghitung asam amino secara akurat, handal karena pemisahan dilakukan secara optimal, waktu analisis cepat, ekonomis karena masa pakai kolom panjang, berjalan secara otomatis dan dapat beroperasi 24 jam selama 7 hari, dapat digunakan untuk berbagai sampel, mudah digunakan dan pemakai tidak perlu mengganti komponen alat

karena pembuatan alat dapat disesuaikan dengan kebutuhan, tersedia layanan pembersihan dan pengemasan ulang kolom, serta desain alat hanya membutuhkan ruang kecil (Biochrom, 2022). Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa penggunaan Biochrom B30 *amino acid analyzer* lebih baik dibanding penggunaan metode atau alat IEC dan HPLC konvensional, karena menggunakan prinsip IEC yang dikenal sebagai prinsip pemisahan yang kuat tetapi dilakukan dalam waktu yang lebih cepat dari metode IEC konvensional atau sama seperti waktu analisis dengan HPLC.

Pada *Saccharina latissima*, analisis dengan Biochrom B30 *amino acid analyzer* (jurnal [54]: 1.680–3.650 g/100g dw *seaweed*) setelah hidrolisis (HCl 6N oven 110°C) menghasilkan konsentrasi asam glutamat yang lebih tinggi dibanding analisis dengan RP-HPLC (jurnal [53]: 0.0091–0.758 g/100g dw *seaweed*). Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan yang sudah dijelaskan sebelumnya bahwa penggunaan Biochrom B30 *amino acid analyzer* lebih baik dibanding analisis dengan IEC atau HPLC konvensional. Hasil yang lebih baik disebabkan karena sebenarnya asam amino memiliki karakteristik yang kompleks dan sifat kimia yang unik dari asam amino yaitu senyawa ionik tanpa panjang gelombang serapan spesifik, artinya pemisahan berdasarkan muatan ion lebih baik dibanding polaritasnya (HPLC, RP-HPLC, atau UPLC). Penjelasan tersebut juga didukung dengan teori yang menyatakan bahwa kromatografi pertukaran ion (IEC) secara umum memiliki kemampuan pemisahan yang sangat kuat untuk analisis dan pemurnian protein dan asam amino, tetapi waktu analisis yang dibutuhkan lebih lama dibanding HPLC, RP-HPLC, atau UPLC.

Meskipun ada teori yang menyatakan bahwa penggunaan RP-HPLC dapat mengurangi waktu analisis hidrolisat protein (asam amino) serta meningkatkan batas deteksi menjadi sekitar 1 *picomole* (pmol) sehingga menggeser penggunaan metode IEC (*Ion Exchange Chromatography*) sejak tahun 1990, tetapi itu hanya berlaku untuk metode atau alat IEC konvensional, sedangkan Biochrom B30 *amino acid analyzer* merupakan metode atau alat yang telah dikembangkan sedemikian rupa sehingga kemampuan pemisahan dan deteksi asam aminonya lebih unggul dibanding IEC atau HPLC konvensional. Selain itu, sebelumnya sudah diketahui bahwa penggunaan UPLC, HPLC, atau RP-HPLC untuk analisis tidak terlalu memengaruhi konsentrasi

asam glutamat yang diperoleh, artinya dapat dikatakan bahwa penggunaan Biochrom B30 *amino acid analyzer* juga lebih unggul dibanding RP-HPLC dalam pengaruhnya terhadap konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Kemudian, perbedaan hasil dengan selisih yang besar menunjukkan bahwa terdapat faktor lain baik di dalam maupun di luar proses ekstraksi dan analisis yang kemungkinan juga memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh. Faktor pertama adalah perbedaan penggunaan proses ekstraksi protein. Konsentrasi asam glutamat jurnal [54] diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, sedangkan konsentrasi asam glutamat pada jurnal [53] konsentrasi asam glutamat terdiri dari empat data, dimana tiga data diperoleh dari *seaweed* yang melalui proses ekstraksi protein yang berbeda, yaitu metode tradisional (sonikasi & presipitasi), *pH-shift*, dan *accelerated solvent extraction* (ASE), dan satu data diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein. Jika konsentrasi asam glutamat diperoleh dari *seaweed* yang tidak melalui proses ekstraksi protein, maka konsentrasi asam glutamat jurnal [54] (1.680–3.650 g/100g dw *seaweed* g/100g dw *seaweed*) diketahui tetap lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53] (0.758 g/100g dw *seaweed*). Dari penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa penggunaan proses ekstraksi protein bukan faktor lain yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [54] dengan jurnal [53]. Selanjutnya, faktor kedua adalah perbedaan waktu hidrolisis. Pada subbab sebelumnya sudah dijelaskan bahwa pada penggunaan pelarut dan suhu yang sama, waktu yang lebih pendek memang dapat menyebabkan proses hidrolisis kurang efektif sehingga kandungan asam glutamat yang diperoleh menjadi tidak optimal. Namun, meskipun 23 jam lebih rendah dari 24 jam, tetapi kedua waktu tersebut termasuk dalam waktu standar, sehingga perbedaan hasil yang diperoleh tidak signifikan atau dapat dikatakan bahwa perbedaan waktu tidak terlalu memengaruhi konsentrasi asam glutamat yang diperoleh.

Kemudian, faktor ketiga adalah perbedaan penggunaan metode tambahan setelah hidrolisis. Pada jurnal [54], hasil hidrolisis tidak melalui proses tambahan, sedangkan pada jurnal [53], kombinasi metode tambahan yang dilakukan setelah hidrolisis yaitu



evaporasi dan pelarutan dengan *buffer* NLE-100/norleusin. Sebelumnya sudah dijelaskan bahwa melalui proses tambahan yang tepat lebih baik dibanding tidak melalui proses tambahan setelah hidrolisis. Lalu, pemisahan pelarut utama (katalis) dari hasil hidrolisis, salah satunya dengan proses pengeringan (jurnal [53]), segera setelah hidrolisis penting untuk dilakukan karena dapat mencegah kontak pelarut dengan hasil hidrolisis yang terlalu lama, sehingga dapat meminimalkan kehilangan senyawa target karena degradasi atau kerusakan dan dapat memperoleh konsentrasi senyawa target secara optimal. Namun hasil yang diperoleh bertentangan sehingga dapat diketahui bahwa kombinasi metode tambahan setelah hidrolisis bukan faktor penyebab konsentrasi asam glutamat jurnal [54] lebih rendah dibanding konsentrasi asam glutamat jurnal [53].

Selanjutnya, faktor keempat adalah perbedaan negara asal *seaweed*, dimana *seaweed* jurnal [54] berasal dari Norwegia, sedangkan *seaweed* jurnal [53] berasal dari Swedia. Negara asal *seaweed* yang berbeda berkaitan dengan kondisi tempat tumbuh dan panen *seaweed* seperti salinitas, suhu, pH, serta kadar nitrogen, karbondioksida, dan oksigen) yang diketahui memengaruhi konsentrasi nutrisi dalam *seaweed* termasuk protein dan asam glutamat *seaweed* (O'Connor, 2017). Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan *Saccharina latissima* yang dipanen di Norwegia memang memiliki konsentrasi asam glutamat yang lebih rendah dibanding *seaweed* yang dipanen di Swedia. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa faktor utama yang menyebabkan perbedaan hasil antara jurnal [54] dengan jurnal [53] pada spesies *Saccharina latissima* adalah metode atau alat analisis, waktu hidrolisis, dan negara asal *seaweed*.