



Optimasi Metode *Microwave-Assisted Extraction* (MAE) untuk Menentukan Kadar Flavonoid Total Alga Coklat *Padina australis*

Bina Lohita Sari^{a*}, Triastinurmiatiningsih^b, Tri Saptari Haryani^b

^a Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Pakuan, Jl. Pakuan, Tegallega, Kecamatan Bogor Tengah, Kota Bogor, Jawa Barat 1614

^b Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Pakuan, Jl. Pakuan, Tegallega, Kecamatan Bogor Tengah, Kota Bogor, Jawa Barat 1614

*Corresponding author

E-mail: binalohitasari@unpak.ac.id

DOI:

Received 27 August 2019, Accepted 12 February 2020, Published 01 March 2020

ABSTRAK

Metode *Microwave-Assisted Extraction* (MAE) digunakan untuk mengekstraksi senyawa flavonoid dari simplisia alga coklat *Padina australis*. Sampel diperoleh dari Pantai Bayah, Banten Indonesia. Kondisi optimal ekstraksi ditentukan dengan *Response Surface Methodology* (RSM). Desain Box-Behnken (BBD) digunakan untuk mengevaluasi pengaruh 3 faktor dengan 3 level yaitu daya *microwave* (300, 450, 600 watt), konsentrasi etanol (30, 50, 70%), dan waktu ekstraksi (7, 8 dan 9 menit) dengan 15 perlakuan yang berbeda. Hasil disain eksperimen dengan BBD menunjukkan kondisi ekstraksi optimum yaitu pada daya *microwave* 414 watt, konsentrasi etanol 50,33% dan waktu ekstraksi 7,89 menit menghasilkan kadar prediksi flavonoid sebesar nilai 0,2963%. Nilai ini mendekati nilai kadar flavonoid yang diperoleh secara eksperimental sebesar 0,2961%, pada kondisi menggunakan daya *microwave* sebesar 450 watt, konsentrasi etanol 50% dengan lama ekstraksi 8 menit. Berdasarkan hasil penelitian, kadar flavonoid total dapat meningkat secara signifikan dengan melakukan optimasi proses MAE menggunakan RSM.

Kata kunci: *Microwave-Assisted Extraction*, kadar flavonoid total, alga coklat, *Padina australis*

ABSTRACT

Optimization of Microwave-Assisted Extraction for Total Flavonoid Content of *Padina australis* Brown Algae. Microwave-Assisted Extraction (MAE) was done to extraction flavonoid from *Padina australis* brown algae simplicial. The sample collected from Bayah coastal waters, Banten Indonesia. Optimum extraction condition was determined by the response surface methodology (RSM). The Box-Behnken design (BBD) was used to evaluate the influence of 3 factors with 3 levels extraction that is microwave power (300, 450, 600 watts), ethanol concentration (30, 50, 70%), and extraction time (7, 8 and 9 minutes) with 15 different runs. The research showed that optimum extraction condition was at 414 watts of microwave power, 50.33% ethanol concentration, and time extraction of 7.89 minutes yielded a predicted value of total flavonoid content of 0.2963%. This value approaches to the flavonoid content obtained experimentally at 0.2961% under condition of 450 watts microwave power, 50% ethanol concentration, and time extraction of 8 minutes. Based on the result, total flavonoid content can be significantly increased by optimizing the MAE process use RSM.

Keywords: Microwave-Assisted Extraction, flavonoid total content, brown algae, *Padina australis*

PENDAHULUAN

Alga coklat (kelas Phaeophyta) secara farmakologi telah digunakan sebagai antibakteri, anti inflamasi dan antitumor karena mengandung antioksidan yang tinggi. Spesies alga coklat banyak ditemukan di wilayah perairan Indonesia, termasuk Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat (Putrinesia *et al.*, 2018). Alga coklat genus *Padina* (Dictyotales, Phaeophyceae) tersebar di laut suhu tropis. Salah satu spesies *Padina* yaitu *P. australis* tersebar di sepanjang perairan Samudra Pasifik termasuk Indonesia (Silberfeld *et al.*, 2013; Pereira, 2018). Kandungan metabolit sekunder pada *P. australis* yaitu flavonoid, fenol hidrokuinon, terpenoid, tanin dan saponin (Maharany *et al.*, 2017).

Flavonoid dalam bahan alam mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, sitotoksitas, antiinflamasi dan antitumor. Hal ini didukung oleh kemampuan flavonoid sebagai antioksidan, yang dapat melindungi tubuh dari radikal bebas dan oksigen reaktif. Posisi gugus hidroksil dan fitur lain pada struktur flavonoid menjadikan senyawa ini bersifat sebagai antioksidan dan menangkal radikal bebas (Saxena *et al.*, 2013).

Metode ekstraksi secara konvensional maupun non konvensional dapat digunakan untuk mengekstraksi matriks dalam tanaman (Alara *et al.*, 2018). *Microwave assisted extraction* (MAE) merupakan metode ekstraksi non konvensional yang digunakan untuk mengekstraksi senyawa bioaktif dari berbagai tanaman karena mempunyai keuntungan seperti tingkat pengeringan yang lebih tinggi, efisiensi energi lebih tinggi, pelarut yang digunakan lebih sedikit dan waktu ekstraksi cepat (Camel, 2000). Interaksi dipol antara molekul air dan pelarut pada microwave menyebabkan suhu dan tekanan pelarut naik, sehingga terjadi difusi dari sampel ke pelarut dengan kecepatan ekstraksi yang tinggi (Spigno and De Faveri, 2009). MAE berperan penting dalam mengekstraksi flavonoid juga senyawa metabolit sekunder lain seperti antosianin, polifenol, dan flavonoid (Routray and Orsat, 2012; Belwal *et al.*, 2018). Kondisi ekstraksi pada bahan alam dapat berbeda dipengaruhi oleh beberapa parameter, seperti pelarut yang digunakan, pengocokan, waktu ekstraksi, rasio solut/pelarut dan suhu (Luthria, 2008; Haminiuk *et al.*, 2012). Metode MAE menggunakan pelarut yang berbeda dapat mengekstraksi senyawa fenolik seperti flavonoid lebih efektif dengan *recovery* dan kualitas yang lebih tinggi dibandingkan metode konvensional (sokletasi, maserasi atau metode lainnya) (Alara *et al.*, 2018).

Optimasi ekstraksi senyawa flavonoid pada bahan alam merupakan hal penting yang membuat analisis menjadi akurat. *Response surface methodology* (RSM) merupakan metode yang efektif untuk mengoptimasi proses ekstraksi. Metode ini juga digunakan untuk mengembangkan, meningkatkan dan mengoptimalkan proses ekstraksi, dan

mengevaluasi efek dari variabel dan interaksinya (Farris *and* Piergiovanni, 2009). Teknik statistik RSM dengan desain Box-Behnken banyak digunakan untuk mengoptimasi kondisi yang banyak digunakan untuk respon tertentu (Szydłowska-Czernia *et al.* 2011).

Commented [WU1]: Tambahkan daftar pustaka

Penelitian ini menentukan efek daya *microwave*, konsentrasi pelarut etanol, dan waktu ekstraksi terhadap kadar flavonoid total pada *P. australis* menggunakan metode RSM sebagai teknik optimasinya.

METODE PENELITIAN

Pembuatan dan Uji Karakteristik Serbuk Simplisia *P. australis*

P. australis yang diperoleh dari Pantai Bayah, Banten dibersihkan, dikering anginkan, lalu dihaluskan dan diayak dengan pengayak mesh 40. Uji karakteristik serbuk simplisia dilakukan untuk menentukan komposisi kimia pada alga *P. australis*. Sebanyak 2 g serbuk simplisia digunakan untuk penentuan kadar air menggunakan oven suhu ± 105 °C selama 3 jam. Selisih berat antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% atau 0,0025 g (Kementerian Kesehatan RI, 2011). Kadar air serbuk simplisia tidak lebih dari 10% (Departemen Kesehatan RI, 1995). Perhitungan % Kadar air merujuk pada Persamaan (1).

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{(\text{berat cawan+isi sebelum di oven}) - (\text{berat cawan+isi setelah di oven})}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

Sebanyak 2 g serbuk ditentukan kadar abu menggunakan tanur suhu ± 650 °C selama 5 jam sampai arang habis. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dan dinyatakan dalam %b/b (Kementerian Kesehatan RI, 2011). Perhitungan % Kadar abu merujuk pada Persamaan (2).

$$\% \text{ Kadar abu} = \frac{(\text{berat krus+abu simplisia}) - (\text{berat krus kosong})}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \quad (2)$$

Pembuatan Ekstrak *Padina australis*

Sebanyak 0,5 g serbuk ditambah etanol 25 mL dengan rasio penambahan 1 : 50 (g/mL), dilakukan pencampuran dengan *magnetic stirrer* selama 20 menit kecepatan 10 RPM. Ekstrak diiradiasi pada kondisi sesuai parameter penelitian. Setelah ekstraksi, ekstrak cair didinginkan untuk menghasilkan ekstrak enap tuang. Supernatant digunakan untuk dianalisis. Pembuatan ekstrak etanol alga coklat *P. australis* dilakukan dengan metode Dang *et al.* (2017) dengan *Microwave- assisted extraction* (MAE) menggunakan

variasi konsentrasi pelarut etanol 30; 50 dan 70%, waktu perlakuan selama 7, 8 dan 9 menit, serta modifikasi daya gelombang mikro sebesar 300; 450 dan 600 watt (Tabel 1). Metode pengolah data yang digunakan dalam proses ekstraksi ini yaitu Box-Bahnken *Respon Surface Methodology* (RSM)

Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak *Padina australis*

Prosedur penentuan kadar flavonoid menggunakan metode spektrofotometri melalui pembentukan kompleks aluminium-flavonoid. Ekstrak cair sebanyak 1 mL ditambahkan 1,5 mL etanol 96%, 0,1 mL aluminium klorida 10%, 0,1 mL natrium asetat 1 M, ditambah akuades sampai 5 mL dan dikocok sampai homogen. Larutan sampel tersebut diinkubasi selama waktu optimum (20 menit) serta diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum (431 nm). Pengulangan dilakukan duplo. Sebagai standar digunakan kuersetin (Sigma Aldrich) konsentrasi 2-10 ppm.

Desain Eksperimen

Pada penelitian ini untuk evaluasi dan optimisasi kondisi ekstraksi MAE digunakan desain Box-Behnken (BBD). Efek daya microwave, watt (X_1), konsentrasi pelarut etanol, % (X_2) dan waktu ekstraksi, menit (X_3). Persamaan polynomial orde dua digunakan agar sesuai dengan data dari variable yang diteliti (Persamaan 3).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

dimana

Y = respons prediksi,

β_0 = konstanta reaksi orde-dua

β_i = koefisien linear

β_{ii} = koefisien kuadrat

β_{ij} = koefisien regresi interaksi antara dua variabel independen

X_i dan X_j adalah variabel independen

Analisis Statistik

Hasil analisis kadar flavonoid total dilakukan uji signifikansi atau kesesuaian model menggunakan ANOVA. Kesesuaian model perlakuan yang memadai ditunjukkan oleh nilai probabilitas (p -value) \leq nilai derajat signifikansi (α 0,05), dan nilai *lack of fit* bila p -value \geq α 0,05. Adanya korelasi data percobaan dengan respon ditentukan menggunakan nilai korelasi determinasi (R^2), presisi kecukupan (*adequacy precision*) dan ketepatan koefisien determinasi (R^2 *adjusted*).

Analisis Fitokimia

Ekstrak cair dengan kadar flavonoid tertinggi diidentifikasi terhadap senyawa fenolik dan flavonoid dengan pereaksi Fe (III) klorida (Horowitz, 1957), uji Shinoda (serbuk Magnesium dan HCl pekat) dan uji Pew (serbuk Zn dan HCl pekat) (Shinoda, 1928; Pew, 1948).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan dan Uji Karakteristik Serbuk Simplisia *P. australis*

Simplisia basah *P. australis* yang dikumpulkan dari Pantai Bayah berbentuk kipas dengan tinggi 3 – 6 cm, lembaran tipis dan terdiri dari dua lapisan. Simplisia serbuk *P. australis* berwarna hijau kecoklatan dengan kadar air dan kadar abu sebesar $9,89 \pm 0,13\%$ dan $28,01 \pm 1,03\%$. Penentuan kadar air dan abu merupakan syarat untuk terstandarisasinya simplisia atau ekstrak supaya menghasilkan material yang berkualitas baik sebelum diproduksi dalam skala industri Pada penelitian ini, penentuan kadar air memenuhi syarat yaitu tidak lebih dari 10% (Departemen Kesehatan RI., 1992).

Kadar abu dalam penelitian ini lebih rendah dari penelitian Santoso *et al.* (2006) yaitu 32,54 g/100 g serbuk kering. Hal ini karena *P. australis* di panen saat musim hujan. Menurut Benjama dan Masniyom (2012) kadar abu pada *G. fisheri* and *G. tenuisipitata* lebih tinggi pada musim kemarau dibandingkan musim hujan. Penentuan kadar abu bertujuan untuk mengetahui senyawa anorganik (unsur logam) dalam *P. australis*. Ikatan ion logam berat dengan flavonoid mempunyai aktivitas sebagai antitumor yang dapat menghambat penggabungan timidin, uridin dan leucin pada sel karsinoma, sehingga dapat menghambat sintesis DNA (Coneac *et al.*, 2008).

Hasil Penentuan Kadar Flavonoid *P. australis* dan Desain Eksperimen

Metode MAE pada penelitian ini menggunakan parameter daya, konsentrasi pelarut dan waktu ekstraksi. Ketiga variabel diidentifikasi dengan tiga faktor desain Box-Behnken dan kemudian proses variabel dioptimasi. Sejumlah 15 data percobaan digunakan untuk mengoptimasi tiga variabel terpilih. Pemilihan jarak parameter ekstraksi berdasarkan percobaan pendahuluan sesuai penelitian Dang *et al.* (2017). Pengaruh ekstraksi berupa daya *microwave* (X_1 : 300-600 watt), konsentrasi etanol (X_2 : 30-70%) 50% dan waktu ekstraksi (X_3 : 7-9 menit). Karena variabel berbeda dalam satuan dan jarak, maka setiap variabel dibuat pada jarak dari -1 sampai +1 untuk mendapatkan respons yang merata (Bas and Boyae, 2007; Setyaningsih *et al.*, 2015). Dimana nilai -1 (daya 300 watt, konsentrasi etanol 30% dan waktu 7 menit), nilai 0 (daya 450 watt, konsentrasi etanol 50 % dan waktu

8 menit), nilai +1 (daya 600 watt, konsentrasi etanol 70 % dan waktu 9 menit. Variabel dan level pada desain respon permukaan ditampilkan pada Tabel 1 dan desain Box-Behnken dan respon kadar flavonoid total yang diteliti pada Tabel 2.

Tabel 1. Variabel dan level pada desain respon permukaan

Variabel Bebas	Simbol	Level		
		-1	0	+1
Daya <i>Microwave</i> (watt)	X1	300	450	600
Konesntrasi Etanol (%)	X2	30	50	70
Waktu Ekstraksi (menit)	X3	7	8	9

Tabel 2. Data percobaan dan prediksi kadar flavonoid dengan desain Box-Behnken

No	Faktor			Respons		Selisih
	Daya (watt)	Konsentrasi pelarut (%)	Waktu ekstraksi (menit)	Kadar Flavonoid (Eksperimental)	Kadar Flavonoid (Prediksi)	
1	300	30	8	0,2031	0,1998	
2	300	50	7	0,2199	0,2311	0,0033
3	300	50	9	0,2140	0,1960	- 0,0112
4	300	70	8	0,2031	0,2180	- 0,0100
5	450	30	7	0,2066	0,1986	0,0080
6	450	30	9	0,1273	0,1485	- 0,0212
7	450	50	8	0,2895	0,2930	- 0,0035
8	450	50	8	0,2961	0,2930	0,0031
9	450	50	8	0,2934	0,1703	0,0004
10	450	70	7	0,1916	0,1662	0,0213
11	450	70	9	0,1583	0,1819	- 0,0079
12	600	70	8	0,1920	0,1817	0,0101
13	600	50	7	0,1638	0,1626	- 0,0179
14	600	50	9	0,1738	0,1626	0,0112
15	600	70	8	0,1499	0,1531	- 0,0032

Analisis Statistik

Setelah menentukan kondisi terbaik dari BBD dengan 15 perlakuan, maka dilakukan optimasi ke tiga faktor independent terhadap kadar flavonoid total dari dari *P. australis*. Hubungan antara prediksi respon Y dan variabel uji dapat dijelaskan dengan persamaan polinomial orde dua yang ditunjukkan pada Persamaan (4).

$$Y = 0,29 - 0,021A - 0,002650B - 0,014C - 0,012A*B + 0,003975A*C + 0,012B*C - 0,041A^2 - 0,063B^2 - 0,059C^2 \quad (4)$$

Keterangan : Y = Kadar Flavonoid (% atau g/100 g)

A = Daya gelombang mikro (watt)

B = Konsentrasi pelarut etanol (%)

C = Waktu ekstraksi (menit)

Analisis varians (ANOVA) dengan model polinomial kuadratik untuk menentukan kadar flavonoid disajikan pada Tabel 3. Model ini menghasilkan koefisien determinasi (R^2) adalah 0,9426 atau 94,26% berdasarkan model polinomial kuadratik yang diperoleh. Hal ini menunjukkan model sangat sesuai dan dapat digunakan untuk memprediksi kadar flavonoid dengan MAE Koefisien determinasi $R^2_{adj} = 0,8394$ atau 83,94%, dimana nilai $R^2 > 70\%$ menunjukkan nilai observasi dan prediksi cukup tepat dalam memberikan kedekatan hasil. Nilai-F ($F = 9,13$) dan nilai-p 0,0127 ($p > 0,00001$) menunjukkan model kurang signifikan. Nilai-F *lack of fit* 65,03 dan nilai-p 0,0152 lebih kecil dari α (0,05) menunjukkan signifikan artinya adanya ketepatan model linier orde pertama (He *et al.*, 2018).

Tabel 3. Statistik regresi dan *analysis of variance* (anova) untuk kadar flavonoid

Source	Sun of Square	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	0,036	9	3,963E-003	9,13	0,0127
Residual	2,170E-003	5	4,340E-004		
Lack of Fit	2,148E-003	3	7,160E-004	65,03	0,0152
Pure Error	2,170E-003	2	1,101E-005		
Cor Total	0,038	14			

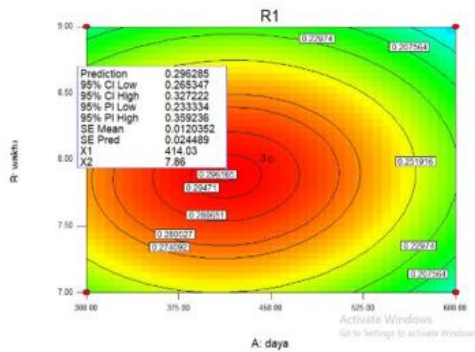
Nilai koefisien determinasi (R^2) adalah 0,9426 atau 94,26% dan koefisien determinasi *adjust* $R^2_{adj} = 0,8394$

Optimasi Kadar Flavonoid

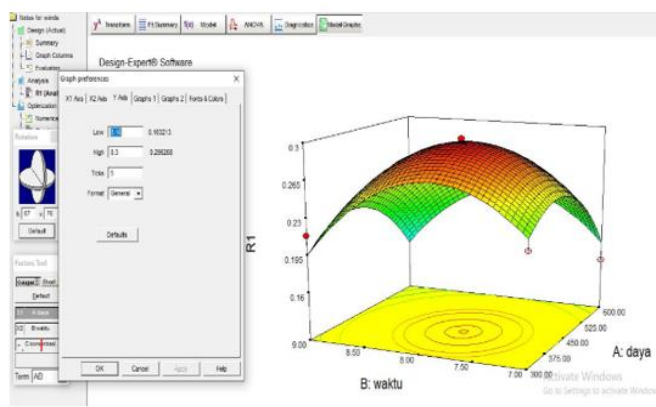
Respons permukaan 3D dan *contour plot* 2D dibuat dengan bantuan perangkat lunak Design-Expert untuk menentukan hubungan antara daya, konsentrasi pelarut dan

waktu ekstraksi terhadap kadar flavonoid. Pengaruh interaksi antara daya dan waktu ekstraksi, bila dinaikkan dari 300-450 watt dan 7-9 menit maka kadar flavonoid total meningkat (Gambar 1). Naiknya konsentrasi pelarut etanol membuat simplisia lebih mudah larut dan lebih terdifusi kedalam pelarut pengestraksi. Pada Gambar 2 respon permukaan menunjukkan adanya hubungan antara daya dan waktu terhadap kadar flavonoid total yang pada waktu ekstraksi 7-8 menit.

Analisis statistik dan optimasi numerik menyatakan kondisi optimum yaitu pada daya 412 watt, konsentrasi pelarut etanol 50,33%, waktu ekstraksi 7,89 menit dengan prediksi kadar flavonoid pada keadaan optimum menghasilkan 0,2963% (Gambar 1 dan 2). Validitas model konstruksi di verifikasi dengan koefisien determinasi ($R^2 = 0,9426$, $R^2_{adj} = 0,8394$) dan nilai F untuk *lack of fit* ($p > 0,05$).



Gambar 1. Contour plot menunjukkan efek interaksi dari daya dan waktu ekstraksi terhadap kadar flavonoid total *P. australis*






Gambar 2. Respon permukaan menunjukkan efek interaksi daya dan waktu ekstraksi terhadap kadar flavonoid total *P. australis* pada kondisi optimum

Commented [AA2]: Hapus data, ganti dengan data gambar yang beresolusi tinggi

Hasil Analisis Fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan dari ekstrak cair dengan kadar flavonoid tertinggi yaitu hasil ekstraksi MAE daya *microwave* 414 watt, konsentrasi etanol 50,33% dan waktu ekstraksi 7,89 menit. Ekstrak cair memberikan hasil positif untuk golongan senyawa fenolik (warna hijau kebiruan), dan flavonoid (warna merah muda), seperti yang ditunjukkan dalam Tabel 4).

Tabel 4. Hasil Analisis Fitokimia

Pereaksi	Hasil pengamatan	Keterangan	
Fe(III)klorida	Hijau kebiruan	Positif senyawa fenolik	
Serbuk Mg dan HCl pekat (Uji Shinoda)	Merah muda	Positif senyawa flavonoid	
Serbuk Zn dan HCl pekat (Uji Pew)	Merah muda	Positif senyawa flavonoid	

P. australis merupakan salah satu kelompok alga coklat (*Phaeophyta*) yang mengandung senyawa fenolik, pigmen (fukosantin), polisakarida tersulfatasi (fukoidan), bromofenol dan meroditerpenoid. Penggolongan senyawa fenolik yaitu fenol sederhana, asam fenolik, kumarin, flavonoid, tanin, lignan, dan lignin. Kandungan fenolik pada alga coklat lebih tinggi bila dibandingkan jenis alga lain dan berkhasiat sebagai antioksidan antihistamin, antidiabetes, antimutagen, antikanker dan mencegah penyakit jantung (Dang *et al.*, 2017; Suharto *et al.*, 2017). Golongan fenolik terbesar yaitu flavonoid. Salah satu golongan flavonoid yaitu flavonol aglikon dan glikon yang mengandung cincin kroman fenolat gallokatekin, katekin galat, dan epikatekin yang berlimpah pada alga (Chakaborty *et al.*, 2015).

KESIMPULAN

Pada *penelitian* ini, proses ekstraksi dengan MAE digunakan untuk mengoptimasi kadar flavonoid total dari simplisia *P. australis*. Tiga *levels* penelitian dengan desain Box-Behnken yaitu daya *microwave*, konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi. Pada penelitian ini, desain Box-Behnken memberikan model regresi polinomial orde kedua dengan nilai korelasi $R^2 = 0,9426$ yang menunjukkan bahwa model polinomial kuadratik dapat digunakan untuk mengoptimasi metode MAE terhadap kadar flavonoid total. Kondisi optimum kadar flavonoid total hasil perhitungan RSM terhadap daya, konsentrasi etanol dan waktu ekstraksi adalah 414 watt, 50,33% dan 7,89 menit. Berdasarkan kondisi eksperimental, kadar flavonoid total adalah 0,2961% mendekati hasil prediksi yaitu 0,2963% yang mengindikasikan kesesuaian model yang digunakan dan keberhasilan RSM dalam mengoptimalkan kondisi ekstraksi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jendral Penguatan Riset & Pengembangan, Kemenristekdikti Nomor 110/SPH2H/LT/DRPM/2019 yang telah membiayai penelitian kami pada Hibah Terapan 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Alara, O.R., Abdurahman, N.H., and Olalere, O.A., 2018. Ethanolic extraction of bioactive compounds from *Vernonia amygdalina* leaf using response surface methodology as an optimization tool. *Journal of Food Measurement and Characterization* 12, 1107-1122. doi: 10.1007/s11694-018-9726-3.
- Bas, D., and Boyaci, I.H., 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78(3), 836-45. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024.
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., and Atanasov, A. G. A., 2018. Critical Analysis of Extraction Techniques Used for Botanicals: Trends, Priorities, Industrial Uses and Optimization Strategies. *Trac- Trends Analytical Chemistry* 100, 82–102. doi: 10.1016/j.trac.2017.12.018.
- Benjama, O. and P. Masniyom., 2012. Biochemical composition and physicochemical properties of two red seaweeds (*Gracilaria fisheri* and *G. tenuistipitata*) from the Pattani Bay in Southern Thailand. *Songklanarin Journal of Science and Technology* 34(2), 223-230.

- Camel, V., 2000. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends Analytical Chemistry* 19, 229–248. doi: 10.1016/S0165-9936(99)00185-5.
- Chakaborty, K., Joseph, D., and Praveen, N.K., 2015. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. *Journal of Food Science Technology* 54, 1924-1935. doi: 10.1007/s13197-013-1189-2
- Coneac, G., GaŃănu, E., Hădărugă, D.I., Hădărugă, Pînzaru, I.A., Bandur, G., Urşica, Păunescu, V., and Gruia, A., 2008. Flavonoid contents of Propolis from the West side of Romania and correlation with the antioxidant activity. *Chemical Bulletin* 53(67), 1-2.
- Dang, T.T., Bowyer, M.C., Van Altena, I.A., and Scarlett, C.J., 2017. Optimum conditions of microwave-assisted extraction for phenolic compounds and antioxidant capacity of the brown alga *Sargassum vestitum*. *Separation science and Technology* 53, 1711–1723. doi: 10.1080/01496395.2017.1414845.
- Departemen Kesehatan R.I., 1992. *Cara Pembuatan Obat Tradisional Yang Baik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995. *Farmakope Indonesia*, Edisi IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Farris, S., and Piergiovanni, L., 2009. Optimization of manufacture of almond paste cookies using response surface methodology. *Journal of Food Process Engineering* 32(1), 64–87. doi: 10.1111/j.1745-4530.2007.00203.x.
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., and Peralta, R. M. 2012., Phenolic compounds in fruits – An overview. *International Journal of Food Science & Technology* 47(10), 2023–2044. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x.
- He, Q., Du, B., and Xu, B., 2018. Extraction optimization of phenolics and antioxidants from Black Goji Berry by Accelerated Solvent Extrator using response surface methodology. *Applied Sciences* 8, 1905. doi: 10.3390/app8101905.
- Horowitz, R.M., 1957. Flavonoids of citrus. II. Isolation of a new flavonol from lemons. *Journal of The American Chemical Society* 79, 6561.
- Kementrian Kesehatan R.I., 2011. *Suplemen II Farmakope Herbal Indonesia* Edisi I. Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, Jakarta.
- Luthria, D. L., 2008. Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry* 107(2), 745–752. doi:10.1016/j.foodchem.2007.08.074.
- Maharany, F., Nurjanah., Suwandi, R., Anwar, E., and Hidayat, T., 2017. Kandungan Senyawa Bioaktif Rumput Laut *Padina australis* dan *Euclima cottonii* Sebagai Bahan Bahku Krim Tabir Surya. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 20(1), 10-17. doi: 10.17844/jphpi.v20i1.16553.
- Pereira, L., 2018. *Therapeutic and Nutritional Uses of Algae*. CRC Press, Portugal.
- Pew, J.C., 1948. A flavonone from Douglas-fir heartwood. *Journal of The American Chemical Society* 70, 3031–3034. doi: 10.1021/ja01189a059.
- Putrinesia, I., Tobing, Y.P.L., Asikin, N., and Rahmalia, W., 2018. Formulasi dan uji aktivitas krim pengkelat merkuri berbahan dasar ekstrak etanol alga coklat (*Sargassum sp.*). *Alchemy: Jurnal Penelitian Kimia* 14(1), 152-163. doi:

10.20961/alchemy.14.1.12242.152-163.

- Routray, W., and Orsat, V., 2012. *Microwave-Assisted Extraction of Flavonoid: A Review. Food Bioprocess Technology* 5, 409-424. doi: 10.1007/s11947-011-0573-z.
- Santoso, J., S. Gunji, Y. Yoshie-Stark, and T. Suzuki., 2006. Mineral content of Indonesian seaweeds and mineral solubility affected by basic cooking. *Food Science and Technology Research* 12(1), 59-66.
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D. and Gupta, A., 2013. Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1(6), 168-180.
- Setyaningsih, W., Saputro, I.E., Palma, M., and Barroso, C.G., 2015. Optimisation and validation of the *microwave*-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food Chemistry* 169, 141-49. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.128.
- Silberfeld, T. and Bittner, L., 2013. Species diversity, phylogeny and large scale biogeographic patterns of the genus *Padina* (Phaeophyceae, Dictyotales). *Journal of Phycology* 49, 130-142. doi: 10.1111/jpy.12027.
- Spigno, G., and De Faveri, D.M., 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering* 93, 210-217. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2009.01.006.
- Shinoda, J., 1928. A new biologically active flavone glycoside from the roots of *Cassia fistula* Linn. *Journal of The Pharmaceutical Society of Japan* 48, 214-220.
- Silberfeld, T., Bittner, L., Garcia, C.F., Cruaud, C., Rousseau, F., Reviers, B., Leliaert, F., Payri, C.E., and Clerk, O.D., 2013. Species diversity, phylogeny and large scale biogeographic patterns of the genus *Padina* (Phaeophyceae, Dictyotales). *Journal of Phycology* 49, 130-142. doi.org/10.1111/jpy.12027.
- Suharto, K.F., Soetjipto, H., dan Martono, Y., 2017. Pengaruh lama fermentasi tempe terhadap kandungan total senyawa fenolik dan isoflavon genistein. *Alchemy: Jurnal Penelitian Kimia* 13(2), 230-240. doi: 10.20961/alchemy.v13i2.5094.