

Artikel Penelitian

Optimasi Ekstraksi Berbantu Gelombang Ultrasonik pada Biji Melinjo Kerikil (*Gnetum gnemon* L., 'Kerikil') Menggunakan *Response Surface Methodology*

*Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction of "Melinjo Kerikil" (*Gnetum gnemon* L. 'Kerikil') Seeds using Response Surface Methodology*

Bambang Kunarto^{1,2}, Sutardi², Supriyanto², Chairil Anwar³

¹Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Semarang, Semarang

²Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

* Korespondensi dengan penulis (bambangkun@usm.ac.id)

Artikel ini dikirim pada tanggal 13 Juni 2019 dan dinyatakan diterima tanggal 11 Agustus 2019. Artikel ini juga dipublikasi secara online melalui <https://ejournal2.undip.ac.id/index.php/jatp>. Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang diperbanyak untuk tujuan komersial.

Diproduksi oleh Indonesian Food Technologists® ©2019

Abstrak

Biji melinjo kerikil mengandung senyawa fenolik dan resveratrol sehingga berpotensi sebagai antioksidan, oleh karena itu perlu dilakukan ekstraksi. Metoda ekstraksi konvensional (macerasi, perebusan, *refluxing*) mempunyai kelemahan yaitu terjadinya kerusakan senyawa fenolik akibat reaksi oksidasi, hidrolisis dan ionisasi selama proses ekstraksi. Oleh karena itu, pada penelitian ini, ekstraksi biji melinjo kerikil dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik untuk mencegah adanya kerusakan. Penelitian ini bertujuan untuk optimasi ekstraksi biji melinjo kerikil berbantu gelombang ultrasonik yang dilakukan pada berbagai waktu ekstraksi, suhu ekstraksi dan konsentrasi pelarut etanol. *Surface response methodology* digunakan untuk optimasi kondisi ekstraksi. Biji melinjo kerikil diekstrak menggunakan *ultrasonic bath* pada frekuensi 40 kHz dengan berbagai suhu (25, 30, 35, 40, 45°C), waktu ekstraksi (10, 20, 30, 40, 50 menit), dan konsentrasi pelarut etanol (40, 50, 60, 70 80%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum ekstraksi biji melinjo kerikil berbantu gelombang ultrasonik adalah pada suhu 30,18°C, waktu 33,01 menit dan konsentrasi pelarut etanol 71,04%. Pada kondisi ini, diperoleh *yield* ekstrak 18,41±0,01%, total fenolik 11,26±0,06 mg GAE/g, total flavonoid 533,70±0,18 mg CE/100 g, resveratrol 7,64±0,03%, IC₅₀ sebesar 59,52±0,04 ppm dan *reducing power* 76,31±0,08%. Sebagai kesimpulan, optimasi ekstraksi biji melinjo kerikil berbantu gelombang ultrasonik dapat ditentukan berdasarkan pada suhu, waktu ekstraksi, dan konsentrasi pelarut dengan menggunakan *response surface methodology*.

Kata kunci: melinjo, ultrasonik, suhu ekstraksi, lama waktu ekstraksi, konsentrasi etanol

Abstract

"Melinjo kerikil" seeds contain phenolic and resveratrol compounds so that it has the potential as an antioxidant, therefore extraction needs to be done. Conventional extraction methods (maceration, boiling, refluxing) have the disadvantage of devastating phenolic compounds due to oxidation, hydrolysis and ionization reactions during the extraction process. Therefore, the extraction of melinjo kerikil seeds was done using the ultrasonic-assisted extraction method to minimize the disadvantage. The study aims to optimize ultrasonic-assisted extraction of melinjo kerikil seeds that was done at various extraction temperatures and extraction duration, and ethanol concentrations. Response surface methodology was used to optimize experimental condition for extraction. Melinjo kerikil seeds were extracted using ultrasonic bath at a frequency of 40 kHz with various temperatures (25, 30, 35, 40, 45°C), extraction duration (10, 20, 30, 40, 50 minutes), and ethanol solvents concentrations (40, 50, 60, 70 80 %). The results showed that the optimum conditions for ultrasonic-assisted extraction of melinjo kerikil seeds were at 30.18°C for 33.01 minutes using 71.04% ethanol solvent. In this condition, the extract yield of 18.41±0.01%, total phenolic 11.26±0.06 mg GAE/g, total flavonoids 533.70±0.18 mg CE/100 g, resveratrol 7.64±0.03%, IC₅₀ in the amount of 59.52±0.04 ppm, and reducing power of 76.31±0.08% could be achieved. As a conclusion, the optimization ultrasonic-assisted extraction of "melinjo kerikil" seeds using response surface methodology could be determined based on the extraction temperature, extraction duration, and concentration of ethanol.

Keywords: melinjo, ultrasonic, extraction temperature, duration, concentration of ethanol

Pendahuluan

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) termasuk famili Gnetaceae yang terdiri dari sekitar 30 spesies (Wazir *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2015). Menurut Triputra dan Yanuar (2018) melinjo tersedia secara luas dan dikonsumsi dalam jumlah besar di Indonesia. Biji melinjo dapat dikonsumsi dalam jangka panjang dan tidak toksik

(Tatefuji *et al.*, 2014). Melinjo kerikil adalah salah satu varietas melinjo lokal Indonesia yang bijinya berbentuk agak bulat, berukuran panjang sekitar 1,5 cm dan lebar sekitar 1,1 cm. Bagian luar kernel melinjo kerikil terdapat cangkang berwarna coklat, diantara kernel dan cangkang terdapat lapisan tipis berwarna perak.

Beberapa peneliti menyatakan bahwa biji melinjo mempunyai aktivitas biologis. Kato *et al.* (2009) melaporkan bahwa ekstrak etanol biji melinjo mengandung stilbenoid, yang terdiri dari trans-resveratrol (3,5,4-trihydroxy-trans-stilbene), gnetin C, gnetin L, gnetinoside A, gnetinoside C dan gnetinoside D. Wazir *et al.*, (2011) menyatakan bahwa resveratrol mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan komponen stilbenoid yang lain. Resveratrol dalam biji melinjo mempunyai bioavailabilitas yang tinggi dan aman (Abhishek *et al.*, 2019). Hasil penelitian Bhat dan Yahya (2014) menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji melinjo mengandung fenolik 15,1 (mgGAE/100 g), tanin (35,6 mgCE/100 g), flavonoid (709 CE/100g) dan aktivitas antioksidan sebesar 48,9%.

Metoda ekstraksi konvensional seperti refluks, perebusan maupun maserasi dapat digunakan untuk ekstraksi senyawa bioaktif biji melinjo. Akan tetapi menurut Hilbig *et al.* (2018) ekstraksi cara konvensional mempunyai kelemahan, adanya reaksi hidrolisis, oksidasi dan ionisasi yang terjadi selama proses berlangsung, sehingga senyawa fenolik dapat mengalami kerusakan. Agarwal *et al.* (2018) menyatakan bahwa ekstraksi konvensional memerlukan waktu yang lebih lama dan jumlah pelarut yang lebih banyak. Salah satu alternatif untuk menggantikan ekstraksi cara konvensional adalah menggunakan ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik (*ultrasonic-assisted extraction*). Huang *et al.* (2009), menyatakan bahwa *ultrasonic-assisted extraction* (UAE) adalah metoda ekstraksi yang efisien namun sederhana. Dinding sel dapat dirusak oleh gelombang ultrasonik sehingga kandungan senyawa di dalamnya dapat bebas keluar. Panas lokal yang terjadi pada cairan dapat meningkatkan difusi ekstrak. Feng *et al.* (2015) menyatakan bahwa ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik memerlukan sedikit pelarut, suhu dan energi rendah serta ramah lingkungan. Menurut Wen *et al.* (2018) ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik memerlukan waktu yang lebih singkat dan menghasilkan *yield* produk yang lebih banyak. Beberapa faktor yang mempengaruhi ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik adalah suhu, waktu, dan konsentrasi pelarut yang digunakan. Untuk menentukan pengaruh tiap faktor, interaksi antar faktor, dan optimasi dapat digunakan *response surface methodology* (RSM). Metode RSM ini dinilai lebih cepat dan ekonomis dibandingkan dengan metode satu variabel dalam satu waktu atau eksperimen faktorial lengkap (Bas dan Boyaci, 2007).

Sampai saat ini belum ada penelitian dan publikasi tentang ekstraksi biji melinjo kerikil berbantu gelombang ultrasonik. Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah melakukan proses ekstraksi biji melinjo kerikil berbantu gelombang ultrasonik yang dilakukan pada berbagai suhu ekstraksi, lama ekstraksi, dan konsentrasi pelarut etanol dan optimasi ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *response surface methodology*. Penelitian ini sangat bermanfaat untuk mendapatkan informasi sebuah proses ekstraksi yang mudah guna menghasilkan kualitas ekstraksi yang optimal.

Materi dan Metode

Materi

Biji melinjo kerikil diperoleh dari perkebunan melinjo di daerah Kabupaten Klaten, Jawa Tengah, Indonesia. Setelah dipanen, biji melinjo segera dipindahkan dari kebun dan dipersiapkan untuk transportasi ke laboratorium melalui jalur transportasi darat tanpa ada perlakuan preservasi. Biji melinjo dipetik secara acak pada beberapa pohon melinjo dan dipilih yang sudah matang (berumur ± 75 hari setelah berbunga) yang ditandai berkulit merah, dengan ukuran panjang $1,53 \pm 0,06$ cm, lebar $1,11 \pm 0,01$ cm dan berat $2,32 \pm 0,01$ gram. Bahan kimia yang digunakan meliputi etanol (Merck, Jerman), reagen folin-ciocalteu (Merck, Jerman), 2, 2-difenil-1-pikrillhidrazil (Sigma, US), toluene (Merck, Jerman), asam galat (Merck, Jerman), asam asetat (Merck, Jerman), etil asetat (Merck, Jerman), dan resveratrol (Merck, Jerman). Beberapa peralatan meliputi freeze drier (Edwards Modulyo, United Kingdom), grinder (Maksindo, Indonesia), ayakan (ASTM Standart, Indonesia), timbangan analitik PA 214 (Ohaus, USA), *sonicator bath 3800* (Branson, Mexico), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, Japan), rotary vacuum evaporator (Heidolph, Germany) dan CAMAG TLC Scanner 4 (Muttenez, Switzerland).

Metode

Penelitian ini berlangsung pada bulan Juni sampai September 2018 di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan PAU Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Pertama-tama, kulit melinjo kerikil bagian luar yang lunak dan bagian dalam yang keras dikupas, kemudian biji tanpa kulit dikeringkan menggunakan freeze drier selama 60 jam pada suhu -40°C dan tekanan 10^{-1} torr. Selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran menggunakan grinder. Bubuk biji melinjo yang diperoleh diayak menggunakan ayakan 30 mesh. Bubuk biji melinjo kerikil yang lolos ayakan 30 mesh disimpan pada suhu 4°C dalam wadah kedap udara sampai dipakai untuk perlakuan selanjutnya.

Optimasi ekstraksi biji melinjo kerikil sesuai dengan *ultrasonic-assisted extraction* yang dilakukan oleh Li *et al.* (2016) dengan modifikasi. Sejumlah 20 gram bubuk kering melinjo kerikil dimasukkan dalam gelas beaker, kemudian ditambah etanol sebagai pelarut dengan rasio bubuk melinjo kerikil dan etanol 1:10 (b/v). Variasi konsentrasi pelarut etanol yang digunakan adalah 40, 50, 60,70 dan 80%. Sampel tersebut diekstrak menggunakan *ultrasonic bath* pada frekwensi 40 kHz dengan berbagai suhu ekstraksi (25, 30, 35, 40, 45°C) dan waktu ekstraksi (10, 20, 30, 40, 50 menit). Selanjutnya dilakukan filtrasi dan evaporasi pada suhu didih etanol sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak biji melinjo kerikil kental dikeringbekukan menggunakan freeze drier lalu disimpan pada suhu 4°C dalam wadah gelap sampai dianalisis, yang meliputi *yield* ekstrak, total fenolik, total flavonoid, resveratrol dan aktivitas antioksidan. Nilai *yield* ekstrak, total fenolik, total flavonoid dan resveratrol dibandingkan dengan hasil

Tabel 1. Nilai respon berdasarkan desain Box-Behnken

Spl	Run	Faktor A (Suhu, °C)	Faktor B (Waktu, menit)	Faktor C (Konsentrasi etanol, %)	Nilai respon					
					Yield (%)	Total fenolik (mg GAE/g)	Flavonoid total (mg CE/100 g)	Resve- ratorol (%)	IC50 (ppm)	Reducing Power (%)
14	1	25,00	20,00	70,00	10,43	5,85	360,62	3,11	90,23	60,56
2	2	35,00	20,00	70,00	14,72	6,27	379,21	3,78	90,51	59,59
1	3	25,00	40,00	70,00	13,61	7,86	370,82	3,59	70,11	70,81
13	4	35,00	40,00	70,00	14,85	8,31	370,97	3,99	80,11	70,33
8	5	35,00	30,00	60,00	11,16	6,83	350,29	2,78	83,29	42,45
10	6	25,00	30,00	60,00	11,12	6,45	350,11	2,19	88,33	44,02
11	7	35,00	30,00	80,00	14,33	7,33	355,01	2,56	80,56	62,66
9	8	25,00	30,00	80,00	14,01	6,57	350,22	2,47	81,82	61,73
12	9	30,00	20,00	60,00	10,82	6,00	360,19	2,21	83,34	38,49
5	10	30,00	40,00	60,00	12,11	7,27	450,53	3,70	70,75	64,52
15	11	30,00	20,00	80,00	12,27	6,22	360,22	3,03	80,31	56,66
7	12	30,00	40,00	80,00	15,11	8,01	472,01	3,76	70,42	68,39
3	13	30,00	30,00	70,00	17,82	11,18	496,76	7,88	54,21	81,93
6	14	30,00	30,00	70,00	18,62	10,96	599,02	7,52	64,16	71,67
4	15	30,00	30,00	70,00	18,18	11,11	497,11	7,69	64,28	71,70

Tabel 2. Model persamaan kuadrat

Respon	Persamaan kuadrat	R ²	p-value	Lack of fit
Yield ekstrak	$18,21+0,74A+0,93B+1,31C-2,36A-2,44B^2-3,19C^2$	0,88	0,0014	0,12
Total fenolik	$11,08+0,25A+0,89B+0,20C+7,500E-003AB+0,095AC+0,13BC-2,05A^2-1,97B^2-2,24C^2$	0,99	<0,0001	0,21
Flavonoid total	$530,96+2,96A+25,51B+3,29C-109,94A^2-50,61B^2-69,61C^2$	0,85	0,02	0,73
Resveratrol	$7,70+0,22A+0,36B+0,12C-0,068AB-0,12AC-0,19BC-2,38A^2-1,70B^2-2,82C^2$	0,97	<0,0001	0,20
IC ₅₀	$60,88+0,50A-6,63B-1,58C+14,58A^2+7,28B^2+8,04C^2$	0,84	0,01	0,76
Reducing Power	$73,41-0,26A+7,34B+7,50C-6,83A^2-15,14C^2$	0,90	0,84	0,66

Keterangan: A adalah suhu ekstraksi, B adalah waktu ekstraksi dan C adalah konsentrasi pelarut etanol

ekstraksi konvensional (maserasi pada kondisi optimum hasil penelitian).

Analisis Yield

Persentase *yield* ekstrak dihitung sesuai rumus untuk mendapatkan *yield* ekstrak yang diadopsi dari penelitian Al-Juhaimi *et al.*, (2016) dengan formula yaitu berat ekstrak kering dibagi dengan berat sampel kering kemudian dikalikan dengan 100.

Analisis Total Fenolik

Penentuan total fenolik dilakukan menggunakan uji Follins-Ciocalteu seperti yang telah dilakukan oleh Dewanto *et al.* (2002) dengan sedikit modifikasi. Seratus dua puluh lima (125 µl) sampel ekstrak biji melinjo ketan dilarutkan dalam 500 µl distilled water dan 125 µl larutan reagen Folin-Ciocalteu. Campuran dikocok, lalu ditambah 1,25 ml Na₂CO₃ 7%, dan *distilled water* sampai volume 3 ml. Pengukuran absorbansi pada 760 nm dilakukan setelah inkubasi di ruang gelap selama 90 menit. Hasil total fenolik ekstrak biji melinjo kerikil dinyatakan sebagai mg Ekuivalen Asam Galat (GAE) per gram sampel kering.

Analisis Total Flavonoid

Penentuan total flavonoid ekstrak biji melinjo kerikil ditentukan berdasarkan metode yang digunakan oleh Bhat dan Yahya (2014). Sejumlah 1 ml sampel ekstrak biji melinjo kerikil dicampur dengan 4 ml *distilled water*. Pada waktu ke-nol dilakukan penambahan 0,3 ml NaNO₂ 5% (b/v). Campuran ini dibiarkan selama 5 menit, lalu ditambah dengan 0,3 ml AlCl₃ 10% (b/v). Pada menit ke-6, ditambah 2 ml NaOH 1 M dan *distilled water* hingga 10 ml. Campuran ini divortex dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang (λ) 510 nm

menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil flavonoid total dinyatakan sebagai mg catechin equivalents (CE) per 100 g sampel kering.

Analisis Kandungan Resveratrol

Sebanyak 0,1 ml ekstrak dimasukkan dalam mikrotube, kemudian ditambah dengan 0,9 ml etanol. Campuran dihomogenisasi selama 2 menit menggunakan vortex dan disentrifugasi selama 5 menit. Sebanyak 20 µl ekstrak dispotkan pada plat silika gel F₂₅₄ kemudian dielusasi dalam fase gerak sesuai dengan fase gerak yang digunakan oleh Liu *et al.* (2016), yaitu toluena:etil asetat:asam asetat (dengan perbandingan 15:3:1). Pembacaan densitas dilakukan dengan TLC-scanner.

Analisis Penghambatan Radikal DPPH

Penghambatan radikal DPPH menggunakan metoda yang telah dilakukan oleh Savić-Gajić *et al.* (2017). Satu ml larutan DPPH ditambahkan ke dalam 2,5 ml ekstrak biji melinjo kerikil. Setelah dikocok, campuran diinkubasi pada kondisi gelap (suhu kamar) selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya pada 517 nm. Penghambatan radikal DPPH (%) dihitung menggunakan formula $(Ac-As)/Ac \times 100$, dimana Ac dan As, masing-masing adalah absorbansi kontrol dan sampel. Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi ekstrak biji melinjo kerikil untuk mengurangi intensitas warna radikal bebas DPPH sebesar 50%. Nilai IC₅₀ diperoleh dengan cara membuat kurva regresi linear antara konsentrasi ekstrak dengan persentasi penghambatan radikal bebas DPPH dengan menggunakan kisaran konsentrasi ekstrak dari 25 sampai 200 ppm (didapat nilai R²= 0,935).

Analisis *Reducing Power*

Reducing power ditentukan menurut metode yang dijelaskan oleh Ozcoy *et al.* (2008) dengan beberapa modifikasi. Satu miligram ekstrak biji melinjo kerikil dicampur dengan buffer fosfat (2,5 ml) dan kalium feri sianida (2,5 ml). Selanjutnya campuran diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit. Sejumlah 2,5 ml asam triklor asetat ditambahkan ke dalam campuran, kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm. Sejumlah 2,5 ml supernatan dicampur dengan 2,5 ml *distilled water* dan 0,5 ml larutan besi klorida. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 700 nm. Persentase *reducing power* sampel dibandingkan dengan standar (asam askorbat) dan dihitung menggunakan rumus $[1-(1-As/Ac)] \times 100$, di mana Ac adalah absorbansi standar dan As adalah absorbansi sampel.

Desain Eksperimen

Eksperimen dirancang menggunakan desain Box-Behnken, dengan variable suhu ekstraksi (25, 30, 35, 40, 45°C), waktu ekstraksi (10, 20, 30, 40, 50 menit) dan konsentrasi pelarut etanol (40, 50, 60, 70, 80%). Optimasi ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik dilakukan menggunakan *response surface methodology* (Design Expert 10).

Hasil dan Pembahasan

Ekstrak Biji Melinjo Kerikil

Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak biji melinjo kerikil berkisar antara 10,43-18,62%. Ekstrak melinjo kerikil mengandung senyawa total fenolik berkisar antara 5,85-11,18 mg GAE/g, total flavonoid berkisar antara 450,11-599,0 mg CE/100 g, resveratrol 2,19-7,88%, IC₅₀ sebesar 90,51-54,21ppm dan *reducing power* sebesar 58,49-81,93%. Biji melinjo yang diekstrak menggunakan pelarut etanol oleh Bhat dan Yahya (2014) mengandung fenolik 0,151±2,19 mg GAE/g, flavonoid 709±79,9 mg CEQ/100 g, dan penghambatan radikal DPPH 49,9±38,9%, sedangkan yang diekstrak menggunakan air mengandung fenolik 12,6 ± 5,06 mg GAE/g, flavonoid 81,6 ± 20,49 mg CEQ/100g, dan penghambatan radikal DPPH 19,7 ± 13,17%. Hasil penelitian yang berbeda ini disebabkan beberapa faktor, antara lain varietas, umur, tempat dan kondisi lingkungan pertumbuhan melinjo serta pemeliharannya.

Hubungan antara suhu ekstraksi (A), waktu ekstraksi (B), konsentrasi etanol (C) dengan respon *yield* ekstrak, total fenolik, total flavonoid, resveratrol, IC₅₀ dan *reducing power* ditunjukkan pada Tabel 2. Semua respon menunjukkan nilai R² lebih besar dari 0,75 dan *lack of fit* lebih besar dari 0,05. Hasil ini cukup baik karena menurut Le Man *et al.* (2010) persamaan cukup baik jika nilai koefisien determinasi lebih besar dari 0,75. Nilai *lack of fit* yang lebih besar dari 0,05 menunjukkan bahwa model matematika untuk semua respon adalah model yang cukup baik karena menunjukkan kesesuaian antara data semua respon dengan model (Li *et al.* 2016). *Yield* ekstrak biji melinjo kerikil

Grafik respon permukaan untuk *yield* ekstrak ditunjukkan pada Figur 1 (grafik respon parameter

lainnya, telah dianalisis namun tidak ditampilkan karena mempunyai unsur kesamaan bentuk grafik). Pada grafik respon interaksi suhu dengan waktu, menunjukkan bahwa *yield* ekstrak tertinggi terjadi pada suhu 29–33°C dengan waktu ekstraksi 25–35 menit sedangkan pada grafik respon interaksi suhu dengan konsentrasi pelarut etanol didapat *yield* ekstrak tertinggi pada suhu 33–38°C dengan konsentrasi pelarut etanol 65–75%. Berdasarkan grafik respon interaksi konsentrasi pelarut etanol dan waktu, nilai *yield* ekstrak tertinggi didapat pada waktu 25–40 menit dengan konsentrasi pelarut etanol 65–75%.

Semakin tinggi suhu ekstraksi, semakin lama waktu ekstraksi dan semakin tinggi konsentrasi etanol menunjukkan semakin meningkat *yield* ekstrak yang dihasilkan. Hasil penelitian ini sesuai dengan *ultrasonic-assisted extraction* pada biji *Trigonella foenum-graecum* L. yang dilakukan oleh Al-Juhaimi *et al.* (2015). Hal ini disebabkan karena kesempatan biji melinjo untuk kontak dengan pelarut etanol semakin lama sehingga waktu pelarut etanol menembus dinding sel dan menarik senyawa dalam bahan juga semakin lama. Waktu ekstraksi yang semakin lama memungkinkan lebih banyak waktu kontak untuk gelembung kavitasi memecahkan sel sampel, sehingga meningkatkan hasil ekstrak komponen bioaktif (Wang *et al.*, 2012). Namun demikian setelah mencapai suhu 30,18°C, waktu 33,01 menit, dan konsentrasi pelarut etanol 71,04% menunjukkan tidak terjadi peningkatan *yield* ekstrak karena telah melewati titik jenuh larutan. Waktu ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik yang terlalu lama dapat mendegradasi komponen fenolik, sehingga akan dihasilkan *yield* yang lebih rendah (Odabas dan Koca, 2016), sebagaimana terjadi pada penelitian Al-Juhaimi *et al.* (2015) yang menunjukkan hasil bahwa biji *Trigonella foenum-graecum* L. yang diekstrak menggunakan etanol 33% pada suhu 38°C menghasilkan *yield* dengan waktu yang lebih rendah, yaitu 32 menit. Pada penelitian ini dihasilkan total fenolik 11,26±0,06 mg GAE/g, sedangkan total fenolik biji *Trigonella foenum-graecum* L. didapat lebih rendah, yaitu sekitar 5,88–7,53 mg GAE/g.

Total Fenolik Ekstrak Biji Melinjo Kerikil

Penelitian ini juga telah berhasil untuk mendapatkan grafik respon total fenolik (figur tidak ditampilkan). Grafik respon interaksi suhu dan waktu menunjukkan total fenolik tertinggi yang terjadi pada daerah suhu 27–33°C dan waktu 25–40 menit, sedangkan grafik respon interaksi suhu dan konsentrasi pelarut etanol, menunjukkan total fenolik yang tertinggi, yaitu pada suhu 27–35°C dan konsentrasi pelarut etanol 65–75%. Grafik respon interaksi konsentrasi dan waktu menunjukkan nilai total fenolik yang tertinggi pada waktu 25–40 menit dan konsentrasi pelarut etanol 65–75%.

Peningkatan total fenolik terjadi seiring dengan peningkatan suhu ekstraksi, lama ekstraksi dan konsentrasi pelarut etanol, namun selanjutnya terjadi penurunan total fenolik, sejalan dengan penelitian pada *rice bran* (Tabaraki dan Nateghi., 2011), *bran sorghum merah* (Luo *et al.*, 2017), biji *Trigonella foenum-graecum* L. (Al-Juhaimi *et al.*, 2015) dan daun perilla (Li *et al.*, 2016).

Tabel 3. Kriteria nilai optimasi

Nama	Target	Batas bawah	Batas atas
Suhu (A)	Range	25	35
Waktu (B)	Range	20	40
Konsentrasi (C)	Range	60	80
Yield ekstrak	Maksimal	10,43	18,62
Total fenolik	Maksimal	5,85	11,28
Flavonoid total	Maksimal	350,11	599,02
Resveratrol	Maksimal	2,19	7,88
IC ₅₀	Minimal	54,21	90,51
Reducing power	Maksimal	38,49	81,93

Tabel 4. Nilai respon prediksi dan nilai sebenarnya

Respon	Nilai prediksi	Nilai sebenarnya	Residual standar error (%)
Yield ekstrak (%)	18,39	18,41±0,009	0,11
Total fenolik (mg GAE/g)	11,18	11,26±0,06	0,70
Flavonoid total mg CE/100 g)	533,62	533,70±0,18	0,02
Resveratrol (%)	7,63	7,64±0,03	0,14
IC ₅₀ (ppm)	59,51	59,52±0,04	0,02
Reducing power (%)	76,22	76,312±0,08	0,12

Waktu ekstraksi yang lebih lama memungkinkan lebih banyak waktu kontak gelembung kavitas untuk memecahkan sel, sehingga total fenolik meningkat (Wang *et al.*, 2012). Wazir *et al.* (2011) menyatakan bahwa ekstraksi pada suhu yang tinggi dapat meningkatkan kelarutan fenol karena mampu melepaskan senyawa fenolik dari dinding sel. Namun perpanjangan waktu ekstraksi dapat menyebabkan senyawa fenolik terpapar cahaya dan oksigen, akibatnya senyawa fenolik dapat teroksidasi sehingga perolehan total fenolik menjadi berkurang (Bazykina *et al.*, 2002). Khoddami *et al.*, (2013) juga menyatakan bahwa komponen beberapa fenolik sensitif terhadap panas dan mudah teroksidasi.

Total Flavonoid Ekstrak Melinjo Kerikil

Total flavonoid meningkat sesuai dengan peningkatan suhu ekstraksi, waktu ekstraksi, dan konsentrasi pelarut etanol, kemudian terjadi penurunan total flavonoid karena terjadi degradasi termal (Lu *et al.*, 2013). Hasil ini sesuai dengan ekstraksi flavonoid berbantu gelombang ultrasonik pada daun *Camellia fascicularis* yang juga mengalami degradasi termal dan menurun setelah kondisi optimum, yaitu suhu 72,3°C, waktu 1,6 jam dan konsentrasi etanol 40% (Liu, *et al.*, 2017). Waktu ekstraksi yang lebih lama dimungkinkan karena penggunaan konsentrasi pelarut etanol yang lebih rendah dibandingkan konsentrasi pelarut etanol yang digunakan pada penelitian ini.

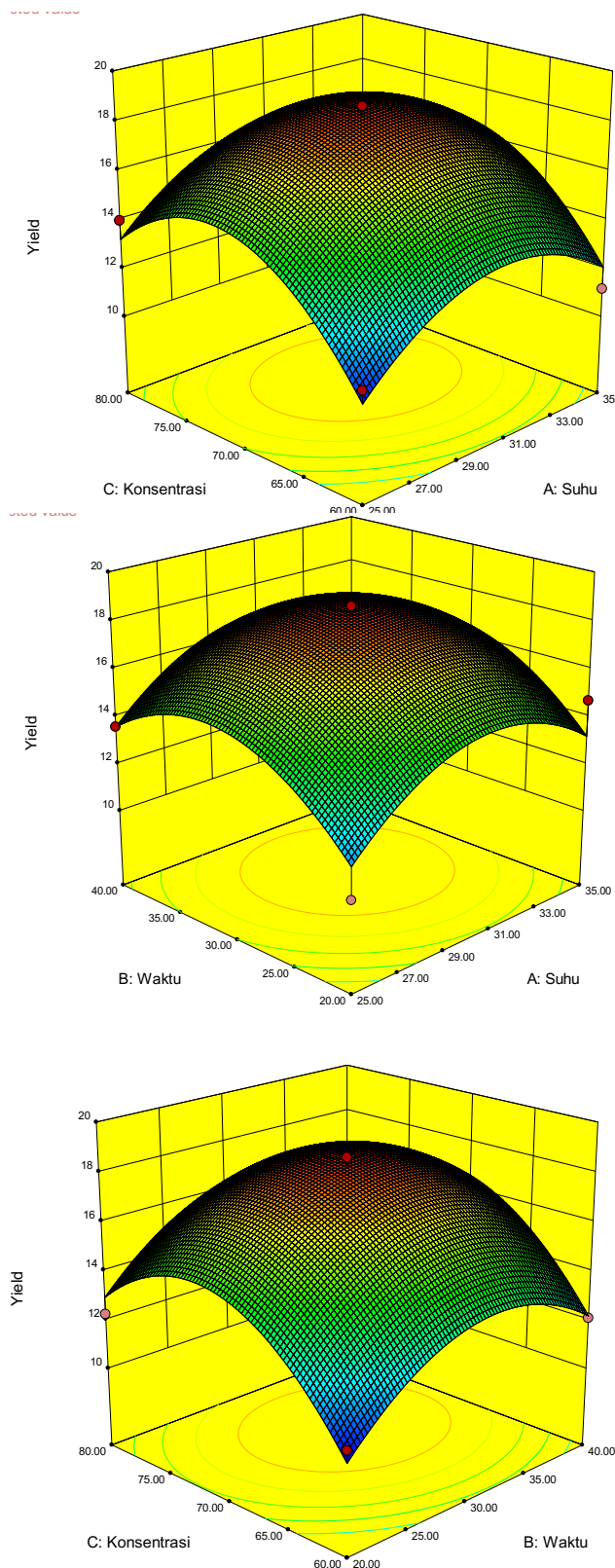
Grafik respon total flavonoid menghasilkan total flavonoid yang tertinggi pada suhu 27–33°C dan waktu 25–40 menit, suhu 27–33°C dan konsentrasi etanol 65–75%, serta waktu 25–40 menit dan konsentrasi etanol 65–75% (figur tidak ditampilkan).

Kadar Resveratrol Ekstrak Melinjo Kerikil

Berdasarkan grafik respon interaksi suhu dan waktu, kadar resveratrol yang tertinggi didapat pada suhu 27–33°C dan waktu 25–35 menit, suhu 27–33°C

tertentu. Peningkatan aktivitas antioksidan sejalan dengan peningkatan total fenolik, total flavonoid dan resveratrol. Piluzza dan Bullitta (2011) menyatakan bahwa fenolik dapat dijadikan sebagai indikator sifat antioksidatif pada tanaman etnoveterinari tradisional. Hasil penelitian Terpinc *et al.* (2012) juga menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang positif antara total fenolik dan aktivitas antioksidan pada biji *Linum usitatissimum* L., *Brassica napus* L., dan *Sinapsis alba* L. Peningkatan kandungan total fenolik dan total flavonoid pada ekstrak kulit orange (*Citrus reticulata*) juga menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan yang ditandai dengan penurunan nilai IC₅₀ (Chen *et al.*, 2017). Aktivitas antioksidan fenolik berkaitan erat dengan struktur yang dimiliki. Beberapa senyawa yang mempunyai efek bioaktif adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi orto dan posisi para terhadap gugus -OH dan -OR. Bastianetto *et al.* (2015) menyatakan bahwa resveratrol memiliki cincin aromatik dan OH sebagai penyedia elektron.

Berdasarkan grafik respon IC₅₀, nilai terendah didapat pada suhu 27–33°C dan waktu 30–40 menit, sedangkan *reducing power* tertinggi ada pada suhu 27–33°C dan waktu 35–40 menit. Nilai IC₅₀ terendah diperoleh pada suhu 29–31°C dan konsentrasi etanol 65–75%, sedangkan *reducing power* tertinggi pada suhu 27–33°C dan konsentrasi 70–75%. Lama waktu 30-40 menit dan konsentrasi etanol 65–75% juga menunjukkan IC₅₀ terendah, sedangkan *reducing power* tertinggi terdapat pada waktu 30-40 menit dan konsentrasi etanol 65-75%. Kondisi suhu ekstraksi pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan ekstraksi *Cissus rotundifolia* berbantu gelombang ultrasonik, karena perbedaan jenis pelarut yang digunakan. Aktivitas antioksidan ekstrak *Cissus rotundifolia* tertinggi diperoleh menggunakan pelarut aseton 40%, pada suhu 40°C, selama 40 menit (Al-Bukhaiti *et al.*, 2019).



Figur 1. Respon permukaan yield ekstrak
 Keterangan urutan gambar dari atas berturut-turut adalah interaksi suhu dan waktu, interaksi suhu dan konsentrasi, interaksi waktu dan konsentrasi pelarut etanol

Optimasi Ekstraksi

Kriteria yang digunakan untuk mendapatkan nilai optimasi ditunjukkan pada Tabel 3. Faktor yang digunakan hanya yang berada dalam *range* yang telah

ditentukan. Parameter *yield* ekstrak, total fenolik, total flavonoid, resveratrol dan *reducing power* ditentukan titik maksimum, sedangkan IC_{50} ditentukan titik minimumnya. Semua faktor mempunyai tingkat kepentingan yang sama sehingga tidak ada faktor atau parameter yang dihitung terlebih dahulu. Hasil optimasi menunjukkan kondisi optimal ekstraksi biji melinjo kerikil berbantu gelombang ultrasonik adalah suhu 30,18°C, waktu 33,01 menit dan konsentrasi pelarut etanol sebesar 71,04%. Tabel 4 menunjukkan nilai respon prediksi dan nilai respon sebenarnya berdasarkan kondisi optimum ekstraksi. Secara berturut nilai prediksi respon *yield* ekstrak 18,39%, total fenolik 11,18 mg GAE/g, total flavonoid 533,62 mg CE/100 g, resveratrol 7,632, IC_{50} sebesar 59,51 ppm dan *reducing power* 76,22%. *Desirability* yang dihasilkan adalah 0,938, yang artinya dengan menggunakan suhu, waktu dan konsentrasi pelarut etanol tersebut dapat menghasilkan nilai parameter/respon sebesar 93,80%. Nilai respon yang sebenarnya berdasarkan kondisi optimum (Tabel 4) berturut turut adalah *yield* ekstrak 18,41±0,01%, total fenolik 11,26±0,06 mg GAE/g, total flavonoid 533,70±0,18 mg CE/100 g, resveratrol 7,64±0,03%, IC_{50} sebesar 59,52±0,04 ppm dan *reducing power* 76,31±0,08%. Berdasarkan perhitungan diperoleh nilai residual standar error sebesar 0,01–0,6%, yang menunjukkan tidak berbeda antara nilai respon yang sebenarnya dan nilai respon prediksi. Menurut Sulaiman *et al.* (2017) residual standar error yang kurang dari 5% menunjukkan hasil yang tidak berbeda.

Hasil nilai respon prediksi maupun nilai respon yang sebenarnya menunjukkan lebih tinggi dibandingkan dengan hasil ekstraksi menggunakan metoda maserasi. Ekstraksi maserasi biji melinjo kerikil pada kondisi optimum (suhu 30,18°C, waktu 33,01 menit, konsentrasi etanol 71,04%) menghasilkan *yield* ekstrak kering sebesar 5,01%, total fenolik 3,76 mg GAE/mg, total flavonoid 231,41 mg CE/g dan resveratrol 0,71%. Sedangkan ekstraksi maserasi selama 16 jam yang dilakukan Bhat dan Yahya (2014) menghasilkan fenolik 0,151±2,19 mg GAE/g dan flavonoid 709±79,9 mg CEQ/g Perbedaan ini disebabkan karena aplikasi gelombang ultrasonik pada ekstraksi padat-cair membentuk gelembung kavitasi yang menghancurkan sel biji melinjo sehingga mempermudah penetrasi pelarut ke dalam sel. Penetrasi menyebabkan pembengkakan dan hidrasi, sehingga terjadi pembesaran pori-pori dinding sel, yang akan meningkatkan proses difusi dan meningkatkan perpindahan massa (Bilgin dan Ahin, 2013). Hasil ini sesuai dengan Tsai *et al.* (2014) yang menghasilkan *yield* ekstrak *ultrasound-assisted extraction* 3,39 kali lebih tinggi dan total fenolik 3,78 kali lebih tinggi dibandingkan ekstraksi konvensional pada *Phyllanthus emblica* L.

Kesimpulan

Optimasi ekstraksi biji melinjo kerikil berbantu gelombang ultrasonik menggunakan *response surface methodology* ini berhasil dilakukan dan dapat menghasilkan nilai optimal yang berdasarkan pada

suhu, waktu ekstraksi, dan konsentrasi pelarut, yaitu suhu sebesar 30,18°C dengan waktu 33,01 menit dan konsentrasi etanol sebesar 71,04%.

Daftar Pustaka

- Agarwal, C., Máthé, K., Hofmann, T., Csóka, L. 2018. Ultrasound-assisted extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. optimized by response surface methodology. *Journal of Food Science* 83(3):700-710. DOI:10.1111/1750-3841.14075.
- Al-Juhaimi, F., Adiomo, O.Q., Ghafoor, K., Babiker, E.E. 2016. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compound from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed. *CyTA-Journal of Food* 14(3):369-374. DOI:10.1080/19476337.2015.1110202.
- Al-Bukhaiti, W.Q., Noman, A., Mahdi, A.A., Ali, A.H., Abed, S.M., Rashed, M.M., Wang, H., 2019. Profiling of phenolic compounds and antioxidant activities of *Cissus rotundifolia* (Forssk.) as influenced by ultrasonic-assisted extraction conditions. *Journal of Food Measurement and Characterization* 13(1):634-647. DOI:10.1007/s11694-018-9976-0.
- Bazykina, N.I., Nikolaevskii, A.N., Filippenko, T.A., Kaloerova, V.G. 2002. Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 36(2): 46-49. DOI: 10.1023/A:1016024300843.
- Bas, D., Boyaci, I.H. 2007. Modelling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78:836-845. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024.
- Bastianetto, S., Ménard, C., Quirion, R. 2015. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease* 1852(6):1195-1201. DOI:10.1016/j.bbadis.2014.09.011.
- Bilgin, M., Ahin, S. 2013. Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 44(1):8-12. DOI:10.1016/j.jtice.2012.08.008.
- Bhat, R., Yahya, B.N. 2014. Evaluating melinjau (*Gnetum gnemon* L.) seed flour quality as a base for development of novel food products and food formulations. *Food Chemistry* 156:42-49. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.01.063.
- Chan, C.H., Yusoff, R., Ngoh, G.C. 2014. Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design* 92(6): 1169-1186. DOI:10.1016/j.cherd.2013.10.001.
- Chen, X. M., Tait, A.R., Kitts, D.D. 2017. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry* 218:15-21. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.09.016.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(10):3010-3014. DOI:10.1021/jf0115589.
- Feng, S., Luo, Z., Tao, B., Chen, C. 2015. Ultrasonic-assisted extraction and purification of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rinds. *LWT-Food Science and Technology* 60(2):970-976. DOI:10.1016/j.lwt.2014.09.066.
- Francioso, P., Mastromarino, P., Masci, A., d'Erme, M., Mosca, L. 2014. Chemistry, Stability and Bioavailability of Resveratrol. *Medicinal Chemistry* 10:237-245. DOI:10.2174/15734064113096660053.
- Garcia, L., Garcia, R., Pacheco, G., Sutili, F., Souza, R.D., Mansur, E., Leal, I., 2016. Optimized extraction of resveratrol from *Arachis repens* handro by ultrasound and microwave: A correlation study with the antioxidant properties and phenol contents. *The Scientific World Journal* 2016:1-10. DOI:0.1155/2016/5890897.
- Hilbig, J., Alves, V.R., Muller, C.M.O., Micke, G.A., Vitali, L., Pedrosa, R.C., Block, J.M. 2018. Ultrasonic-assisted extraction combined with sample preparation and analysis using LC-ESI-MS/MS allowed the identification of 24 new phenolic compounds in pecan nut shell [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] extracts. *Food Research International* 106:549-557. DOI:10.1016/j.foodres.2008.01.010.
- Hou, C., Humphreys, A.M., Thureborn, O., Rydin, C. 2015. New insights into the evolutionary history of *Gnetum* (Gnetales). *Taxon* 64(2): 239-253. DOI:10.12705/642.12.
- Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., Wang, J. 2009. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test system in vitro. *Food Chemistry* 114(3):1147-1154. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.10.079.
- Kato, E., Tokunaga, Y., Sakan, F. 2009. Stilbenoids isolated from the seeds of melinjau (*Gnetum gnemon* L.) and their biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(6): 2544-2549. DOI:10.1021/jf803077p.
- Koddami, A., Wilkes, M., Roberts, T. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* 18(2): 2328-2375. DOI:10.3390/molecules18022328.
- Le Man, H., Behera, S.K., Park, H.S. 2010. Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *International Journal of Environmental Science & Technology* 7(1): 157-164. DOI:10.1007/BF03326127.
- Li, H.Z., Zhang, Z.J., Xue, J., Cui, L.X., Li, X.J., Chen, T. 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and rosmarinic acid from perilla leaves using response surface methodology. *Food Science and*

- Technology 36(4):686-693. DOI:10.1590/1678-457x.13516.
- Liu, Y., Nan, L., Liu, J., Yan, H., Zhang, D., Han, X. 2016. Isolation and identification of resveratrol-producing endophytes from wine grape Cabernet Sauvignon. SpringerPlus 5(1): 1029. DOI:10.1186/s40064-016-2571-0.
- Liu, Y., Luo, X., Lan, Z., Tang, J., Zhao, P., Kan, H. 2017. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant capacities of flavonoids from *Camellia fascicularis* leaves. CyTA-Journal of Food 16(1):105-112. DOI:10.1080/19476337.2017.1343867.
- Lu, J., Zhou, C., Rong, O., Xu, Y., Zhou, B., Li, Z., 2013. Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoids from *Cryptotaenia japonica* hassk using response surface methodology. Advance Journal of Food Science and Technology 5:310-317. DOI:10.19026/ajfst.5.3262.
- Luo, X., Cui, J., Zhang, H., Duan, Y., Zhang, D., Cai, M., Chen, G., 2018. Ultrasound assisted extraction of polyphenolic compounds from red sorghum (*Sorghum bicolor* L.) bran and their biological activities and polyphenolic compositions. Industrial Crops and Products 112: 296-304. DOI:10.1016/j.indcrop.2017.12.019.
- Odabas, H.I., Koca, I. 2016. Application of response surface methodology for optimizing the recovery of phenolic compounds from hazelnut skin using different extraction methods. Industrial Crops and Products 91:114-124. DOI:10.1016/j.indcrop.2016.05.033.
- Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N. 2008. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. Food Chemistry 110(3): 571-583. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.02.037.
- Piluzza, G., Bullitta, S. 2011. Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. Pharmaceutical Biology 49(3): 240-247. DOI:10.3109/13880209.2010.501083.
- Savić-Gajić, I., Savić, I.M., Nikolić, L.B., Popsavin, M.M., Rakić, S.J. 2017. The improvement of phtostability and antioxidant activity of trans-resveratrol by cyclodextrins. Advanced Technologies 6(2): 18-25. DOI:10.5937/savteh1702018S.
- Sharma, A., Jain, R., Saiju, P., Jain, N., 2019. Skin whitening efficacy of *Gnetum gnemon* L. seed extract. Journal of Drug Delivery and Therapeutics 9(2): 227-230. DOI:10.22270/jddt.v9i2-s.2497.
- Sulaiman, I.S.C., Basri, M., Masoumi, H.R.F., Chee, W.J., Ashari, S.E., Ismail, M. 2017. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. Chemistry Central Journal 11(1):54. DOI:10.1186/s13065-017-0285-1.
- Tabaraki, R., Nateghi, A. 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry 18(6):1279-1286. DOI:10.1016/j.ultsonch.2011.05.004.
- Tatefuji, T., Yanagihara, M., Fukushima, S. and Hashimoto, K. 2014. Safety assessment of melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract: acute and subchronic toxicity studies. Food and Chemical Toxicology 67: 230-235. DOI:10.1016/j.fct.2014.02.030.
- Terpinc, P., Čeh, B., Ulrih, N.P., Abramovič, H. 2012. Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. Industrial Crops and Products 39:210-217. DOI:10.1016/j.indcrop.2012.02.023.
- Triputra, M.A., Yanuar, A. 2018. Analysis of compounds isolated from *Gnetum gnemon* L. seeds as potensial ACE inhibitors through molecular docking and molecular dynamics simulations. Journal of Young Pharmacists 10(2):S32-S39. DOI:10.5530/jyp.2018.2s.7.
- Tsai, C.C., Chou, C.H., Liu, Y.C., Hsieh, C.W. 2014. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus emblica* L. and evaluation of antioksidant activities. International Journal of Cosmetic Science 36(5):471-476. DOI:10.1111/ics.12143.
- Wang, X., Wu, Q., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q. 2012. Response surface optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Sparganii rhizoma* and evaluation of their in vitro antioxidant activities. Molecules 17(6):6769-6783. DOI:10.3390/molecules17066769.
- Wazir, D., Ahmad, S., Muse, R., Mahmood, M., Shukor, M.Y. 2011. Antioxidant activities of different parts of *Gnetum gnemon* L. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 20(2): 234. DOI:10.1007/s13562-011-0051-8.
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C.S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., Luo, X. 2018. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops-A review. Ultrasonics Sonochemistry 48:538-549. DOI:10.1016/j.ultsonch.2018.07.018.