

Optimasi Metode Ultrasonik untuk Ekstraksi Minyak Biji Labu Kuning (*Cucurbita maxima*)

*The Optimization of Ultrasonic Method for the Extraction of Pumpkin seed (*Cucurbita maxima*)*

Irnawati^{1,2}, Sugeng Riyanto¹, Sudibyo Martono¹, dan Abdul Rohman^{1,3*}

¹Departmen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

²Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo Kendari, Sulawesi Tenggara 93232 Indonesia

³Institute for Halal Industry and System (IHIS), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

*Corresponding Author: Email: abdulrohmanugm@gmail.com

Received: 20 January 2021; Revised: 1 February 2021; Accepted: 12 February 2021; Published: 14 February 2021

Abstract: The purpose of the present study was to determine the optimal ultrasound-assisted extraction (UAE) conditions (sample-to-solvent ratio, ultrasonic power, and time) for the extraction of pumpkin seed oil. Pumpkin seed oil was analyzed for yield, 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity, and total phenolic content. Soxhlet extraction methods were assessed for comparison. The Box Behnken design (BBD) was applied to optimize UAE conditions. The optimum UAE conditions was obtained using sample-to-solvent ratio of 1:10 mL g⁻¹, ultrasonic power of 150 Watt in 15 min extraction time. Compared with Soxhlet extraction methods, UAE exhibited lower oil yield and total phenolic content but had higher DPPH scavenging activity. The advantage of ultrasonic-assisted extraction were clearly reduction of extraction duration.

Keywords: pumpkin seed oil, The Box Behnken design (BBD), optimize, ultrasonic-assisted extraction.

Abstrak: Tujuan penelitian ini adalah menentukan kondisi optimal *ultrasound-assisted extraction* (rasio sampel-pelarut, besarnya daya, dan waktu) untuk ekstraksi minyak biji labu kuning. Minyak biji labu kuning dihitung rendemen minyak yang dihasilkan, aktivitas penangkapan radikal 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl DPPH, dan kadar fenol totalnya. Ekstraksi minyak dengan metode *Soxhlet* juga dilakukan sebagai pembandingan. *Box Behnken design* (BBD) digunakan untuk optimasi kondisi *ultrasound-assisted extraction* (UAE). Kondisi optimum ekstraksi dengan UAE diperoleh pada rasio sampel-pelarut 1:10 mL g⁻¹, daya 150

Watt dengan lama ekstraksi 15 menit. Ekstraksi minyak biji labu kuning secara UAE menghasilkan rendemen dan kadar fenol total lebih rendah dibanding metode *Soxhlet* tetapi memiliki aktivitas menangkap radikal DPPH lebih tinggi. Keuntungan dari metode UAE adalah waktu ekstraksi yang cepat.

Keywords: Minyak biji labu kuning, Box Behnken design (BBD), optimasi, *ultrasonic-assisted extraction*

1. Pendahuluan

Labu kuning (*Cucurbita maxima*) merupakan tanaman yang dikelompokkan pada family Cucurbitaceae yang dapat hidup secara luas di daerah tropis maupun subtropis. Di industri makanan, labu kuning dimanfaatkan untuk produksi *juices*, *jams* dan alcohol [1]. Produk samping dari produksi buah labu kuning ini berupa biji labu [2]. Biji labu kuning mengandung asam-asam lemak (didominasi oleh asam linoleat, asam oleat, asam stearat, dan asam palmitat), α, γ -tokoferol, fenol, karotenoid, fitosterol [1-7].

Pemanfaatan kandungan senyawa bioaktif biji labu kuning untuk pengobatan telah banyak dilaporkan, diantaranya sebagai antioksidan [1,3,5], memperbaiki sistem urinaria pada manusia yang mengalami *overactive bladder* [8], memperbaiki *postprandial glycemic* [9], imunomodulator [10], menghambat sitotoksitas dan genotoksitas [11], memicu pertumbuhan dan enzim proteolitik [12], menghambat sel kanker [13], antidiabetes [14].

Banyaknya manfaat minyak biji labu kuning (MBLK) untuk kesehatan manusia tidak terlepas dari kualitas minyak yang digunakan. Arhancet dkk. [15] melaporkan bahwa proses preparasi sampel menentukan komposisi dan stabilitas dari minyak nabati yang dihasilkan, terutama pada minyak nabati yang mengandung asam lemak tak jenuh seperti asam linoleat. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode ekstraksi yang tepat untuk ekstraksi minyak biji labu kuning. *Ultrasound-assisted extraction* merupakan solusi yang ditawarkan untuk menjaga kualitas minyak biji labu kuning yang kaya akan asam linoleat. Ada beberapa metode lain yang bisa digunakan misalnya *microwave-assisted aqueous enzymatic extraction* [1] dan *supercritical fluid extraction* [2,7], namun kedua metode tersebut rumit dalam pengerjaannya.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Biji labu kuning diperoleh dari hasil panen buah labu kuning pada lahan pertanian masyarakat Palagan, Kota Yogyakarta. Buah yang telah dikumpulkan dibelah, diambil bijinya, kemudian biji dicuci dengan air mengalir dan ditiriskan. Biji labu kuning kemudian dikering anginkan selama 2x24 jam pada suhu ruang (kadar air kurang dari 10%). Biji diserbukkan dengan bantuan blender (Philips), selanjutnya serbuk disimpan dalam wadah tertutup pada suhu 4°C sebelum digunakan. Semua pelarut dan reagen yang digunakan adalah *pro-analytical grade*.

2.2. *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE)

Ultrasonik (ELMA *ultrasonic cleaning* tipe T760/DH) dengan frekuensi 40 kHz digunakan untuk ekstraksi minyak biji labu kuning. Sebanyak 20 gram serbuk biji labu kuning dalam 200 mL pelarut *n*-heksana diekstraksi selama 15 menit dengan daya sebesar 150 Watt. Setelah ekstraksi selesai, fase cair dan fase padat dipisahkan dengan bantuan sentrifuse (Thermo Scientific) selama 10 menit dengan kecepatan 2500 *rpm*. Selanjutnya, pelarut dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* (IKA-Werke) pada suhu 40°C untuk mendapatkan minyak biji labu kuning [16].

2.3. *Ekstraksi Soxhlet*

Ekstraksi minyak biji labu kuning metode *Soxhlet* berdasarkan metode AOAC [17]. Sebanyak 5 gram serbuk biji labu kuning dengan 100 pelarut *n*-heksana dalam perangkat alat

Soxhlet diekstraksi selama 8 siklus pada suhu 70-80°C. Setelah ekstraksi selesai, pelarut diuapkan menggunakan *rotary evaporator* (IKA-Werke) pada suhu 40°C untuk mendapatkan minyak dari biji labu kuning.

2.4. Rendemen

Rendemen minyak dihitung berdasarkan persamaan berikut :

$$\text{Rendemen minyak (\%)} = \left(\frac{M_1 - M_0}{M_2} \right) \times 100 \quad (1)$$

Keterangan

M₀ : Berat wadah kosong (g)

M₁ : Berat wadah setelah evaporasi (g)

M₂ : Berat sampel (g)

2.5. Pengukuran penangkapan radikal 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Pengujian aktivitas penangkapan radikal DPPH berdasarkan metode Brad-William dkk. [18]. MBLK sebanyak 0,1 mL ditambahkan dengan 1,0 mL larutan DPPH dalam metanol (0,4 mM) dan 3,9 mL metanol. Campuran selanjutnya divorteks dan diinkubasi selama 30 menit. Penurunan absorbansi diukur pada panjang gelombang 515 nm (panjang gelombang maksimal DPPH) terhadap blanko (0,1 mL MBLK ditambahkan dengan 4,9 mL metanol). Dilakukan juga pengukuran kontrol yang terdiri atas 1,0 mL DPPH 0,4 mM dan 4,0 mL metanol. Semua pengukuran dilakukan dengan 3 replikasi.

$$\text{Persen penangkapan radikal DPPH} = \frac{(A_{\text{kont}} - A_{\text{sa}})}{A_{\text{kont}}} \times 100$$

(2) Keterangan

A_{kont} : Absorbansi kontrol

A_{sa} : Absorbansi Sampel

Tabel 1. Faktor dan level yang digunakan untuk optimasi metode *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE)

Faktor	level			Satuan
	-1	0	1	
Rasio sampel-pelarut (A)	1 : 15	1 : 10	1:5	g mL ⁻¹
Daya (B)	50	150	250	Watt
Lama ekstraksi (C)	10	15	20	menit

2.6. Kadar fenol total

Kadar fenol total MBLK ditetapkan menggunakan spektrofotometer (Hitachi UV-Vis Spectrophotometer model U-1900). Sebanyak 0,4 gram MBLK ditambahkan dengan 1 mL *n*-heksana dan 1 mL metanol:air (80:20). Campuran divortex selama 1 menit. Sebanyak 200 µL fase metanol dimasukan dalam labu takar 10 mL, ditambahkan dengan 0,4 mL reagen *folin-Ciocalteu*, biarkan selama 5 menit. Tambahkan dengan 4,0 mL Na₂CO₃ kemudian digojok dan tambahkan dengan aquabidestilata hingga tanda tera. Diamkan selama 60 menit. Serapan sampel dibaca pada panjang gelombang maksimal yaitu 750 nm terhadap blanko (0,4 mL reagen *folin-Ciocalteu* dan aquabidestilata). Kurva baku asam galat disiapkan dari konsentrasi 0,0625-4,0 µL/mL.

2.7. Desain eksperimental

Optimasi kondisi *ultrasound-assisted extraction* MBLK menggunakan *Box Behnken design* (BBD). Terdapat 3 independen faktor meliputi rasio sampel-pelarut (A), daya yang digunakan (B), dan waktu (C) yang masing-masing terdiri atas 3 level. Desain level dari independen faktor dapat dilihat **Tabel 1**. Matriks Desain BBD terdiri atas 16 kombinasi kondisi ekstraksi dengan 4 sentral poin (**Tabel 2**). Data yang dihasilkan berupa respon rendemen, aktivitas penangkapan radikal DPPH, dan kadar fenol total dari setiap kondisi ekstraksi dianalisis menggunakan model matematika *second-order polynomial*:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_{0i}X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii}X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij}X_iX_j + \varepsilon \tag{3}$$

Dimana Y merupakan prediksi dari respon, β_i adalah *linear coefficient*, β_{ii} *quadratic coefficient* dan β_{ij} adalah *interaction coefficient*. Pada model ini X_i, X_1, \dots, X_k merupakan *independent* faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi, ε merupakan *random error*. Keberhasilan model yang dikembangkan ditentukan pada nilai koefisien R². Signifikansi dari model koefisien regresi dievaluasi menggunakan *analysis of variance*. Selanjutnya, kurva 3 dimensi dari *response surface plots* yang diperoleh digunakan untuk interpretasi efek interaksi antara independent faktor terhadap variabel respon (*Design Expert*).

Tabel 2. Matriks desain BBD dengan 3 faktor dan 3 level

No.	Rasio sampel-pelarut (A)	Daya (B)	Waktu ekstraksi (C)
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0

2.8. Perbandingan metode ekstraksi

Membandingkan metode UAE pada kondisi optimum dan metode *Soxhlet* terhadap variabel respon rendemen, aktivitas penangkapan radikal DPPH, dan kadar fenol total.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Rendemen minyak

Rendemen minyak yang dihasilkan dari metode UAE berkisar 17 hingga 34% (**Tabel 3**). Pada metode UAE rendaman terbanyak dihasilkan dari rasio sampel-pelarut 1:10, daya terbesar 250 Watt dengan lama ekstraksi 20 menit. Pada metode UAE, besarnya daya yang diberikan dapat meningkatkan *cavitation effect* [19] dan menginduksi perubahan struktur biji berupa kerusakan dinding sel, penurunan ukuran partikel dan peningkatan luas permukaan sampel yang dapat memudahkan penetrasi pelarut dalam mengekstraksi minyak [20,21]. Selain itu, ultrasound juga bisa menyebabkan *swelling* dan *hydration* sel dan dapat memperbesar *pores* pada dinding sel sehingga memudahkan proses difusi [22,23]. Rendemen maksimum diperoleh setelah ekstraksi selama 10 menit, penambahan waktu hingga 20 menit dengan daya tertinggi (250 Watt) tidak memberikan efek peningkatan berat minyak yang dihasilkan. Lama ekstraksi menjadi salah satu variabel yang penting dalam ekstraksi minyak nabati, waktu yang lama tidak memaksimalkan proses ekstraksi. Hal ini sejalan dengan pernyataan Ortega-Ortega dkk. [16] untuk ekstraksi minyak biji *cactus pear* dimana rendamen minyak meningkat dengan bertambahnya waktu yang digunakan hingga pada menit ke 10 dan terjadi ekuilibrium setelah penambahan waktu selama 15 menit.

Tabel 3. Rendemen penangkapan radikal DPPH, dan kadar fenol total MBLK yang dihasilkan dari metode *Ultrasonic-Assisted Extraction*

No.	Rasio		Lama ekstraksi (menit)	Respon		
	sampel-pelarut (mL)	Daya (Watt)		Rendemen (%w/w)	Penangkapan radikal DPPH (%)	Fenol Total ($\mu\text{g g}^{-1}\text{oil}$)
	g^{-1}					
1	1:15	50	15	27,51	50,84	42,73
2	1:5	50	15	19,89	22,33	72,35
3	1:15	250	15	32,03	43,61	11,32
4	1:5	250	15	30,32	52,05	54,58
5	1:15	150	10	28,29	50,24	62,70
6	1:5	150	10	18,04	37,51	47,39
7	1:15	150	20	27,48	55,38	92,98
8	1:5	150	20	17,75	41,04	65,03
9	1:10	50	10	25,95	54,70	56,24
10	1:10	250	10	34,35	61,45	30,73
11	1:10	50	20	30,15	59,64	67,34
12	1:10	250	20	34,56	61,00	80,65
13	1:10	150	15	32,24	55,90	34,61
14	1:10	150	15	28,31	61,00	60,13
15	1:10	150	15	29,49	44,78	83,98
16	1:10	150	15	28,56	39,88	47,37

3.2. Optimasi kondisi ekstraksi

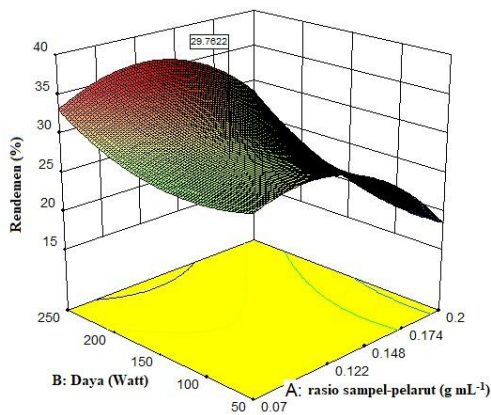
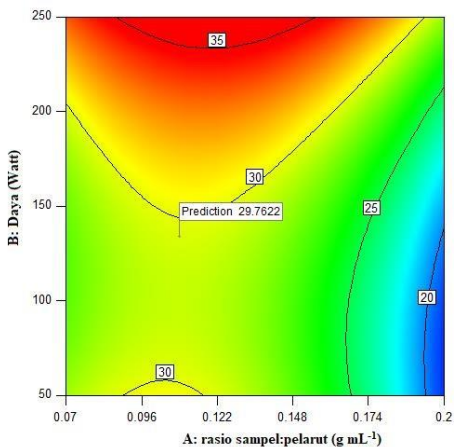
Desain optimasi BBD ekstraksi MBLK metode UAE dan respon dari setiap parameter yang ditetapkan dapat dilihat pada **Tabel 3**. Hasil perhitungan *Response Surface Methodology* (RSM) terhadap model regresi dari setiap parameter yang ditetapkan dilihat dari *lack of fit test*. Model matematika ini digunakan untuk memprediksi setiap respon yang diberikan dari

setiap parameter kondisi ekstraksi MBLK berdasarkan nilai signifikansinya. Nilai signifikansi yang dapat diterima adalah $p < 0,05$ [24]. Hasil perhitungan *lack of fit test* diperoleh bahwa pada respon rendemen dan respon aktivitas penangkapan radikal DPPH MBLK menggunakan model *regresi quadratic* sedangkan untuk respon kadar fenol total menggunakan regresi linear. Model regresi ini selanjutnya di uji dengan ANOVA. Hasil uji ANOVA (**Tabel 4**) terhadap model yang dikembangkan diperoleh model *regresi quadratic* respon rendemen dengan nilai $p = 0,0075$ ($p < 0,05$) dan nilai r^2 0,9301, serta adj r^2 0,8253 ($r^2 > 0,7$). Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa model regresi pada respon rendemen dapat digunakan untuk memodelkan kondisi optimal ekstraksi MBLK metode UAE, sedangkan model regresi untuk ke-2 respon lainnya (aktivitas penangkapan radikal DPPH dan kadar fenol total) tidak dapat digunakan.

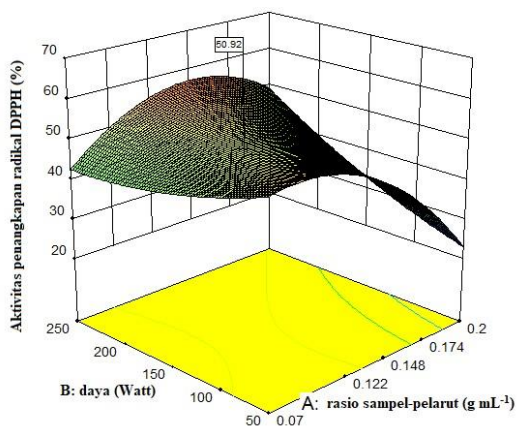
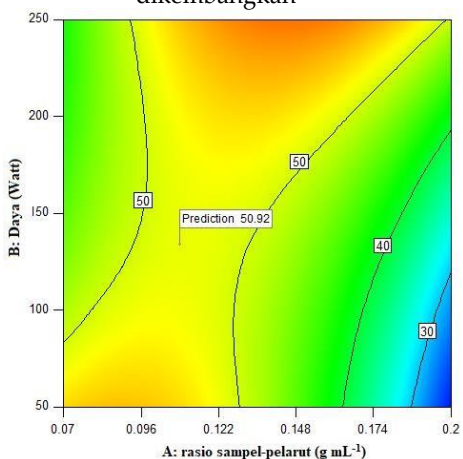
Tabel 4. Hasil uji ANOVA model *regresi quadratic* respon rendemen

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	376,19	9	41,80	8,87	0,0076	<i>significant</i>
A-Rasio Sampel:Pelarut	107,38	1	107,38	22,80	0,0031	
B-Daya	96,33	1	96,33	20,45	0,0040	
C-Lama Ekstraksi	1,37	1	1,37	0,29	0,6092	
AB	8,73	1	8,73	1,85	0,2223	
AC	0,068	1	0,068	0,014	0,9086	
BC	3,98	1	3,98	0,84	0,3934	
A ²	111,83	1	111,83	23,74	0,0028	
B ²	37,82	1	37,82	8,03	0,0298	
C ²	8,67	1	8,67	1,84	0,2236	
Residual	28,26	6	4,71			
Lack of Fit	18,55	3	6,18	1,91	0,3044	<i>not significant</i>
Pure Error	9,72	3	3,24			
Cor Total	404,45	15				

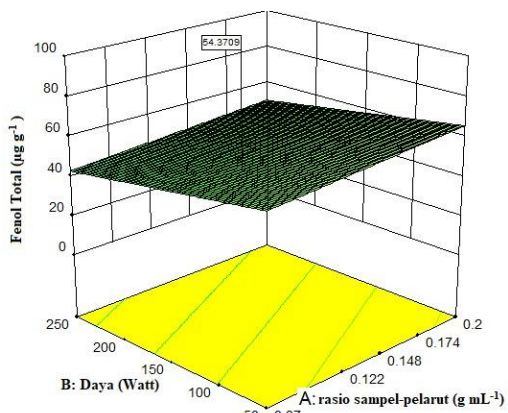
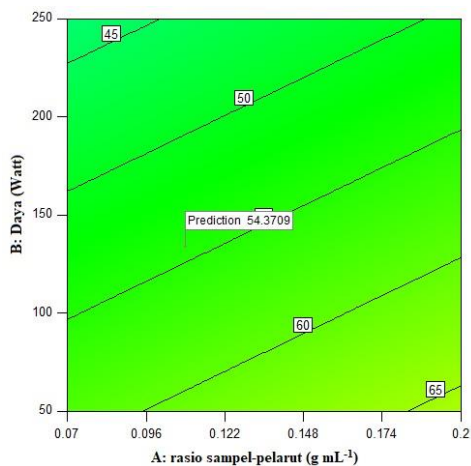
Solusi yang ditawarkan dari hasil analisis *response surface methodology* (RSM) *Box-Behnken Design* (BBD) ekstraksi MBLK metode UAE pada 3 independen faktor rasio sampel-pelarut, besarnya daya, dan waktu yang digunakan secara berturut-turut adalah 1:10 g mL⁻¹; 134 Watt; dan 14 menit. Prediksi respon rendemen, aktivitas penangkapan radikal DPPH dan kadar fenol total secara berturut-turut sebesar 29,76%; 50,92%; dan 54,37 µg g⁻¹ minyak (**Gambar 1**, **Gambar 2**, **Gambar 3**). Kondisi optimum yang diperoleh digunakan untuk membandingkan metode ekstraksi UAE dan metode *Soxhlet*. Dan untuk memudahkan pengoperasian maka rasio sampel-pelarut, besarnya daya, dan waktu yang digunakan secara berturut-turut dimodifikasi sebagai berikut 1:10 g mL⁻¹; 150 Watt; dan 15 menit.



Gambar 1. Diagram *Contour* [A] dan diagram 3 dimensi [B] prediksi rendemen MBLK dari model yang dikembangkan



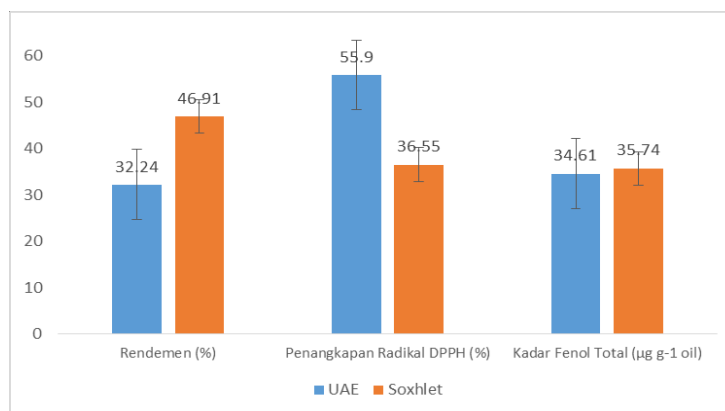
Gambar 2. Diagram *Contour* [A] dan diagram 3 dimensi [B] prediksi aktivitas penangkapan radikal DPPH MBLK dari model yang dikembangkan



Gambar 3. Diagram *Contour* [A] dan diagram 3 dimensi [B] prediksi kadar fenol total MBLK dari model yang dikembangkan

3.3. Perbandingan metode ekstraksi

Rendemen, aktivitas penangkapan radikal DPPH, dan kadar fenol total. **Gambar 4** menunjukkan metode *Soxhlet* (46,91%) menghasilkan rendemen minyak yang lebih banyak dibandingkan metode UAE (32,24%). Kontak yang lama antara pelarut dan sampel serta siklus yang berulang memberikan pengaruh terhadap tingginya rendemen minyak yang dihasilkan dari metode *Soxhlet* [16]. Sama halnya dengan kadar fenol total MBLK, metode *Soxhlet* (35,74 $\mu\text{g g}^{-1}$ minyak) juga menghasilkan kadar yang lebih tinggi dibandingkan metode UAE (34,61 $\mu\text{g g}^{-1}$ minyak). Kandungan fenol minyak nabati dipengaruhi oleh metode ekstraksi minyak yang digunakan [3]. Selain itu, banyaknya senyawa fenol yang keluar dari biji tergantung dari besarnya temperatur dan tekanan yang diberikan [5]. Sedangkan aktivitas penangkapan radikal DPPH MBLK yang diperoleh dari metode UAE (55,90%) lebih tinggi dibanding metode *Soxhlet* (36,55%).



Gambar 4. Perbandingan metode UAE dan metode *Soxhlet* terhadap variabel respon

4. Kesimpulan

Response surface methodology dengan *Box Behnken Design* (BBD) merupakan metode yang efektif untuk menentukan kondisi optimum *Ultrasound-Assisted Extraction* berdasarkan respon rendemen. Kondisi optimum metode UAE diperoleh pada rasio sampel-pelarut, besarnya daya, dan waktu yang digunakan secara berturut-turut 1:10 g mL^{-1} ; 150 Watt; dan 15 menit.

Ucapan terima kasih: Penulis mengucapkan terima kasih kepada DIKTI Republik Indonesia yang telah memberikan dana dalam penelitian ini melalui *Hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi* (PUPT) 2019 dengan nomor kontrak 2519/UN1.DITLIT/DIT-LIT/LT/2019.

Daftar Pustaka

- Jiao, J.; Li, Z.-G.; Gai, Q.-Y.; Li, X.-J.; Wei, F.-Y.; Fu, Y.-J.; Ma, W. Microwave-Assisted Aqueous Enzymatic Extraction of Oil from Pumpkin Seeds and Evaluation of Its Physicochemical Properties, Fatty Acid Compositions and Antioxidant Activities. *Food Chem.* **2014**, *147*, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.079>.
- Salgın, U.; Korkmaz, H. A Green Separation Process for Recovery of Healthy Oil from Pumpkin Seed. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *58* (2), 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.06.002>.

- 3 Kulaitienė, J.; Černiauskiene, J.; Jariene, E.; Danilčenko, H.; Levickienė, D. Antioxidant Activity and Other Quality Parameters of Cold Pressing Pumpkin Seed Oil. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2017**, *46* (1), 161. <https://doi.org/10.15835/nbha46110845>.
- 4 Nakić, S. N.; Rade, D.; Škevin, D.; Štrucelj, D.; Mokrovčak, Ž.; Bartolić, M. Chemical Characteristics of Oils from Naked and Husk Seeds OfCucurbita Pepo L. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2006**, *108* (11), 936–943. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600161>.
- 5 Rezig, L.; Garrison, T. F.; Madbouly, S. A.; Gomez-Alonso, S.; Salvador, M. D.; Fregapane, G.; Hamdi, S. Cucurbita Maxima Pumpkin Seed Oil: From the Chemical Properties to the Different Extracting Techniques. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2018**, *46* (2), 630. <https://doi.org/10.15835/nbha46211129>.
- 6 Rezig, L.; Chouaibi, M.; Msaada, K.; Hamdi, S. Chemical Composition and Profile Characterisation of Pumpkin (Cucurbita Maxima) Seed Oil. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *37* (1), 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.004>.
- 7 Stevenson, D. G.; Eller, F. J.; Wang, L.; Jane, J.-L.; Wang, T.; Inglett, G. E. Oil and Tocopherol Content and Composition of Pumpkin Seed Oil in 12 Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (10), 4005–4013. <https://doi.org/10.1021/jf0706979>.
- 8 Nishimura, M.; Ohkawara, T.; Sato, H.; Takeda, H.; Nishihira, J. Pumpkin Seed Oil Extracted From Cucurbita Maxima Improves Urinary Disorder in Human Overactive Bladder. *J. Tradit. Complement. Med.* **2014**, *4* (1), 72–74. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.124355>.
- 9 Cândido, F. G.; de Oliveira, F. C. E.; Lima, M. F. C.; Pinto, C. A.; da Silva, L. L.; Martino, H. S. D.; dos Santos, M. H.; Alfnas, R. de C. G. Addition of Pooled Pumpkin Seed to Mixed Meals Reduced Postprandial Glycemia: A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutr. Res.* **2018**, *56*, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.04.015>.
- 10 Iwo, M. I.; Insanu, M.; Dass, C. A. S. Development of Immunonutrient from Pumpkin (Cucurbita Moschata Duchense Ex. Lamk.) Seed. *Procedia Chem.* **2014**, *13*, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.12.013>.
- 11 Elfiky, S. A.; Elelaimy, I. A.; Hassan, A. M.; Ibrahim, H. M.; Elsayad, R. I. Protective Effect of Pumpkin Seed Oil against Genotoxicity Induced by Azathioprine. *J. Basic Appl. Zool.* **2012**, *65* (5), 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2012.10.010>.
- 12 Lovatto, N. De. M.; Goulart, F. R.; Loureiro, B. B.; Adorian, T. J.; de Freitas, S. T.; Pianesso, D.; Dalcin, M. O.; Athayde, M. L.; da Silva, L. P. Effects of Phosphorylated Protein Concentrate of Pumpkin Seed Meal on Growth and Digestive Enzymes Activity of Silver Catfish (*Rhamdia Quelen*). *Aquac. Nutr.* **2017**, *23* (1), 201–209. <https://doi.org/10.1111/anu.12381>.
- 13 Medjakovic, S.; Hobiger, S.; Ardjomand-Woelkart, K.; Bucar, F.; Jungbauer, A. Pumpkin Seed Extract: Cell Growth Inhibition of Hyperplastic and Cancer Cells, Independent of Steroid Hormone Receptors. *Fitoterapia* **2016**, *110*, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.03.010>.
- 14 Bharti, S. K.; Kumar, A.; Sharma, N. K.; Prakash, O.; Jaiswal, S. K.; Krishnan, S.; Gupta, A. K.; Kumar, A. Tocopherol from Seeds of Cucurbita Pepo against Diabetes: Validation by in Vivo Experiments Supported by Computational Docking. *J. Formos. Med. Assoc.* **2013**, *112* (11), 676–690. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2013.08.003>.
- 15 Arhancet, J. P.; Heise, J. D.; Makadia, V. Processes For Preparation of Oil Compositions. US8901299B2, March 13, 2014.
- 16 Ortega-Ortega, M. de los A.; Cruz-Cansino, N. del S.; Alanís-García, E.; Delgado-Olivares, L.; Ariza-Ortega, J. A.; Ramírez-Moreno, E.; Manríquez-Torres, J. de J. Optimization of Ultrasound Extraction of Cactus Pear (*Opuntia Ficus Indica*) Seed Oil Based on Antioxidant Activity and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. *J. Food Qual.* **2017**, *2017*, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/9315360>.
- 17 AOAC. *The Official Methods of Analysis*, 17th ed.; Association of official analytical chemists: Maryland, USA, 2000.
- 18 Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5).

- 19 Ashokkumar, M. The Characterization of Acoustic Cavitation Bubbles – An Overview. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, 18 (4), 864–872. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.016>.
- 20 Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.-G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.-S.; Abert-Vian, M. Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A Review. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>.
- 21 Goula, A. M. Ultrasound-Assisted Extraction of Pomegranate Seed Oil – Kinetic Modeling. *J. Food Eng.* **2013**, 117 (4), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.009>.
- 22 Toma, M.; Vinatoru, M.; Paniwnyk, L.; Mason, T. J. Investigation of the Effects of Ultrasound on Vegetal Tissues during Solvent Extraction. *Ultrason. Sonochem.* **2001**, 8 (2), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00033-X).
- 23 Vinatoru, M. An Overview of the Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactive Principles from Herbs. *Ultrason. Sonochem.* **2001**, 8 (3), 303–313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2).
- 24 Setyaningsih, W.; Saputro, I. E.; Carrera, C. A.; Palma, M. Optimisation of an Ultrasound-Assisted Extraction Method for the Simultaneous Determination of Phenolics in Rice Grains. *Food Chem.* **2019**, 288, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.107>.
- 25 Rezig, L.; Chouaibi, M.; Ojeda-Amador, R. M.; Gomez-Alonso, S.; Salvador, M. D.; Fregapane, G.; Hamdi, S. Cucurbita Maxima Pumpkin Seed Oil: From the Chemical Properties to the Different Extracting Techniques. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* **2018**, 46 (2), 630. <https://doi.org/10.15835/nbha46211129>.



© 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).