

V. PENUTUP	37
V.1 Kesimpulan	37
V.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kebutuhan protein makanan dari semua kelompok usia	13
2. Bahan makanan sumber protein	15
3. Desain eksperimental dengan kondisi ekstraksi	26
4. Hasil persen rendemen dan kadar protein <i>Eucheuma spinosum</i>	30

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Rumput laut (<i>Eucheuma spinosum</i>)	7
2. Struktur protein	11
3. Struktur asam amino	14
4. <i>Pareto chart</i> rendemen hasil ekstraksi protein dari <i>Eucheuma sp.</i> secara UAE terhadap parameter uji	31
5. Plot data rendemen hasil ekstraksi protein dari <i>Eucheuma sp.</i> secara UAE terhadap parameter uji (a) <i>surface plot</i> , (b) <i>contour plot</i> , (c) <i>optimization plot</i>	32
6. <i>Pareto chart</i> kadar protein dari ekstrak <i>Eucheuma sp.</i> secara UAE terhadap parameter uji	33
7. Plot data kadar protein dari ekstrak <i>Eucheuma sp.</i> secara UAE terhadap parameter uji (a) <i>surface plot</i> , (b) <i>contour plot</i> , (c) <i>optimization plot</i>	34
8. Penimbangan sampel <i>Eucheuma sp.</i>	49
9. Pencucian sampel	49
10. Pengeringan sampel di bawah sinar matahari	49
11. Pengeringan sampel di oven	49
12. Penimbangan simplisia kering	49
13. Penggilingan simplisia	49
14. Serbuk simplisia	50
15. Penimbangan sampel yang akan dibebas lemakkan	50
16. Proses pembebasan lemak sampel	50
17. Pengeringan di lemari asam	50

18. Penimbangan sampel untuk ekstraksi	50
19. Pencampuran sampel dengan pelarut <i>aquadest</i>	50
20. Pengaturan pH sesuai variasi pengujian	51
21. Ekstraksi UAE (sonikator)	51
22. Penyaringan	51
23. Pengukuran pH pada filtrat hasil penyaringan	51
24. Penambahan amonium sulfat	51
25. Campuran dibiarkan semalaman di kulkas	51
26. Pengisian sampel di tabung sentrifus	52
27. Proses sentrifus	52
28. Hasil sentrifus	52
29. Penimbangan capor kosong	52
30. Ekstrak kental	52
31. <i>Freeze drying</i>	52
32. Ekstrak kering	53
33. Penimbangan capor + ekstrak kering	53
34. Analisis protein (Kjeldahl)	53
35. Analisis RSM	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja	43
2. Perhitungan Persen Rendemen Ekstrak	47
3. Dokumentasi Penelitian	49
4. Hasil Determinasi Tanaman	54
5. Hasil Analisis Protein	55
6. Data Hasil <i>Minitab</i> 18	58

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

RSM	: <i>Response Surface Methodology</i>
UAE	: <i>Ultrasound Assisted Extraction</i>
RDA	: <i>Recommended Dietary Allowance</i>
BB	: Bobot Badan
g	: Gram
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
mL	: Mililiter
AOAC	: <i>Association of Official Analytical Chemist</i>
RPM	: <i>Revolution Per Minute</i>
kHz	: Kilohertz
M	: Molaritas
N	: Normalitas
C	: Celsius
ppt	: <i>Part per thousand</i>
cm	: Sentimeter
m	: Meter

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Populasi dunia terus tumbuh dan diperkirakan dapat meningkat dari 7,2 miliar menjadi 9,6 miliar pada 2050 dan 10,9 miliar pada 2100 (Gerland dkk, 2014). Sebagai akibat dari peningkatan populasi dunia, maka kebutuhan nutrisi di masa depan dapat meningkat sehingga permintaan global akan protein juga meningkat (Kazir dkk., 2019).

Medek, dkk. (2017) memperkirakan bahwa secara global, terdapat 15,1% atau 1,4 miliar orang yang akan beresiko mengalami kekurangan protein di tahun 2050 akibat perubahan demografis. Perkiraan ini meliputi 613,6 juta orang berisiko di Afrika sub-Sahara, 276,4 juta di India, 131,7 juta di Asia Timur, Tenggara dan Pasifik, 84,4 juta di Amerika Latin Tengah dan Karibia, serta 77,8 juta di Asia Selatan.

Protein adalah makronutrien yang merupakan dasar untuk pengembangan, pemeliharaan, dan perbaikan sel tubuh. Tubuh yang mengalami kekurangan protein dapat menyebabkan berbagai masalah kesehatan seperti kwashiorkor, marasmus, gangguan kesehatan mental, edema, kegagalan organ, pengecilan dan penyusutan jaringan otot, dan kelemahan sistem kekebalan tubuh (Khan dkk., 2017). Penelitian Naghshi, dkk. (2020) menyimpulkan bahwa asupan protein nabati dapat menurunkan resiko kematian dibandingkan dengan protein hewani.

Populasi global yang meningkat dapat menyebabkan berkurangnya sumber daya lahan dan air yang tersedia, sehingga laut dapat dijadikan sebagai situs alternatif yang menarik untuk mendasarkan praktik budidaya. Budidaya laut dapat menyediakan berbagai macam sumber nutrisi. Baru-baru ini, produksi rumput laut global telah menjadi sumber daya pertanian terestrial yang populer karena permintaannya yang tinggi sebagai sumber protein (Kazir dkk., 2019).

Rumput laut atau makroalga laut merupakan salah satu komoditas sumber daya laut yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi, biaya produksi yang rendah, mudah dibudidayakan, serta waktu pembudidayaan yang cukup singkat yakni sekitar 45 hari (Subagio dan Kasim, 2019; Diharmi dkk., 2019). Indonesia merupakan produsen kedua di dunia untuk komoditas rumput laut dengan nilai 10,08 juta ton, dan ditargetkan meningkat menjadi 12,3 ton pada tahun 2024 (Burhanuddin, 2020; KKP, 2018).

Konsentrasi protein dalam rumput laut bervariasi berdasarkan spesies, siklus musim, dan faktor fluktuasi musiman. Umumnya rumput laut merah mengandung protein yang lebih tinggi (2,3-47% dari bobot kering) dibandingkan dengan rumput laut hijau (3,3-35% dari bobot kering) dan rumput laut coklat (5,4-24% dari bobot kering). Selain itu, rumput laut mengandung asam amino esensial, termasuk glisin, alanin, prolin, arginin, asam glutamat dan asam aspartat (Amlani dan Yetgin, 2022). Berdasarkan Naseri, dkk. (2020), jenis rumput laut merah seperti

Eucheuma spinosum diperkaya dengan asam amino esensial yang sebanding dengan daging dan kedelai.

Kabupaten Takalar merupakan daerah yang memiliki potensi budidaya rumput laut terbesar di Sulawesi Selatan, sehingga cukup potensial untuk meningkatkan budidaya rumput laut (Rahadiati dkk., 2018). *Eucheuma denticulatum* Collins et Hervey atau yang biasa disebut *Eucheuma spinosum* merupakan salah satu jenis rumput laut merah yang banyak ditemukan di Kabupaten Takalar, khususnya Desa Punaga Kecamatan Mangarabombang. Potensi budidaya rumput laut *Eucheuma spinosum* tersedia di sepanjang pantai dengan luas \pm 13.385 Ha dengan produksi areal budidaya bisa mencapai 923.832 ton (Nafie dkk., 2020).

Penelitian Rosni, dkk. (2015) menganalisis kadar protein dari *Eucheuma spinosum* dengan menggunakan metode ekstraksi fenol yang selanjutnya dianalisis menggunakan metode Kjeldahl, dan dihasilkan kadar protein sebanyak 5,8%. Saat ini, beberapa penelitian telah difokuskan pada pengembangan metode baru yang dapat berpotensi meningkatkan hasil ekstraksi (Fleruence dan Levina, 2016).

Metode baru, seperti *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) merupakan metode ekstraksi yang sederhana, jumlah pelarut yang digunakan lebih sedikit, efisien dari segi waktu serta lebih ramah lingkungan (Fleruence dan Levina, 2016; Echave dkk., 2021). Yucetepe, dkk. (2018) telah melakukan penelitian mengenai ekstraksi protein dari

Spirulina platensis dengan menggunakan metode UAE, dan kadar protein yang dihasilkan mencapai 24-29%.

Menurut Wahyuni, dkk. (2020), faktor yang dapat mempengaruhi hasil ekstraksi protein di antaranya yaitu pH dan waktu (durasi) ekstraksi. Adanya perbedaan beberapa variasi pH dan waktu ekstraksi memiliki kemungkinan besar dihasilkannya jumlah kadar protein yang berbeda pula, sehingga perlu dilakukan optimasi untuk menentukan pH dan waktu yang paling optimum dalam mengekstraksi protein dari *Eucheuma sp.*

Response Surface Methodology (RSM) adalah kombinasi metode matematika dan statistik, yang digunakan untuk mengembangkan, mengoptimalkan dan meningkatkan proses (Rejeb dkk., 2021). Keunggulan dari metode RSM di antaranya adalah tidak memerlukan data-data percobaan dalam jumlah yang besar dan tidak membutuhkan waktu lama (Kusumaningrum, 2019). *Central Composite Design* merupakan desain eksperimental orde dua simetris yang paling banyak digunakan pada analisis 2 variabel, karena desain ini dapat memberikan hasil yang optimal berdasarkan efisiensi analisisnya yang tinggi untuk 2 variabel (Bezerra dkk., 2008).

Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan ekstraksi protein dari *Eucheuma spinosum* asal kabupaten Takalar secara *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) yang kemudian dioptimasi melalui pendekatan *Response Surface Methodology* (RSM) dengan menggunakan dua parameter, yakni pH dan waktu ekstraksi.

I.2 Rumusan Masalah

Bagaimana kondisi optimum dari parameter pH dan waktu ekstraksi pada proses ekstraksi protein dari *Eucheuma spinosum* melalui pendekatan *Response Surface Methodology* (RSM)?

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui kondisi optimum dari parameter pH dan waktu ekstraksi pada proses ekstraksi protein dari *Eucheuma spinosum* melalui pendekatan *Response Surface Methodology* (RSM).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Rumput Laut (*Euचेuma spinosum*)

II.1.1 Klasifikasi dan morfologi *Euचेuma spinosum*

Rumput laut (*seaweed*) merupakan tumbuhan laut yang tergolong dalam ganggang (alga) multiseluler divisi *thallophyta*. Berbeda dengan tanaman sempurna pada umumnya, rumput laut tidak memiliki akar, batang dan daun. Rumput laut hidup di dasar samudera yang dapat tertembus cahaya matahari sehingga memiliki beragam warna yang kemudian digunakan untuk menggolongkan rumput laut (Salim, 2015). Secara umum, spesies rumput laut telah diidentifikasi dan dikelompokkan menjadi tiga jenis alga, yakni alga merah (*Rhodophyta*), alga hijau (*Chlorophyta*), dan alga coklat (*Phaeophyta*) (Setiawati dan Sari, 2017)

Euचेuma denticulatum Collins et Hervey atau yang biasa disebut *Euचेuma spinosum* adalah salah satu jenis rumput laut dari kelas *Rhodophyceae* (alga merah). Klasifikasi *Euचेuma spinosum* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Ordo	: Gigartinales
Famili	: Solieriaceae

Genus : *Eucheuma*

Spesies : *Eucheuma spinosum* (Wahyuni dkk., 2021)



Gambar 1. Rumput laut *Eucheuma spinosum* (Wahyuni dkk., 2021)

Rumput laut *Eucheuma spinosum* memiliki ciri-ciri morfologi yaitu bentuk *thallus* silindris, percabangan *thallus* berujung runcing atau tumpul dan ditumbuhi nodulus (Sarita dkk., 2021). Rumput laut ini termasuk jenis alga merah (*Rhodophyta*) yang mempunyai identitas biologis, di antaranya yaitu reproduksinya tidak mempunyai stadia gamet berbulu cambuk, reproduksinya seksual dengan karpogonia dan spermatia, pertumbuhannya bersifat uniaksial (satu sel di ujung *thallus*) dan multiaksial (banyak sel di ujung *thallus*), alat pelekat (*holdfast*) terdiri dari sel tunggal atau sel banyak, memiliki pigmen fikobilin yang terdiri dari fikoeritrin (warna merah), bersifat adaptasi kromatik yaitu memiliki penyesuaian antara proporsi pigmen dengan berbagai kualitas pencahayaan. Dinding selnya tersusun dua lapisan yaitu lapisan dalam yang banyak mengandung selulosa dan lapisan luar yang terdiri dari substansi pektik yang mengandung agar dan karagenan (Subagio dan Kasim, 2019).

II.1.2 Habitat *Euclima spinosum*

Rumput laut di Indonesia banyak dijumpai di perairan pantai yang mempunyai paparan terumbu. Distribusi dan kepadatannya di antaranya tergantung pada tipe dasar perairan dan kondisi hidrografi musim. Sebaran rumput laut di berbagai perairan Indonesia mempunyai habitat yang berbeda-beda, yakni substrat berlumpur, *grave*-pasir kasar dan batu karang (Subagio dan Kasim, 2019).

Pemilihan asal *thallus*, bobot bibit dan parameter lingkungan seperti suhu, kecerahan perairan, kedalaman, salinitas, pH, dan kecepatan arus tentunya berpengaruh terhadap pertumbuhan *Euclima spinosum*. Rumput laut jenis *Euclima spinosum* dapat hidup pada kondisi suhu 28-30°C dengan rata-rata 30°C. *Euclima spinosum* memiliki kisaran toleransi terhadap salinitas berkisar antara 31-32 ppt. Kecepatan arus yang baik untuk budidaya rumput laut ini adalah 20-40 cm/detik. Selain itu, *Euclima spinosum* dapat hidup di kedalaman air 18-20 m dengan pH 7-8 (Kurniawan dkk., 2018).

II.1.3 Reproduksi *Euclima spinosum*

Reproduksi atau perkembangbiakan rumput laut pada dasarnya ada dua macam yaitu secara kawin dan tidak kawin. Pada perkembangbiakan secara kawin, gametofit jantan (spermatia) akan membuahi sel betina pada cabang karpogonia dari gametofit betina. Hasil pembuahan ini akan keluar sebagai karpospora. Setelah terjadi proses

germinasi, maka akan terjadi pertumbuhan menjadi tanaman yang tidak beralat kelamin (sporofit) (Subagio dan Kasim, 2019).

Perkembangbiakan secara tidak kawin terdiri dari penyebaran tetraspora, vegetatif dan konjugatif (Subagio dan Kasim, 2019).

- a. Perkembangbiakan secara tetraspora yaitu dengan cara sporofit dewasa menghasilkan spora (tetraspora) yang sesudah proses germinasi tumbuh menjadi tanaman beralat kelamin yaitu gametofit jantan dan gametofit betina.
- b. Perkembangbiakan secara vegetatif yaitu dengan cara stek. Potongan dari seluruh bagian *thallus* akan membentuk percabangan baru dan berkembang menjadi tanaman dewasa.
- c. Konjugasi yaitu proses peleburan dinding sel dan pencampuran protoplasma antara dua *thallus* (Subagio dan Kasim, 2019).

II.1.4 Kandungan kimia *Eucheuma spinosum*

Penelitian Rosni, dkk. (2015) menghasilkan kadar protein dari *Eucheuma spinosum* sebanyak 5,8% dari bobot kering. Menurut Sofiana, dkk. (2021) *Eucheuma spinosum* mengandung protein 1,09%, karbohidrat proksimat 6,00%, dan lemak 0,82% dihitung dari bobot basah. Ekstrak etanol positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenol, steroid, dan saponin. Metabolit sekunder dari *Eucheuma spinosum* juga berhasil dideteksi oleh Inayah dan Masruri (2020), dengan hasil yaitu gugus terpenoid (triterpenoid dan saponin) dan alkaloid dapat dideteksi pada ekstrak metanol, diklorometana, dan n-heksan. Selain itu, *Eucheuma*

spinosum memiliki kandungan mineral makro yang terdiri dari K (2,88-3,54%), Ca (0,455-0,796%), Mg (0,395-0,582%), Cl (0,112-0,133%), dan Na (0,066-0,074%) serta mineral mikro yang terdiri dari Zn (4,68-26,37 ppm) dan Cu (0,036-0,232 ppm) (Diharmi dkk., 2019).

II.1.5 Potensi pemanfaatan *Eucheuma spinosum*

Rumput laut merupakan salah satu sumber daya hayati yang sangat potensial untuk dikembangkan karena memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Rumput laut dimanfaatkan oleh masyarakat pesisir sebagai sumber makanan dan dapat diproses menjadi berbagai pangan olahan. Dalam dunia industri rumput laut telah dimanfaatkan menjadi produk olahan dan berhasil dikembangkan secara komersial seperti agar-agar, puding, kosmetik, pasta gigi, shampo, kertas, tekstil dan pelumas pada pengeboran sumur minyak (Subagio dan Kasim, 2019).

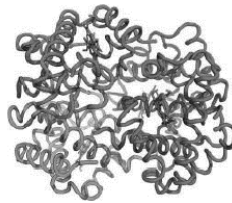
Eucheuma sp. merupakan sumber magnesium yang baik, yang dapat menyediakan 30-90% dari kebutuhan harian per 100 g makroalga kering. Magnesium dalam makroalga merah bertanggung jawab untuk aktivitas hipoglikemik. Kadar magnesium bebas intraseluler telah ditemukan berhubungan erat dan berbanding terbalik dengan kadar glukosa darah puasa. Magnesium merupakan salah satu ion yang paling melimpah dalam sel hidup, yang memainkan peran penting dalam homeostasis insulin dan metabolisme glukosa melalui beberapa reaksi enzimatik dan konsentrasi plasma dalam endokrin. Hal ini menunjukkan bahwa kadar magnesium serum menurun dengan kenaikan kadar HbA1c

dan dengan durasi diabetes tipe 2. Dengan demikian, peningkatan konsumsi makroalga yang kaya magnesium dapat mengurangi resiko diabetes tipe 2 (Zhao dkk., 2017).

II.2 Protein

II.2.1 Definisi dan peranan protein

Protein berasal dari bahasa Yunani yaitu *proteios* yang berarti barisan pertama atau yang paling utama. Protein adalah senyawa organik kompleks yang memiliki bobot molekul tinggi yang merupakan polimer dari monomer-monomer asam amino yang dihubungkan dengan ikatan peptida (Apriyanto, 2020).



Gambar 2. Struktur protein (Wardani dan Sujana, 2020)

Protein merupakan komponen penting atau komponen utama dalam pembentukan dan pertumbuhan sel-sel tubuh. Selain itu, protein juga dapat digunakan sebagai sumber energi apabila tubuh kekurangan karbohidrat dan lemak (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006). Protein memiliki beberapa peranan penting dalam berbagai proses biologi. Peranan tersebut di antaranya yaitu (Apriyanto, 2020):

a. Katalisis enzimatik

Dalam sistem biologi, hampir semua reaksi kimia dikatalis oleh enzim yang sebagian besar merupakan protein.

b. Koordinasi gerak

Kontraksi otot dapat terjadi karena pergeseran dua filamen protein, misalnya pergerakan kromosom saat proses mitosis dan pergerakan sperma oleh flagela.

c. Penunjang mekanis

Ketegangan tulang dan kulit disebabkan oleh kolagen yang merupakan protein fibrosa.

d. Proteksi imun

Antibodi merupakan protein yang sangat spesifik dan dapat mengenal benda asing seperti bakteri, virus maupun organisme lain.

e. Pengaturan pertumbuhan dan diferensiasi

Pada organisme tingkat tinggi, pertumbuhan dan diferensiasi diatur oleh protein faktor pertumbuhan, seperti faktor pertumbuhan saraf yang mengendalikan pertumbuhan jaringan saraf.

f. Membangkitkan dan menghantarkan impuls saraf

Reseptor sel saraf terhadap rangsang spesifik diperantai oleh protein reseptor, contohnya rodopsin. Rodopsin merupakan protein yang sensitif terhadap cahaya yang ditemukan pada sel batang retina. Contoh lainnya adalah protein reseptor yang terdapat pada sinapsis.

g. Transportasi dan penyimpanan

Berbagai molekul kecil dan ion-ion ditranspor oleh protein spesifik, contohnya transportasi oksigen di dalam eritrosit oleh hemoglobin dan transportasi oksigen di dalam otot oleh mioglobin.

II.2.2 Kebutuhan Protein

Berdasarkan *Recommended Dietary Allowance* (RDA), kebutuhan protein untuk orang dewasa sehat dengan aktivitas fisik minimal saat ini adalah 0,8 g protein per kg BB per hari. Berikut tabel kebutuhan protein berdasarkan kelompok usia (Guoyao, 2016):

Tabel 1. Kebutuhan protein makanan dari semua kelompok usia

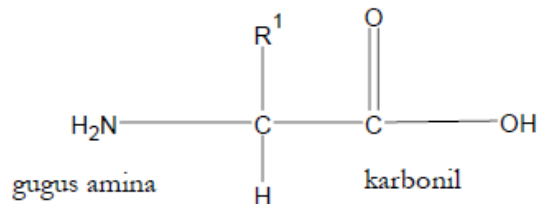
Kelompok	Usia (tahun)	Persyaratan diet protein (g per kg BB per hari)
Bayi	0,30-0,50	1,52
	0,75-1,00	1,50
Anak-anak	1-3	1,10
	4-8	0,95
Remaja	9-13	0,95
	14-18	0,85
Dewasa	≥19	0,80

Sumber: Guoyao. Dietary Protein Intake and Human Health. Online. Royal Society of Chemistry. 2016.

II.2.3 Komponen penyusun protein

Unit dasar penyusun struktur protein adalah asam amino. Protein akan menghasilkan asam-asam amino dengan cara hidrolisis oleh asam atau enzim. Asam amino adalah asam karboksilat yang mempunyai gugus amino. Asam amino sebagai komponen protein mempunyai gugus karbonil dan gugus $-NH_2$ pada atom karbon α dari posisi gugus $-COOH$

(Poedjiadi dan Supriyanti, 2006). Berikut rumus umum untuk asam amino (Apriyanto, 2020):



Gambar 3. Struktur asam amino (Apriyanto, 2020)

Terdapat 20 jenis asam amino yang terdapat dalam molekul protein. Asam-asam amino ini terikat satu sama lain oleh ikatan peptida. Berdasarkan segi pembentukannya, asam amino dapat dibagi dalam dua golongan, yaitu asam amino yang tidak dapat dibuat atau disintesis di dalam tubuh sehingga harus diperoleh dari makanan (asam amino esensial) dan asam amino yang dapat dibuat di dalam tubuh (asam amino non esensial). Pada umumnya, asam amino larut dalam air dan tidak larut dalam pelarut organik non polar seperti eter, aseton dan kloroform (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

II.2.4 Sumber-sumber protein

Sumber protein berasal dari protein hewani dan protein nabati. Sumber protein hewani merupakan protein yang berasal dari hewan, contohnya daging, telur, susu, dan ikan, sedangkan sumber protein nabati merupakan protein yang berasal dari tumbuhan, contohnya kedelai, beras, kacang, jagung, gandum dan buah-buahan. Berikut beberapa sumber protein yang berasal dari bahan makanan serta kadar proteinnya (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

Tabel 2. Bahan makanan sumber protein

Nama bahan makanan	Kadar protein (%)
Daging ayam	18,2
Daging sapi	18,8
Telur ayam	12,8
Susu sapi segar	3,2
Keju	22,8
Bandeng	20,0
Udang segar	21,0
Kerang	8,0
Beras tumbuk merah	7,9
Beras giling	6,8
Kacang hijau	22,2
Kedelai basah	30,2
Tepung terigu	8,9
Jagung kuning (butir)	7,9
Pisang ambon	1,2
Durian	2,5

Sumber: Poedjadi. *Dasar-dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta. 2006. hal. 82

II.2.5 Pemurnian protein

Untuk mengetahui lebih jauh mengenai struktur, sifat-sifat kimia maupun fisika suatu senyawa yang terdapat dalam bahan alam, diperlukan suatu proses untuk mendapatkan senyawa dalam keadaan murni. Proses untuk mendapatkan jenis protein dari bahan alam dalam keadaan murni memerlukan beberapa perhatian khusus karena molekul protein tidak stabil terhadap pelarut organik dan pemanasan pada suhu tinggi (Poedjadi dan Supriyanti, 2006).

Analisis terhadap kadar protein dalam bahan alam perlu dilakukan untuk mendapatkan data mengenai kadar protein yang akan dimurnikan. Untuk mendapatkan protein dari bahan alam tertentu yang dipilih sebagai

sumber protein, contohnya seperti daging atau kedelai, maka protein harus dikeluarkan dari dalam sel-sel yang terdapat pada daging atau kedelai tersebut. Pada umumnya hal ini dilakukan dengan cara memecahkan sel-sel jaringan secara mekanik, misalnya dengan cara dihancurkan menggunakan alat tertentu. Apabila daging atau kedelai telah hancur atau lumat, maka campuran beberapa jenis protein dapat diperoleh dengan melarutkannya dalam air atau pelarut lain (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

Dalam proses ini, perlu diperhatikan dan dijaga agar suhu dan pH larutan tidak merusak protein. Di samping itu protein juga sensitif terhadap asam atau basa dengan konsentrasi tinggi, dan biasanya pemurnian protein dilakukan pada pH yang mendekati netral dengan menggunakan larutan *buffer* tertentu (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

Setelah diperoleh larutan yang berisi beberapa macam protein, maka proses selanjutnya adalah fraksinasi yang merupakan proses memisahkan masing-masing protein dalam campuran secara fraksi demi fraksi. Salah satu cara yang biasa digunakan untuk proses ini yaitu metode pengendapan. Proses pengendapan protein dapat dilakukan dengan menggunakan amonium sulfat berkonsentrasi tinggi atau larutan jenuh. Selain dengan garam, proses pengendapan protein dapat dilakukan dengan menyesuaikan pH titik isoelektrik protein yang diinginkan. Pada titik isoelektrik, kelarutan protein berkurang hingga minimum sehingga protein akan mengendap. Penggunaan pelarut organik

untuk mengendapkan protein juga dapat dilakukan, namun untuk menghindari terjadinya denaturasi maka proses pengendapan dengan cara ini harus dilakukan pada suhu yang rendah (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

II.2.6 Analisis kadar protein metode Kjeldahl

Komposisi rata-rata unsur kimia protein adalah karbon 50%, hidrogen 7%, oksigen 23%, nitrogen 16%, belerang 1-3%, dan fosfor 0-3%. Dengan berpedoman pada kadar nitrogen sebanyak 16%, maka dapat dilakukan penentuan kadar protein dalam suatu bahan pangan (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006). Metode penetapan kadar protein dengan metode Kjeldahl umum digunakan untuk menentukan kandungan protein dalam bahan pangan. Metode ini didasarkan pada pengukuran kadar nitrogen total yang ada di dalam sampel. Untuk mengubah kadar nitrogen menjadi kadar protein maka digunakan angka faktor konversi sebesar $100/16$ atau 6,25 (Yenrina, 2015).

Metode penetapan protein dengan metode Kjeldahl dapat digunakan untuk analisis protein pada semua jenis bahan pangan. Metode ini telah dijadikan sebagai metode resmi yang diakui oleh AOAC (Yenrina, 2015). Metode ini juga cocok digunakan secara semi mikro, karena hanya memerlukan jumlah sampel dan bahan/pereaksi yang sedikit, serta hanya memerlukan waktu analisis yang pendek (Rohman dan Sumantri, 2018).

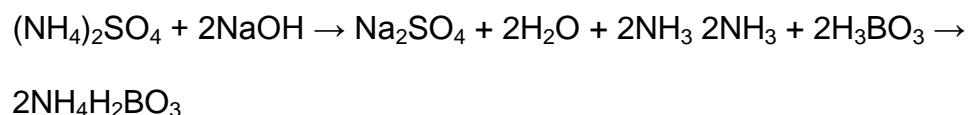
Penetapan kadar protein dengan metode Kjeldahl dibagi menjadi tiga tahap, yakni tahap penghancuran/destruksi, tahap destilasi dan tahap

titrasi. Tahap penghancuran/destruksi dilakukan dengan menambahkan asam kuat, yaitu asam sulfat yang diikuti proses pemanasan. Pada tahap ini akan terjadi pembebasan nitrogen dari sampel. Destruksi dapat ditingkatkan kecepatannya dengan penambahan katalisator seperti tembaga, selenium, atau merkuri. Selama destruksi, protein akan terpecah dan nitrogen akan dikonversi menjadi amonium sulfat. Lama destruksi tergantung dari jenis sampel. Hasil destruksi berupa larutan yang tampak jernih tanpa ada bagian-bagian yang masih berwarna hitam. Reaksi yang terjadi selama proses destruksi yaitu (Yenrina, 2015):



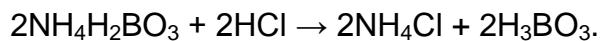
Setelah proses destruksi, dilakukan proses destilasi. Larutan yang mengandung amonium sulfat diperlakukan dengan penambahan alkali natrium hidroksida pekat (atau campuran natrium hidroksida dan natrium tiosulfat apabila merkuri digunakan sebagai katalisator) untuk menetralkan asam sulfat. Dengan adanya NaOH pekat ini, maka amonium sulfat akan dipecah menjadi gas amoniak. Pada tahapan ini, gas amoniak akan menguap dan ditangkap oleh asam borat (H_3BO_3) membentuk $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$.

Reaksi yang terjadi selama proses destilasi yaitu (Yenrina, 2015):



Tahap selanjutnya yaitu titrasi. Pada tahap ini, senyawa $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ dititrasi dengan menggunakan asam klorida encer (0,02 N), sehingga

asam borat terlepas kembali dan terbentuk amonium klorida. Jumlah asam klorida yang digunakan untuk titrasi setara dengan jumlah gas NH_3 yang dibebaskan dari proses destilasi. Reaksi yang terjadi selama proses titrasi yaitu (Yenrina, 2015):



Secara singkat, prinsip dari metode analisis Kjeldahl adalah penetapan protein berdasarkan oksidasi bahan-bahan berkarbon dan konversi nitrogen menjadi amonia. Selanjutnya amonia bereaksi dengan kelebihan asam membentuk amonium sulfat. Larutan dibuat menjadi basa, dan amonia diuapkan untuk kemudian diserap ke dalam larutan asam borat. Nitrogen yang terkandung dalam larutan dapat ditentukan jumlahnya dengan titrasi menggunakan HCl 0,02 N (Yenrina, 2015).

II.3 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi dihentikan ketika telah tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa di luar sel tanaman (dalam pelarut) dengan konsentrasi dalam sel. Setelah proses ekstraksi, sampel dipisahkan dari pelarut dengan cara disaring (Mukhriani, 2014).

II.3.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi

Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil ekstraksi. Faktor-faktor tersebut antara lain:

1. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting yang berperan dalam kualitas dan kadar protein. Peningkatan suhu ekstraksi dapat meningkatkan kelarutan protein dalam ekstrak, namun suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan protein sehingga mempengaruhi kualitas protein (Wahyuni dkk., 2020).

2. Waktu

Semakin lama waktu ekstraksi maka nilai protein akan meningkat dan menurun kembali setelah mencapai waktu tertentu (Wahyuni dkk., 2020). Sebaliknya, waktu ekstraksi yang singkat akan menyebabkan komponen bioaktif tidak terekstrak secara maksimal karena proses difusi tidak berlangsung secara optimal sehingga komponen bioaktif masih banyak yang tertinggal di dalam bahan (Sekarsari dkk., 2019). Menurut Perina, dkk. (2007), penambahan waktu ekstraksi tidak sebanding dengan *yield* yang diperoleh sehingga ekstraksi perlu dilakukan pada waktu yang optimum.

3. pH

Tiap senyawa mempunyai pH tertentu yang menyebabkan aktivitasnya mencapai keadaan optimum. pH perlu diperhatikan agar tidak mengganggu aktivitas protein. Protein sensitif terhadap asam atau basa

dengan konsentrasi tinggi, dan biasanya pemurnian protein dilakukan pada pH yang mendekati netral dengan menggunakan larutan buffer tertentu (Poedjiadi dan Supriyanti, 2006).

4. Ukuran partikel

Semakin kecil ukuran partikel maka semakin besar luas permukaan kontak antara padatan dan pelarut, serta semakin pendek jarak difusi solut sehingga kecepatan ekstraksi lebih besar (Perina dkk., 2007).

5. Pelarut

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi sebaiknya memiliki sifat-sifat sebagai berikut (Perina dkk., 2007):

- a. Mampu menghasilkan kemurnian solut yang tinggi (selektivitas tinggi).
- b. Stabil (*inert*).
- c. Mempunyai viskositas, tekanan uap, dan titik beku yang rendah untuk memudahkan operasi dan keamanan penyimpanan.
- d. Tidak beracun dan tidak mudah terbakar.
- e. Tidak merugikan dari segi ekonomis dan tetap memberikan hasil yang cukup baik.

II.3.2 Metode ekstraksi *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE)

Ultrasonic Assisted Extraction (sonikasi) merupakan salah satu metode ekstraksi yang menggunakan bantuan gelombang ultrasonik (gelombang suara yang memiliki frekuensi ≥ 20 kHz) (Garcia dan Castro, 2003). Metode ini merupakan metode ekstraksi non termal yang dapat

meningkatkan laju transfer massa serta memecahkan dinding sel dengan banyaknya *microcavity* sehingga dapat mengefisienkan waktu dan mengoptimalkan penggunaan pelarut (Handaratri dan Yuniati, 2019). Selain itu, kontak permukaan antara padatan dan cairan lebih luas dan optimal (Buanasari dkk., 2019).

UAE didasarkan pada prinsip ultrasonik kavitasi akustik yang diinduksi melalui serangkaian gelombang kompresi dan penghalusan dalam molekul yang mampu merusak dinding sel tanaman sehingga mendukung pelepasan senyawa bioaktif. Selama sonikasi, kavitasi akustik menghasilkan gelembung kavitasi yang menyebabkan pecahnya dinding sel tanaman dan menyebabkan pelarut dapat tersari dengan mudah ke dalam bahan yang dapat diekstraksi. *Ultrasound* menggunakan efek mekanis yang mendorong pelarut bisa tembus ke dalam matriks sampel sehingga memungkinkan tingginya tingkat difusi dalam melintasi dinding sel (Syahir dkk., 2019).

Beberapa kelebihan lain metode UAE adalah sederhana sehingga mudah diaplikasikan, dapat mengeluarkan ekstrak dari matriks tanpa merusak struktur ekstrak, penggunaan pada temperatur rendah dapat mengurangi kehilangan panas, serta dapat mencegah hilangnya atau menguapnya senyawa yang memiliki titik didih rendah (Handaratri dan Yuniati, 2019).

II.4 Response Surface Methodology (RSM)

Response Surface Methodology (RSM) adalah kombinasi metode matematika dan statistik, yang digunakan untuk mengembangkan, mengoptimalkan dan meningkatkan proses (Rejeb dkk., 2021). *Response Surface Methodology* merupakan metode analisis yang paling banyak digunakan karena memiliki keuntungan utama, yakni dapat memberikan informasi yang lebih banyak dengan menggunakan beberapa percobaan saja (Bezerra et al., 2008). Dengan demikian, keunggulan dari metode RSM di antaranya adalah tidak memerlukan data-data percobaan dalam jumlah yang banyak atau besar dan tidak membutuhkan waktu lama (Kusumaningrum, 2019).

Sebelum menerapkan metodologi RSM, terlebih dahulu perlu dipilih desain eksperimental yang akan menentukan jenis eksperimen yang harus dilakukan. Desain eksperimental yang dipilih harus memastikan bahwa semua variabel yang diteliti dilakukan setidaknya di tiga tingkat faktor. *Central Composite Design* merupakan desain eksperimental orde dua simetris yang paling banyak digunakan pada analisis 2 variabel, karena desain ini dapat memberikan hasil yang optimal berdasarkan efisiensi analisisnya yang tinggi untuk 2 variabel (Bezerra dkk., 2008).

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Waktu dan Lokasi

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2022 di Universitas Hasanuddin yang melibatkan beberapa Laboratorium. Determinasi tanaman dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Lingkungan dan Kelautan Fakultas MIPA, preparasi sampel dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi, ekstraksi protein dilaksanakan di Laboratorium Biofarmaka Fakultas Farmasi dan di Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA, serta *freeze dying* hingga analisis protein dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Terpadu Peternakan Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

III.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah alat penggiling, alat sentrifus dingin, beaker, buret, corong, erlenmeyer, *freeze dryer*, gelas ukur, *HERBS drayer*, *hot plate*, kulkas, labu Kjeldahl, labu tentukur, lemari asam, *magnetic stirrer*, neraca ohaus, pH meter, sonikator, statif&klem, termometer, timbangan analitik serta alat-alat standar.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu *aquadest*, amonium sulfat, asam sulfat pekat, *Eucheuma spinosum*, HCl 0,1 M, HCl 0,0103 N, heksan, kertas saring, kertas perkamen, larutan H₃BO₃ 2%, metil merah, NaOH 30%, NaOH 0,1 M, selenium dan *water one*.