

PENGARUH SUHU EKSTRAKSI TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOLIK *Eucheuma spinosum*

Putu Tara Hradaya Komala¹, Amir Husni^{2*}

¹Departemen Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada

²Pusat Kajian Ketahanan dan Keberlanjutan Hasil Laut Departemen Perikanan Fakultas Pertanian
Universitas Gadjah Mada

*Korespondensi: a-husni@ugm.ac.id

Cara sitasi: Komala PTH, Husni A. 2021. Pengaruh suhu ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak metanolik *Eucheuma spinosum*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 24(1): 1-10.

Abstrak

Eucheuma spinosum merupakan alga merah yang banyak dibudidayakan dan termasuk salah satu komoditas unggulan karena memiliki senyawa fenolik dan flavonoid yang mampu berperan sebagai antioksidan. Senyawa fenolik dan flavonoid pada *E. spinosum* dapat diperoleh melalui proses maserasi menggunakan metanol yang pada umumnya dilakukan pada suhu ruang. Proses ekstraksi untuk mendapatkan hasil maksimum dapat dipercepat dengan cara meningkatkan suhu ekstraksi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan *E. spinosum* yang diekstraksi menggunakan metanol dengan suhu 55, 65, dan 75 °C. Sebelum diekstraksi rumput laut dicuci bersih dan dikeringkan pada oven bersuhu 40 °C selama 24 jam. Ekstraksi dilakukan dengan metanol 80% (1:10, b/v). Parameter yang diuji pada penelitian ini yaitu rendemen, uji fitokimia, total fenolik, total flavonoid, dan aktivitas antioksidan meliputi uji DPPH dan FRAP. Data penelitian mengindikasikan bahwa suhu ekstraksi memengaruhi total fenolik maupun aktivitas antioksidan baik hasil uji DPPH maupun FRAP, namun tidak berpengaruh terhadap rendemen dan total flavonoid. Suhu ekstraksi 55 °C menghasilkan ekstrak dengan daya antioksidan paling tinggi (IC₅₀ DPPH sebesar 362,52±7,10 ppm, dan nilai FRAP sebesar 70,30±10,01 µM ekivalen Fe(II)/g).

Kata kunci: DPPH, FRAP, rumput laut merah, total fenolik, total flavonoid

Extraction Temperature Affect on Methanolic Extract Antioxidant Activity of *Eucheuma spinosum*

Abstract

A red alga *Eucheuma spinosum* is widely cultivated and also one of the superior commodities because it has phenolic and flavonoid compounds that can act as antioxidants. Phenolic content and flavonoids in *E. spinosum* can be obtained through a maceration process with methanol as a solvent which is generally carried out at room temperature. The extraction process to obtain maximum yield can be accelerated by increasing the extraction temperature. This research aims to determine the antioxidant activity of *E. spinosum* extracted using methanol at temperatures of 55, 65, and 75 °C. Before extraction, the seaweed was washed and dried in an oven at 40 °C for 24 hours. Extraction was carried out with 80% methanol in a ratio of 1:10 (w/v). The parameters analyzed in this research were yield, phytochemical test, total phenolic content (TPC), total flavonoids, antioxidant activity including DPPH and FRAP. The data indicated that the extraction temperature affected total phenolic and antioxidant activity of both DPPH and FRAP, but did not affect the yield and total flavonoids. Extraction temperature of 55 °C resulted extract with higher antioxidant activity with an IC₅₀ DPPH value was 362.52±7.10 ppm and FRAP value 70.30±10.01 µM equivalent to Fe (II)/g.

Keyword: DPPH, FRAP, red seaweed, total flavonoids, total phenolic content

PENDAHULUAN

Rumput laut adalah salah satu sumber daya hayati yang banyak tumbuh di perairan Indonesia. Fathmawati *et al.* (2014) menyatakan bahwa sekitar 60-70% kebutuhan pasar dunia akan rumput laut dipasok dari Indonesia. Rumput laut merah seperti *Eucheuma spinosum* umumnya tumbuh di perairan yang banyak tersebar hampir di seluruh perairan Indonesia (Santoso dan Nugraha 2008). Manfaat rumput laut antara lain dapat digunakan sebagai sumber antioksidan (Sari *et al.* 2015; Dolorosa *et al.* 2017; Nurjanah *et al.* 2017). Selain sebagai penghasil karagenan, *E. spinosum* juga merupakan salah satu komoditas unggulan karena memiliki senyawa fenolik yang mampu berperan sebagai antioksidan (Hanapi *et al.* 2013).

Senyawa fenolik yang ada pada *E. spinosum* dapat diperoleh melalui proses ekstraksi dengan pelarut metanol (Podungge *et al.* 2018). Altemimi *et al.* (2017) menyatakan bahwa metanol merupakan pelarut polar yang memiliki efektivitas yang tinggi dan juga merupakan salah satu pelarut yang ekonomis. Proses ekstraksi *E. spinosum* dapat dilakukan dengan cara maserasi. Metode maserasi memiliki kekurangan utama yakni waktu ekstraksi yang diperlukan sangat lama (Maleta *et al.* 2018). Menurut Demisi *et al.* (2019) proses ekstraksi untuk mendapatkan hasil maksimum dapat dipercepat dengan cara meningkatkan suhu ekstraksi. Hal ini diperkuat oleh Soehendro *et al.* (2015) yang melaporkan bahwa peningkatan suhu ekstraksi (45 ke 75 °C) mampu meningkatkan aktivitas antioksidan (68,08±1,29 ke 80,90±0,86). Menurut Husainah (2020) suhu ekstraksi sebaiknya tidak jauh berbeda dengan titik didih pelarut. Berdasarkan hal tersebut maka pada penelitian ini digunakan variasi suhu 55, 65, dan tertinggi yakni 75 °C.

Beberapa penelitian mengenai aktivitas antioksidan pada variasi suhu ekstraksi telah dilakukan sebelumnya di antaranya pada ekstraksi biji melinjo (Soehendro *et al.* 2015), empulur batang sagu baruk *Arenga microcarpha* B. (Landjang *et al.* 2017), dan jahe merah *Zingiber officinale* var. *Rubrum* (Ibrahim *et al.* 2015). Penelitian mengenai

variasi suhu ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak metanol *E. spinosum* belum dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan *E. spinosum* yang diekstraksi menggunakan metanol dengan suhu 55, 65, dan 75 °C.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan utama yang dipakai pada penelitian ini antara lain rumput laut *E. spinosum* basah, metanol (Merck, AS), etanol (Merck, AS), reagen *follin ciocalteau*, kuersetin, AlCl₃, *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) (Merck, AS), dan *2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine* (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Jerman). Peralatan yang digunakan antara lain oven (*Drying Oven* 68-DYO200, Esco, Singapura), *blender* (Miyako BL101PL, Miyako, Indonesia), *miller* (Fomac FCT-Z300, PT Toko Mesin Toksindo, Indonesia), vorteks (*Barnstead Thermolyne* Tipe 37600 MixEr, AS), *centrifuge* (Tipe H-26F Kokusan Corporation, Jepang), *hot plate stirrer* (F20500011 Velp AREC Heating Stirrer, Italia), dan spektrofotometer UV-Vis (Perkinlemer Lambda 25, AS).

Preparasi sampel

Sampel *E. spinosum* diambil dari Desa Batumulapan, Kecamatan Nusa Penida, Kabupaten Klungkung, Provinsi Bali pada bulan Januari 2020. Sampel diambil pada pukul 10.00 WITA di kedalaman 20 cm dari surut terendah. Sampel yang telah diambil kemudian dimasukkan ke dalam plastik gelap dan stirofoam yang telah diberi es batu untuk selanjutnya dibawa ke laboratorium. Sampai di laboratorium, sampel dibilas memakai air tawar sampai bersih, lalu dimasukkan ke dalam *freezer* selanjutnya dikeringkan. Preparasi sampel kering berpedoman pada penelitian yang dilaksanakan oleh Ling *et al.* (2015). Rumput laut segar dicuci dengan air tawar kemudian pelepas (*holdfast*) dan epifit yang terlihat dihilangkan. Sampel segar kemudian dikeringkan memakai oven (suhu 40 °C, 24 jam) sehingga didapatkan sampel rumput laut kering. Rumput laut kering selanjutnya digiling memakai *blender* dan *miller* kemudian diayak memakai ayakan 40 mesh untuk mendapatkan ukuran yang

seragam. Sampel dalam bentuk bubuk ditempatkan dalam wadah kedap udara dan ditempatkan dalam *freezer* hingga dilakukan analisis lebih lanjut.

Ekstraksi *E. spinosum*

Ekstraksi *E. spinosum* dilakukan mengacu Ling *et al.* (2015) dengan beberapa modifikasi. Bubuk *E. spinosum* sebanyak 5 g ditambah 50 mL metanol 80 % (1:10, w/v). Sampel dimaserasi selama 3 jam dengan perlakuan suhu yakni 55, 65, dan 75 °C pada *hot plate stirrer* dengan kecepatan 200 rpm. Campuran kemudian disentrifugasi pada 1400 rpm selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan didekantasi ke dalam botol dan residu diekstraksi kembali. Supernatan digabungkan dan selanjutnya digunakan untuk perhitungan rendemen, uji fitokimia, total fenolik, total flavonoid, dan uji daya antioksidan.

Perhitungan rendemen

Rendemen diperoleh dengan cara melakukan perbandingan berat ekstrak *E. spinosum* yang dihasilkan dengan berat bubuk rumput laut sebelum ekstraksi yang digunakan. Perhitungan rendemen mengacu pada Kurniawati *et al.* (2016) dengan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat kering}} \times 100\%$$

Analisis total fenolik

Analisis total fenolik mengacu pada metode yang digunakan oleh Ahmad *et al.* (2015) dengan beberapa modifikasi. Langkah uji yang dilakukan adalah sebagai berikut: 1) Pereaksi Na_2CO_3 7% dibuat dengan menimbang 3,5 g Na_2CO_3 , lalu dilarutkan memakai *aquabides* sampai mencapai volume 50 mL. 2) Larutan standar asam galat disiapkan dengan cara menimbang 10 mg asam galat kemudian dilarutkan memakai metanol sampai mencapai volume 10 mL sampai mencapai volume 25 mL dan diperoleh larutan dengan kadar 100 ppm. Selanjutnya larutan tersebut diambil sebanyak 0,2; 0,4; 0,6; 0,8, dan 1 mL, selanjutnya diberi metanol sampai volume mencapai 10 mL sehingga didapatkan larutan masing-masing dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. 3) Larutan standar asam galat ditera dengan

cara masing-masing konsentrasi tersebut ditambah reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 0,4 mL, kemudian dikocok lalu didiamkan 4-8 menit. Setelah didiamkan, berikutnya ditambah 0,4 mL Na_2CO_3 7%, lalu dikocok sampai homogen. Selanjutnya dilakukan penambahan *aquabides* sampai volume mencapai 10 mL dan ditempatkan pada suhu ruang selama 30 menit, lalu diukur absorbansi pada panjang gelombang 744,8 nm. Kurva kalibrasi dibuat dengan cara membuat korelasi antara absorbansi dan konsentrasi asam galat ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Pengukuran total fenolik ekstrak *E. spinosum* dilakukan dengan cara larutan ekstrak diambil sebanyak 0,1 mL lalu ditambah reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 0,4 mL, kemudian dikocok lalu didiamkan 4-8 menit. Berikutnya ditambah 0,4 mL Na_2CO_3 7%, lalu dikocok hingga homogen. Selanjutnya *aquabides* ditambahkan hingga volume mencapai 10 mL lalu dibiarkan pada suhu ruang selama 30 menit. Langkah berikutnya dilakukan pengukuran serapan pada panjang gelombang 74,8 nm. Kadar total fenolik yang terkandung dalam ekstrak dinyatakan dalam ekuivalen asam galat (*Galic Acid Equivalent*). Perhitungan total fenolik mengacu metode Wan-Ibrahim *et al.* (2010) dengan rumus:

$$\text{Total fenolik GAE} = \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ GAE}\right) = c \cdot \left(\frac{v}{m}\right)$$

Keterangan:

c: kadar total fenolik dari kurva standar (mg/L)

v: banyaknya ekstrak yang digunakan (L)

m: berat ekstrak (g)

Analisis total flavonoid

Pengujian total flavonoid merujuk pada metode yang digunakan oleh Ahmad *et al.* (2015) dengan sedikit modifikasi yakni: 1) Larutan standar kuersetin dibuat dengan menimbang 10 mg kuersetin, kemudian diencerkan menggunakan 10 mL metanol sehingga menghasilkan larutan 1.000 ppm. Larutan tersebut diambil sebanyak 1 mL lalu diencerkan menggunakan 10 mL metanol sehingga menjadi larutan 100 ppm. Dari larutan 100 ppm selanjutnya dibuat seri konsentrasi yakni 10, 20, 30, 40, 50 ppm. Larutan standar tersebut selanjutnya ditambah metanol sebanyak 3 mL, kalium asetat 1 M

sebanyak 0,2 mL, AlCl_3 10% sebanyak 0,2 mL, lalu diberi *aquabides* hingga volume menjadi 10 mL. Selanjutnya disimpan pada suhu ruang dengan waktu 30 menit. Serapan dimonitor memakai spektrofotometer UV-Vis menggunakan panjang gelombang 431 nm.

Pengukuran total flavonoid dilakukan dengan cara larutan ekstrak diambil sebanyak 0,1 mL kemudian ditambah metanol sebanyak 3 mL, kalium asetat sebanyak 0,2 mL, AlCl_3 10% sebanyak 0,2 mL, dan ditambahkan *aquabides* hingga volume menjadi 10 mL. Selanjutnya larutan disimpan pada ruang kedap cahaya selama 30 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada jarak gelombang 431 nm. Kadar flavonoid sampel dinyatakan dalam bentuk ekuivalen kuersetin (*Quercetin Equivalent*). Perhitungan total flavonoid mengacu pada metode Syafitri *et al.* (2014) dengan rumus:

$$\text{Total flavonoid QE} = c \cdot \left(\frac{v}{m}\right)$$

Keterangan:

c: kadar flavonoid dari kurva standar (mg/L)

v: isi ekstrak (L)

m: berat ekstrak (g)

Penapisan fitokimia

Analisis fitokimia dilaksanakan dalam rangka menyelidiki zat metabolit sekunder yang ada pada rumput laut *E. spinosum*. Pengujian senyawa fitokimia merujuk pada studi yang dilakukan oleh Santi *et al.* (2008) dengan beberapa modifikasi, meliputi uji steroid, triterpenoid, dan tanin. Uji steroid dan triterpenoid dilaksanakan dengan langkah sebagai berikut: 1) Sampel yang telah diekstraksi diambil sebanyak 2 mL lalu diberi 3 mL asam asetat anhidrat, kemudian didiamkan dalam waktu 15 menit. 2) Sebanyak enam tetes larutan tersebut diteteskan ke dalam tabung reaksi lalu diberi 2-3 tetes asam sulfat pekat. Keberadaan senyawa steroid diindikasikan dengan terbentuknya warna biru, sedang senyawa triterpenoid diindikasikan dengan adanya warna merah jingga atau ungu. Langkah-langkah uji tanin yaitu: 1) Sebanyak 2 mL sampel yang telah diekstraksi diambil kemudian diberi etanol sampai ekstrak terendam. 2) Selanjutnya sebanyak 1 mL larutan dimasukkan ke dalam

tabung reaksi lalu diberi FeCl_3 1% sebanyak 2-3 tetes. Adanya senyawa tanin diindikasikan adanya warna hitam kebiruan atau hijau.

Aktivitas Antioksidan Metode *Radical Scavenging Activity* (RSA) DPPH

Analisis aksi antioksidan menggunakan metode DPPH mengacu pada Virsa *et al.* (2014). Larutan DPPH dengan konsentrasi 50 ppm disiapkan dengan menimbang 5 mg DPPH lalu dilarutkan menggunakan metanol sebanyak 100 mL dalam labu takar. Selanjutnya dibuat larutan sampel 1.000 ppm dan seri konsentrasi yakni 10, 50, 100, 150, dan 200 ppm. Larutan stok standar 100 ppm disiapkan dengan menimbang 1 mg kuersetin lalu diencerkan menggunakan metanol sampai volume 10 mL. Seri konsentrasi larutan yang dibuat yakni 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm.

Pengukuran aksi antioksidan blanko dilaksanakan dengan cara mengambil larutan DPPH sebanyak 4 mL, di-*vortex* lalu disimpan pada tempat gelap dengan suhu 37 °C. Pengukuran absorbansi dilakukan memakai panjang gelombang 517 nm. Pengukuran aksi antioksidan ekstrak *E. spinosum* dilaksanakan melalui cara larutan sampel dari masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 0,5 mL, lalu diberi 3,5 mL DPPH. Larutan di-*vortex* dan disimpan dalam ruang gelap dengan suhu 37 °C. Absorbansi ditera menggunakan panjang gelombang 517 nm. Penentuan aksi antioksidan larutan standar dilaksanakan dengan mengambil kuersetin sebanyak 0,5 mL untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian diberi 3,5 mL larutan DPPH. Larutan di-*vortex*, kemudian disimpan pada ruangan gelap dengan suhu 37 °C. Absorbansi ditera memakai panjang gelombang 517 nm. Perhitungan aksi penghambatan (%) dilakukan memakai rumus:

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Selanjutnya dilakukan perhitungan IC_{50} dengan mengacu pada Dewi *et al.* (2018). Besarnya IC_{50} dihitung dengan membuat kurva hubungan antara konsentrasi sampel dan % penghambatan antioksidan.

Aktivitas Antioksidan dengan Metode Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Analisis antioksidan dengan metode FRAP dalam penelitian ini merujuk pada penelitian Selawa *et al.* (2013) melalui tahapan sebagai berikut: 1) Disiapkan larutan bufer asetat dengan pH 3,6 dengan cara menimbang natrium asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) sebanyak 0,775 g lalu ditambahkan 4 mL asam asetat pekat kemudian diencerkan memakai akuades dalam labu takar sampai volume mencapai 250 mL. 2) Pembuatan larutan 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) dengan konsentrasi 10 mmol/mL dilakukan dengan cara 0,15 g TPTZ diencerkan dalam 40 mmol/L HCl sampai volume mencapai 50 mL. Larutan 40 mmol/L HCl disiapkan dengan cara mengencerkan HCl pekat sebanyak 0,828 mL dalam akuades sebanyak 250 mL. 3) Pembuatan larutan 20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan cara $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ditimbang dengan jumlah 0,54 g kemudian dilarutkan menggunakan akuades dalam labu takar sampai volume mencapai 100 mL. 4) Pembuatan reagen FRAP dilakukan dengan cara mencampurkan bufer asetat sebanyak 25 mL, larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 2,5 mL, dan larutan TPTZ sebanyak 2,5 mL dalam labu takar kemudian diberi akuades sampai volume mencapai 100 mL. 5) Pembuatan larutan larutan stock $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 10.000 $\mu\text{mol/L}$, dilakukan dengan cara 2,78 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan menggunakan 1.000 mL akuades. Kemudian diambil 100 mL larutan stock $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 10.000 $\mu\text{mol/L}$ lalu diencerkan sampai 1.000 mL untuk mendapat $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 1.000 $\mu\text{mol/L}$. Selanjutnya larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 1.000 $\mu\text{mol/L}$ diambil masing-masing sebanyak 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; dan 0,5 mL lalu dimasukkan ke dalam labu ukur berbeda lalu ditambah akuades 100 mL, sehingga terbentuk larutan standar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi berturut-turut 1, 2, 3, 4, dan 5 $\mu\text{mol/L}$. 5) Peneraan panjang gelombang maksimum didapat dari peneraan serapan dari standar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pada konsentrasi paling besar (1.000 $\mu\text{mol/L}$). Larutan standar tersebut selanjutnya diambil 1 mL lalu diberi reagen FRAP sebanyak 3 mL dan

ditera pada setiap panjang gelombang antara 588-598 nm memakai spektrofotometer UV-Vis. 6) Absorbansi sampel diukur dengan cara larutan ekstrak *E. spinosum* diambil 0,1 mL lalu diberi 3 mL reagen FRAP dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Berikutnya larutan diukur serapannya memakai spektrofotometer menggunakan panjang gelombang 596 nm.

Analisis Data

Analisis data penelitian dilaksanakan menggunakan IBM SPSS versi 19. Langkah pertama yang dilakukan yakni uji normalitas menggunakan Kolmogorov-Smirnov. Selanjutnya dilaksanakan uji homogenitas memakai Levene's *test*. Data penelitian dapat dikatakan berdistribusi normal dan homogen dengan syarat $p > 0,05$. Setelah mengetahui bentuk distribusi data, selanjutnya dilakukan uji beda nyata antar data. Uji data parametrik menggunakan uji Duncan, dan uji data non-parametrik memakai Kruskal-Wallis. Apabila pada uji Kruskal-Wallis terdapat beda nyata antar data maka diteruskan dengan uji Mann Whitney.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen, Total Fenolik, dan Total Flavonoid

Data pengaruh suhu ekstraksi pada rendemen, total fenolik, dan total flavonoid dapat dilihat pada *Table 1*. Rendemen ekstrak *E. spinosum* yang diekstraksi dengan metanol 80% pada suhu 55, 65, dan 75 °C berturut-turut yakni $3,46 \pm 0,39$; $3,29 \pm 0,14$ %; dan $2,94 \pm 0,02$ %. Hasil analisis menunjukkan bahwa suhu ekstraksi tidak memengaruhi ($p > 0,05$) rendemen ekstrak. Rendemen *E. spinosum* yang diekstraksi menggunakan variasi suhu jauh berbeda dengan rendemen *E. spinosum* yang diekstraksi pada suhu ruang selama 24 jam (12,44%) yang dilakukan Sari *et al.* (2015). Menurut Kawiji *et al.* (2015) suhu ekstraksi yang tinggi mampu mempercepat proses reaksi tetapi hal ini juga dapat mengakibatkan sebagian pelarut menguap, dengan demikian jumlah pelarut menjadi berkurang dan tidak cukup untuk mengekstrak bahan.

Total fenolik ekstrak metanol *E. spinosum* yang diekstraksi dengan suhu berbeda dapat dilihat pada *Table 1*. Total fenolik ekstrak

Table 1 Effect of extraction temperature on yield, total phenol, and total flavonoids of *E. spinosum* total methanolic extract

Extraction temperature	Yield (%)	Total phenolic (mg GAE/g extract)	Total flavonoids (mg QE/g extract)
55 °C	3.46±0.39 ^a	170.02±15.37 ^a	789.21±17.25 ^a
65 °C	3.29±0.14 ^a	158.30±17.16 ^a	587.43±10.63 ^a
75 °C	2.94±0.02 ^a	95.71±8.35 ^b	403.50±49.09 ^a

Note: ^asame letter in the same column indicate no significant difference ($p > 0.05$)

E. spinosum yang diekstrak dengan suhu 55, 65, dan 75 °C adalah 170,02±15,37; 158,30±17,16; dan 95,71±8,35 mg GAE/g. Perbedaan suhu ekstraksi berpengaruh nyata pada total fenolik ($p < 0,05$). Total fenolik ekstrak *E. spinosum* yang diekstraksi pada suhu 55 dan 65 °C berbeda nyata dengan 75 °C. Total fenolik ekstrak *E. spinosum* mengalami penurunan yang signifikan pada suhu 75 °C. Hal ini dapat disebabkan karena fenol dapat mengalami kerusakan struktur akibat suhu ekstraksi yang tinggi (Hwang dan Thi 2014). Fenolik merupakan senyawa termosensitif sehingga memungkinkan terjadinya hidrolisis dan pengurangan kadar fenol pada suhu tinggi (Wenjuan *et al.* 2010). Faktor lain yang dapat memengaruhi kandungan total fenolik yakni waktu ekstraksi. Sari *et al.* (2013) menyatakan bahwa waktu ekstraksi juga dapat memengaruhi kadar fenolik karena waktu ekstraksi yang terlalu lama dapat meningkatkan peluang adanya reaksi oksidasi senyawa fenolik akibat paparan oksigen yang semakin lama dapat menurunkan jumlah total fenolik terekstrak.

Data pengaruh suhu ekstraksi terhadap kadar total flavonoid ekstrak *E. spinosum* terdapat pada *Table 1*. Kadar total flavonoid ekstrak *E. spinosum* yang diekstrak dengan suhu 55, 65, dan 75 °C masing-masing adalah 789,21±17,25; 587,43±10,63; dan 403,50±49,09 mg QE/g. Total flavonoid mengalami penurunan dengan meningkatnya suhu ekstraksi yang digunakan. Akan tetapi perubahan tersebut tidak menunjukkan pengaruh secara nyata pada total flavonoid ($p > 0,05$). Total flavonoid pada suatu ekstrak dapat semakin menurun kadarnya seiring dengan meningkatnya suhu ekstraksi, hal ini dapat terjadi karena flavonoid mudah rusak pada suhu tinggi (Sa'adah *et al.* 2017).

Turunnya total senyawa flavonoid seiring dengan meningkatnya suhu juga bisa terjadi karena suhu tinggi dapat merusak struktur sel bahan sehingga komponen yang ada mudah bermigrasi dan menjadi mudah rusak oleh bermacam reaksi kimia yang mengikutkan cahaya maupun oksigen (Zainol *et al.* 2009).

Penapisan Fitokimia

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia ekstrak *E. spinosum* yang diekstraksi menggunakan suhu berbeda menunjukkan bahwa *E. spinosum* mengandung senyawa triterpenoid, namun tidak terdeteksi adanya steroid dan tanin. Hasil positif adanya senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga. Terbentuknya warna jingga terjadi karena triterpenoid mampu membentuk warna apabila direaksikan dengan H₂SO₄ pekat (Yanuarti *et al.* 2017). Hasil penapisan fitokimia *E. spinosum* bersesuaian dengan hasil penelitian yang dilaksanakan Sari *et al.* (2015). Jenis triterpenoid yang terdapat pada *E. spinosum* adalah golongan triterpenoid asam karboksilat (Ahmad dan Nasrum 2013).

Aktivitas Antioksidan RSA DPPH

Pengaruh suhu ekstraksi *E. spinosum* terhadap aktivitas antioksidan DPPH (IC₅₀) terdapat pada *Table 2*. Aktivitas antioksidan DPPH yang dinyatakan dalam IC₅₀ untuk ekstrak *E. spinosum* yang diekstraksi dengan suhu 55, 65, dan 75 °C secara berturut-turut adalah 362,52±7,10; 417,77±18,72; dan 437,03±35,03 ppm. Hasil analisis data menunjukkan perbedaan suhu ekstraksi berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas antioksidan ekstrak *E. spinosum* suhu 55 °C dan suhu 75 °C ($p < 0,05$).

Table 2 Effect of extraction temperature on antioxidant acitivity (DPPH & FRAP) of *E. spinosum* methanolic extract

Extraction temperature	Antioxidant activity	
	DPPH (IC ₅₀ , ppm)	FRAP (μM/g)
55 °C	362.52±07.10 ^b	70.30±10.01 ^b
65 °C	417.77±18.72 ^{bc}	78.44±03.66 ^{bc}
75 °C	437.03±35.03 ^c	95.04±13.62 ^c
Quercetin	14.77±00.42 ^a	51.90±01.83 ^a

Note: *same letter in the same column indicate no significant difference ($p > 0.05$)

Berdasarkan nilai IC₅₀, *E. spinosum* yang diekstrak pada suhu 55 °C lebih kecil dibanding suhu 75 °C. Hasil tersebut menunjukkan peningkatan suhu ekstraksi dari 55 °C menjadi 75 °C menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan (Dewi *et al.* 2018). Perubahan nilai IC₅₀ ini dapat disebabkan karena berkurangnya senyawa yang dapat berperan sebagai antioksidan karena pengaruh suhu tinggi. Menurut Hwang dan Thi (2014), penggunaan ekstraksi dengan suhu yang terlalu tinggi dapat berpengaruh pada kerusakan senyawa bioaktif seperti senyawa fenolik sehingga dapat menurunkan aktivitas penghambatan radikal bebas.

Aktivitas antioksidan DPPH *E. spinosum* yang diekstrak dengan suhu 55 °C lebih tinggi dibanding dengan *E. spinosum* yang dimaserasi oleh Sari *et al.* (2015) memakai etanol 70 % dengan waktu 24 jam pada suhu ruang (IC₅₀ 472,14 ppm). Dengan demikian peningkatan suhu ekstraksi hingga 55 °C memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada ekstraksi pada suhu ruang. Penurunan aktivitas antioksidan ini berbanding lurus dengan penurunan total fenolik. Lalu lanjut menurut Soehendro *et al.* (2015), ekstraksi dengan suhu tinggi dapat meningkatkan kelarutan fenol akibat rusaknya struktur sel bahan. Hal ini mungkin yang menyebabkan ekstrak *E. spinosum* dengan suhu tinggi mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih besar. Menurut Sari *et al.* (2013) peningkatan kadar fenol dapat terjadi hingga mencapai suhu tertentu namun ketika suhu optimum sudah tercapai maka dapat menyebabkan penurunan kadar total fenolik yang disebabkan oleh terdekomposisinya senyawa fenolik oleh suhu yang terlalu tinggi. Pada penelitian ini suhu optimum untuk ekstraksi *E. spinosum* adalah

55 °C karena aktivitas antioksidannya lebih besar apabila dibandingkan dengan ekstrak *E. spinosum* suhu 75 °C.

Aktivitas Antioksidan Metode FRAP

Pengaruh suhu ekstraksi *E. spinosum* terhadap nilai FRAP terdapat pada Table 2. Nilai FRAP *E. spinosum* yang diekstraksi pada suhu 55, 65, dan 75 °C secara berturut-turut yakni 70,30±10,01; 78,44±3,66; dan 95,04±13,62 μM ekuivalen Fe(II)/g. Analisis statistik mengindikasikan bahwa adanya perbedaan suhu ekstraksi berpengaruh yang nyata terhadap nilai FRAP ($p < 0,05$). Nilai FRAP *E. spinosum* yang diekstraksi dengan suhu 55 °C lebih kecil dan mempunyai perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) apabila dibandingkan dengan suhu 75 °C. Hal ini menandakan kemampuan mereduksi pada ekstrak *E. spinosum* yang diekstraksi dengan suhu 55 °C lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak suhu 75 °C.

Nilai FRAP ekstrak *E. spinosum* cenderung bertambah bersamaan dengan semakin tingginya suhu ekstraksi. Hal ini mengindikasikan semakin tinggi suhu ekstraksi yang dipakai maka kemampuan ekstrak untuk mereduksi Fe³⁺ menjadi Fe²⁺ semakin berkurang. Metode FRAP adalah salah satu metode penentuan kandungan antioksidan secara spektrofotometri yang berdasarkan pada reduksi analog ferroin, kompleks Fe³⁺ dari tripiridiltriazin Fe(TPTZ)³⁺ menjadi kompleks Fe²⁺, Fe(TPTZ)²⁺ yang berwarna biru intensif oleh antioksidan pada suasana asam (Yefrida *et al.* 2015). Menurut Neoh *et al.* (2016) kemampuan mereduksi dari rumput laut sebagian besar berkaitan dengan kandungan fenoliknya. Hal ini seiring dengan data total fenolik (Table 1) cenderung

menurun dengan meningkatnya suhu ekstraksi sehingga kemampuan mereduksi juga menurun seiring dengan bertambahnya suhu ekstraksi. Ekstrak *E. spinosum* yang diekstrak dengan berbagai suhu yang berbeda memiliki aktivitas antioksidan DPPH cenderung sama jika dibandingkan dengan metode FRAP. Kecenderungan seperti ini juga terjadi pada dua spesies rumput laut merah, *Amansia multifida* dan *Meristiella echinocarpa*, dari pantai Timur laut Brazil (De-Alencar *et al.* 2014).

Hasil FRAP standar kuersetin memiliki nilai lebih kecil jika dibandingkan dengan nilai FRAP ekstrak *E. spinosum* pada suhu 55 °C, hal ini menandakan kemampuan mereduksi dari kuersetin lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak *E. spinosum* pada suhu 55 °C. Kuersetin merupakan salah satu jenis antioksidan alami dan banyak ditemukan pada hampir setiap jenis tanaman yang mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat sehingga kemampuannya untuk mereduksi juga tinggi (Jusuf 2010)

KESIMPULAN

Aktivitas antioksidan ekstrak *E. spinosum* menurun seiring dengan meningkatnya suhu ekstraksi. Suhu ekstraksi 55 °C mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih besar apabila dikomparasikan dengan suhu 65 °C dan 75 °C. Antioksidan ekstrak *E. spinosum* berbanding lurus dengan hasil total fenolik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini telah didanai melalui skema Hibah Penelitian Kolaborasi Dosen dan Mahasiswa Fakultas Pertanian UGM tahun 2020 dengan nomor kontrak 1508/PN/PT/2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad AR, Juwita, Ratulangi SAD, Malik A. 2015. Penetapan kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak metanol buah dan daun patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.SM). *Pharmaceutical Sciences and Research*. 2(1): 1-10.
- Ahmad A, Nasrum M. 2013. Inhibitive enhancement of isoniasid treatment on *Mycobacterium tuberculosis* through triterpenoid carbocyclic acid from red algae *Euclima spinosum*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 4(2): B231-B237.
- Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. 2017. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*. 6 (42): 1-23.
- De-Alencar DB, Da-Silva SR, Pires-Cavalcante KMS, De-Lima RL, Pereira-Junior FN, De-Sousa MB, Viana FA, Nagano CS, Do-Nascimento KS, Cavada BS, Sampaio AH, Saker-Samaio S. 2014. Antioxidant potential and cytotoxic activity of two red seaweed species, *Amansia multifida* and *Meristiella echinocarpa*, from the coast of Northeastern Brazil. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 86(1): 251-263.
- Demi RP, Ruslan, Rahim EA, Ys H. 2019. Ekstraksi pektin pada kulit buah kluwih (*Artocarpus camansi* Blanco) pada berbagai suhu dan konsentrasi asam sitrat. *Kovalen: Jurnal Riset Kimia*. 5(1): 100-108.
- Dewi SR, Ulya N, Argo BD. 2018. Kandungan flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak *Pleurotus ostreatus*. *Rona Teknik Pertanian*. 11(1): 1-11.
- Dolorosa MT, Nurjanah, Purwaningsih S, Anwar E, Hidayat T. 2017. Kandungan senyawa bioaktif bubuk rumput laut *Sargassum plagyophyllum* dan *Euclima cottonii* sebagai bahan baku krim pencerah kulit. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(3): 633-644.
- Fathmawati D, Abidin MRP, Roesyadi A. 2014. Studi kinetika pembentukan karaginan dari rumput laut. *Jurnal Teknik Pomits*. 3(1): 27-32.
- Hanapi A, Fasya AG, Mardiyah U, Miftahurrahmah. 2013. Aktivitas antioksidan dan antibakteri ekstrak metanol alga merah *Euclima spinosum* dari perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Alchemy*. 2(2): 126-137.
- Husainah NU. 2020. Variasi suhu dan jenis pelarut pada ekstraksi daun tembakau

- kasturi inferior sebagai senyawa antibakteri. [Skripsi]. Jember (ID): Universitas Jember.
- Hwang ES, Thi ND. 2014. Effects of extraction and processing methods on antioxidant compound contents and radical scavenging activities of laver (*Porphyra tenera*). *Preventive Nutrition and Food Science*. 19(1): 40-48.
- Ibrahim AM, Yuniantha, Sriherfyna FH. 2015. Pengaruh suhu dan lama waktu ekstraksi terhadap sifat kimia dan fisik pada pembuatan minuman sari jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) dengan kombinasi penambahan madu sebagai pemanis. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(2): 530-541.
- Jusuf E. 2010. Kandungan kuersetin dan pola proteomik varietas jambu batu (*Psidium guajava* L.) tumbuh liar di kawasan Cibinong, Bogor. *Berita Biologi*. 10(3): 401-415.
- Kawiji, Khasanah LU, Utami R, Aryani NT. 2015. Ekstraksi maserasi oleoresin daun jeruk purut (*Citrus hystrix* DC): optimasi rendemen dan pengujian karakteristik mutu. *Agritech*. 35(2): 178-184.
- Landjang EY, Momuat LI, Suryanto E. 2017. Efek pemanasan terhadap aktivitas antioksidan ekstrak empelur batang sagu baruk (*Arenga microcarpha* B.). *Chemistry Progress*. 10(1): 8-14.
- Ling ALL, Yasir S, Matanjun P, Bakar MFA. 2015. Effect of different drying techniques on the phytochemical content and antioxidant activity of *Kappaphycus alvarezii*. *Journal of Applied Phycology*. 27: 1717-1723.
- Maleta HS, Indrawati R, Limantara L, Brotosudarmo THP. 2018. Ragam metode ekstraksi karotenoid dari sumber tumbuhan dalam dekade terakhir (telaah literatur). *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan*. 13(1): 40-50.
- Neoh YY, Matanjun P, Lee JS. 2016. Comparative study of drying methods on chemical constituents of Malaysian red seaweed. *Drying Technology*. 34(14): 1745-1751.
- Nurjanah, Nurilmala M, Anwar E, Luthfiyana N, Hidayat, T 2017. Identification of bioactive compounds of seaweed *Sargassum* sp and *E. cottonii* as raw material sunscreen cream. *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences*. 54(4): 311-318.
- Podungge A, Damongilala LJ, Mewengkang HW. 2018. Kandungan antioksidan pada rumput laut *Euclima spinosum* yang diekstrak dengan metanol dan etanol. *Jurnal Media Teknologi Hasil Perikanan*. 6(1): 197-201.
- Sa'adah H, Nurhasnawati H. 2017. Perbandingan pelarut etanol dan air pada pembuatan ekstrak umbi bawang tiwai (*Eleutherine americana* Merr) menggunakan metode maserasi. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 1(2): 149-153.
- Sangi M, Runtuwene MRJ, Simbala HEI, Makang VMA. 2008. Analisis fitokimia tumbuhan obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chemistry Progress*. 1(1): 47-53.
- Santoso L, Nugraha YT. 2008. Pengendalian penyakit ice-ice untuk meningkatkan produksirumput laut Indonesia. *Jurnal Saintek Perikanan*. 3(2): 37-43.
- Sari BL, Susanti N, Sutanto. 2015. Skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan fraksi etanol alga merah *Euclima spinosum*. *Pharmaceutical Sciences and Research*. 2(2): 59-67.
- Selawa W, Runtuwene MRJ, Citraningtyas G. 2013. Kandungan flavonoid dan kapasitas antioksidan total ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis.). *Pharmacon*. 2(1): 18-23.
- Setzer WN. 2008. Non-intercalative triterpenoid inhibitors of topoisomerase II: a molecular docking study. *The Open Bioactive Compounds Journal*. 1: 13-17.
- Soehendro AW, Manuhara GJ, Nurhartadi E. 2015. Pengaruh suhu terhadap aktivitas antioksidan dan antimikrobia ekstrak biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dengan pelarut etanol dan air. *Jurnal Teknosains Pangan*. 4(4): 15-24.
- Syafitri NE, Bintang M, Falah S. 2014. Kandungan fitokimia, total fenol, dan total flavonoid ekstrak buah harendong (*Melastoma affine* D. Don). *Current Biochemistry*. 1(3): 105-115.
- Virsa H, Ahmad AR, Sudir M. 2014. Uji

- aktivitas antioksidan ekstrak metanol bunga dan daun patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.Sm) menggunakan metode DPPH. *Pharmaceutical Sciences and Research*. 1(2): 86-93.
- Wan-Ibrahim WI, Sidik K, Kuppusamy UR. 2010. A high antioxidant level in edibleplants is associated with genotoxic properties. *Food Chemistry*. 122: 1139-1144.
- Wenjuan Q, Pan Z, Ma H. 2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering*. 99(1): 16–23.
- Yanuarti R, Nurjanah, Anwar E, Hidayat T. 2017. Profil fenolik dan aktivitas antioksidan dari ekstrak rumput laut *Turbinaria conoides* dan *Eucheuma cottonii*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 230-237.
- Yefrida, Ashikin N, Refilda. 2015. Validasi metoda FRAP modifikasi pada penentuan kandungan antioksidan total dalam sampel mangga dan rambutan. *Jurnal Riset Kimia*. 8(2): 170-175.
- Zainol MKM, Abdul-Hamid A, Abu-Bakar F, Pak-Dek S. 2009. Effect of different drying methods on the degradation of selected flavonoids in *Centella asiatica*. *International Food Research Journal*. 16: 531-537.