

ANALISIS KADAR KAPSAISIN DARI EKSTRAK “BON CABE” DENGAN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

Arif Satria Wira Kusuma, Gabriella Rosalina
Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

ABSTRAK

Kapsaisinoid adalah kelompok senyawa amida dari vanililamin dengan asam lemak rantai bercabang yang merupakan penyebab rasa pedas dari cabai. Pengujian kandungan kapsaisin pada sampel dilakukan dengan tiga tahap, yaitu penentuan kurva baku standar, preparasi sampel cabai dan analisis sampel dengan instrumen KCKT. Penentuan kurva baku standar kapsaisin dilakukan dengan cara mengencerkan standar kapsaisin dari konsentrasi 200 ppm menjadi 40 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2 ppm, dan 1 ppm menggunakan pelarut metanol: air (7 : 3). Sampel pengujian dipersiapkan dengan cara mencampurkan bubuk cabai dan kloroform sebanyak 8 ml yang disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 3000 rpm, kemudian supernatan yang dihasilkan dalam proses sentrifugasi dimasukkan kedalam vial dan dikeringkan hingga seluruh kloroform menguap. Sampel yang diperoleh diuji dengan menggunakan KCKT. Berdasarkan kromatogram hasil pengujian dengan menggunakan KCKT, didapatkan nilai AUC sebesar 40195 pada 227 nm dan 112344 pada 281 nm. Kadar kapsaisin pada sampel bubuk cabe “Bon Cabe” (No Batch 8995899250143) yang ditentukan melalui nilai AUC adalah 2,06 ppm pada panjang gelombang 227 nm dan 16,8 ppm pada panjang gelombang 281 nm.

Kata Kunci : Kapsaisinoid, kromatografi, kromatografi cair kinerja tinggi

ABSTRACT

Capsaicinoid is an amide compound group from vanililamin with branched fatty acid chain that affecting the spiciness of chili. The testing of capsaicin content in sample are done with three stages, that is determination of standar curve of capsaicin, preparation of chilli samples, and sample analysis with HPLC. Determination of standard curve of capsaicin that was done with dilution of capsaicin standard from concentration of 200 ppm to 40 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2 ppm, and 1 ppm using 7 : 3 of methanol and water solvent. Testing samples was prepared by mixing chilli powder with 8 ml of chloroform which centrifugated for 5 minutes in 3000 rpm, then the supernatant resulted from centrifugation process were put into a vial and dried until all of the chloroform vaporized. Samples then tested with HPLC. Based on the chromatograph resulted from HPLC testing, there are obtained AUC value 40195 in 227 nm and 112344 in 281 nm. Capsaicin content of “Bon Cabe” (No Batch 8995899250143) chilli powder sample determined from AUC value are 2.06 ppm in 227 nm wavelength and 16,8 ppm in 281 nm wavelength.

Keywords : Capsaicinoid, chromatography, high performance liquid chromatography

PENDAHULUAN

Cabai (*Capsicum annum* L) merupakan salah satu komoditas rempah/sayuran yang

dibudidayakan. Selain untuk memenuhi kebutuhan rumah tangga sehari-hari, cabai banyak digunakan sebagai bahan baku industri pangan dan farmasi. Dari berbagai

penelusuran, cabai berasal dari Amerika Selatan dan Tengah yang kemudian menyebar ke seluruh dunia, terutama ke Asia Selatan (Sanatombik 2008).

Kapsaisinoid merupakan kelompok senyawa amida dari vanililamin dengan asam lemak rantai bercabang dengan panjang rantai karbon 9 sampai 11 dan merupakan kelompok senyawa yang bertanggung jawab terhadap rasa pedas dari cabai. Kelompok senyawa ini hanya dijumpai pada buah tumbuhan marga *Capsicum* dari suku Solanaceae dengan kapsaisin dan dihidrokapsaisin sebagai komponen utama dan homokapsaisin, homodihidrokapsaisin dan nordihidrokapsaisin sebagai komponen langka. Namun demikian, tidak semua kultivar *Capsicum* mengandung kapsaisinoid sehingga terdapat buah cabai tertentu yang tidak pedas (Sukrasno, 1997). Kapsaisin merupakan senyawa nonpolar yang memiliki beberapa gugus polar terhadap hidrogen yang berikatan dengan air. Ini berarti senyawa kapsaisin tidak dapat melarut dalam air. Kapsaisin bersifat iritan terhadap mamalia termasuk manusia,

dan menimbulkan rasa terbakar dan panas pada jaringan manapun yang tersentuh. Sifat iritan kapsaisin berguna pada penelitian farmakologi, yang digunakan untuk menstimulasi saraf-saraf sensori dan sebagai pengobatan eksperimental untuk nyeri kronik (Cairns, 2004).

Kapsaisin mempunyai nilai ekonomis yang tinggi dalam bidang farmasi, yaitu sebagai obat oles untuk membantu menghilangkan rasa nyeri akibat penyakit saraf, nyeri pada otot persendian yang diakibatkan radang, dan keseleo. Kapsaisin juga diujicobakan sebagai penghambat kanker leukimia (Ito, 2004), obat kanker prostate (Mori, 2006), dan obat diabetes (Razavi, 2006). Selain itu kandungan vitamin C yang cukup tinggi pada cabai dapat memenuhi kebutuhan harian setiap orang.

Kandungan komponen “pedas” yang terdapat pada cabai bisa dianalisis dengan menggunakan metoda KCKT untuk penentuan senyawa kapsaisin. Pada sistem KCKT data yang dihasilkan adalah waktu retensi dan luas area dari

komponen-komponen sampel (Perucka and Oleszek, 2000).

Analisa kuantitatif pada KCKT dilakukan dengan cara membandingkan luas puncak standar senyawa murni dengan sampel, sedangkan analisa kualitatif pada KCKT dilakukan dengan cara mencari kesamaan komponen kapsaisin sampel dengan standar (Saksit dkk, 2012).

MATERI DAN BAHAN

Bahan

Bahan uji yang digunakan dalam proses identifikasi ini adalah bubuk cabai "Bon Cabe Level 15" dengan No. Batch 8995899250143. Sedangkan bahan lain yang digunakan adalah standar kapsaisin, metanol, kloroform, dan aquadest.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam proses identifikasi ini adalah seperangkat alat KCKT dan kolom KCKT, botol vial, kertas perkamen, kertas saring, mikropipet dan pipet, neraca analitik, sentrifugator, spatel, tabung eppendorf, dan sonikator.

PROSEDUR KERJA

1. Pengenceran dan penentuan kurva baku standar kapsaisin

Baku standar kapsaisin diencerkan dari konsentrasi 200 ppm menjadi 40 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2 ppm, dan 1 ppm menggunakan pelarut metanol: air (7 : 3). Larutan baku ini kemudian dimasukkan ke dalam instrumen KCKT dan diukur pada panjang gelombang 227 nm dan 281 nm untuk ditetapkan kurva baku standar kapsaisin.

2. Persiapan sampel yang akan dianalisis

Sampel bubuk cabai "Bon Cabe Level 15" (No. Batch: 8995899250143) ditimbang sebanyak 1 gram menggunakan neraca digital. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan ditambahkan dengan kloroform sebanyak 8 ml. Sampel disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 3000 rpm sehingga didapatkan supernatan dan endapan. Supernatan yang diperoleh dipipet kemudian disaring menggunakan kertas saring agar terpisah dari endapan dan dimasukkan ke dalam botol vial. Supernatan kemudian dikeringkan di dalam ruang asam dengan menguapkan seluruh kloroform. Setelah didapatkan

sampel kering, ditambahkan 2 ml metanol dan disonikasi selama 5 menit untuk membantu pelarutan.

3. Analisis sampel dengan instrumen KCKT

Sampel yang telah larut dalam metanol dimasukkan ke dalam tabung eppendorf sebanyak 10 μ L, lalu ditambahkan 990 μ L metanol : air (7 : 3). Tabung eppendorf disentrifugasi selama 5 menit dan sampel yang telah disentrifugasi dimasukkan ke dalam kolom KCKT sebanyak 1 mL untuk diinjeksikan ke dalam instrumen. Di dalam instrumen telah disiapkan fase gerak berupa metanol : air (7 : 3). Kemudian sampel dianalisis dengan cara kolom KCKT dimasukkan ke dalam wadah sampel pada instrumen KCKT, instrumen dinyalakan dan dipilih metode analisis dengan waktu *running* sekitar 10-15 menit. Kromatogram yang didapat kemudian dianalisis sehingga dapat diketahui kadar kapsaisin pada sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada percobaan kali ini, dilakukan penentuan kadar kapsaisin dalam sampel bubuk cabe "Bon Cabe Level 15" (No.

Batch 8995899250143) dengan menggunakan metode HPLC. HPLC atau kromatografi cair kinerja tinggi merupakan salah satu teknik kromatografi yang didasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen di antara dua fasa (fasa gerak dan fasa diam) yang berbeda kepolarannya. Teknik HPLC merupakan satu teknik kromatografi cair-cair yang dapat digunakan baik untuk keperluan pemisahan, pengidentifikasian, maupun analisis kuantitatif yang didasarkan pada pengukuran luas puncak analit dalam kromatogram yang dibandingkan dengan luas area standar.

Menganalisis sesuatu dengan menggunakan suatu instrumen berarti akan membutuhkan standar dalam proses analisisnya untuk menentukan kurva baku yang digunakan untuk mendapatkan *absorbifity* atau persamaan regresi linier yang nantinya digunakan dalam pencarian suatu kadar zat dalam sampel yang absorbansinya sudah diukur.

Dalam penelitian kali ini, standar kapsaisin diencerkan dengan berbagai konsentrasi menggunakan pelarut metanol

: air (7:3). Standar baku kapsaisin dengan berbagai konsentrasi dimasukkan ke dalam instrumen KCKT dan di analisis pada 2 panjang gelombang sehingga menghasilkan 2 kurva baku dengan nilai AUC yang berbeda-beda pula. Panjang gelombang yang digunakan dalam pengukuran adalah 227 dan 281 nm karena panjang gelombang tersebut merupakan panjang gelombang maksimum untuk senyawa kapsaisin. Hasil pengukuran tersebut dapat dilihat pada tabel di bawah ini :

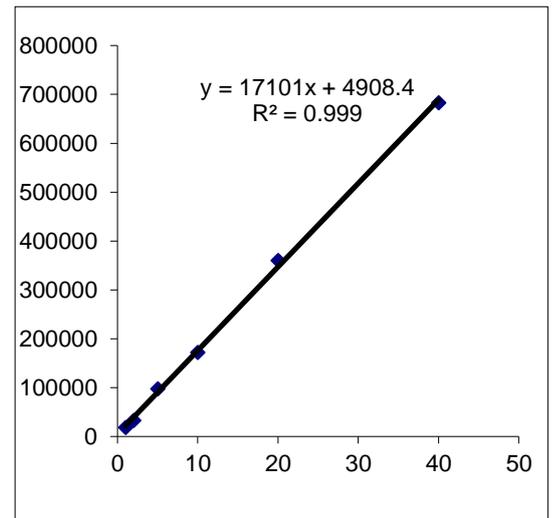
Tabel 1. Data AUC pada 227 nm

C ppm	227 nm
1	18189
2	32924
5	97114
10	172136
20	360096
40	682895

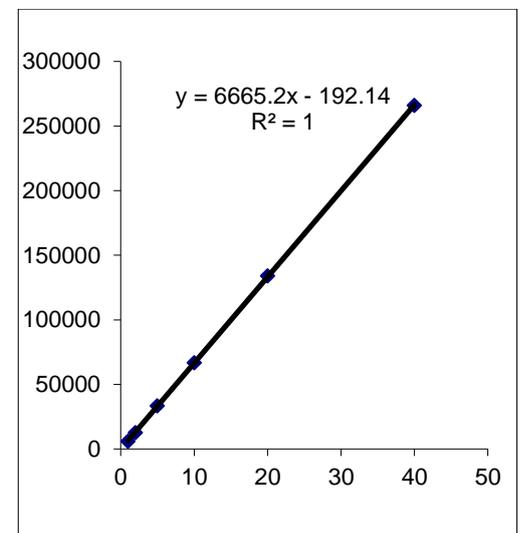
Tabel 2. Data AUC pada 281 nm

C ppm	227 nm
1	6056
2	12646
5	33479
10	66664
20	133951
40	265938

Adapun bentuk grafik yang dihasilkan dari data-data tersebut adalah :



pada 227 nm



Gambar 2. Kurva Standar Kapsaisin pada 281 nm

Dari data yang dihasilkan didapatkan persamaan garis $y=17101x+4908,4$ untuk panjang gelombang 227 nm dan persamaan $y=6665,2x -192,14$ untuk panjang gelombang 281 nm. Untuk nilai r^2 , pada panjang gelombang 227 nm didapatkan nilai 0,999, sedangkan pada panjang gelombang 281 nm didapatkan nilai 1. Hal ini menandakan

bahwa kurva yang dihasilkan memiliki linearitas yang baik karena nilainya mendekati 1 atau sama dengan 1.

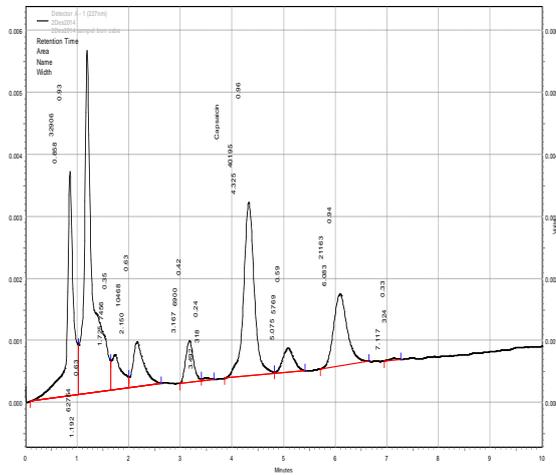
Setelah didapatkan persamaan garis untuk menentukan kadar kapsaisin pada sampel, dilakukan preparasi sampel yang dilakukan dengan cara sampel “Bon Cabe” (No Batch 8995899250143) ditimbang sebanyak 1 gram, kemudian sampel tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan ditambahkan kloroform sebanyak 10 ml. Dalam hal ini, kloroform berperan sebagai zat yang menarik senyawa kapsaisin pada sampel dengan prinsip *like dissolve like*, dimana kapsaisin yang bersifat non polar akan melarut pada senyawa kloroform yang juga bersifat non polar. Setelah itu pemisahan kapsaisin dengan komponen lain dalam bubuk cabai dilakukan dengan proses sentrifugasi dan penyaringan supernatan.

Kemudian kloroform diuapkan di ruang asam untuk mendapatkan sampel yang lebih murni tanpa pelarutnya. Setelah didapatkan sampel kering, ditambahkan 2 ml metanol dan disonikasi selama 5 menit untuk membantu pelarutan. Sampel yang

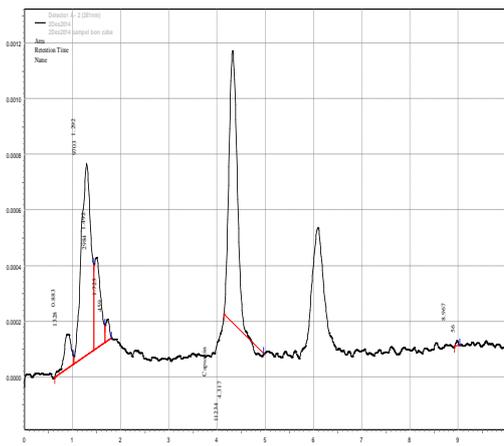
telah larut barulah dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan ditambahkan dengan fase gerak metanol:air (7:3) yang kemudian akan dianalisis dengan HPLC. Prinsip kerja dari alat HPLC adalah ketika suatu sampel yang akan diuji diinjeksikan ke dalam kolom maka sampel tersebut kemudian akan terurai dan terpisah menjadi senyawa-senyawa kimia (analit) sesuai dengan perbedaan afinitasnya. Hasil pemisahan tersebut kemudian akan dideteksi oleh detector (spektrofotometer UV) pada panjang gelombang tertentu. Hasil yang muncul dari detektor tersebut selanjutnya dicatat oleh recorder yang biasanya dapat ditampilkan menggunakan integrator atau menggunakan personal computer (PC) yang terhubung online dengan alat HPLC tersebut. Hasil analisis dari KCKT akan diinterpretasikan dalam bentuk kromatogram, dimana terdapat *peak* dengan nilai AUC yang telah tertera pada kromatogram yang digunakan untuk analisis kuantitatif atau untuk menentukan kadar suatu senyawa.

Bentuk kromatogram yang didapatkan dari analisis sampel “Bon

Cabe” (No. Batch 8995899250143) adalah sebagai berikut :



Kromatogram sampel pada 227 nm



Kromatogram sampel pada 281 nm

Dari hasil tersebut, didapatkan nilai AUC sampel pada 227 nm adalah sebesar 40195 dan nilai AUC pada 281 nm adalah 112344. Untuk mencari konsentrasi sampel, nilai AUC yang didapatkan dimasukkan sebagai nilai y pada persamaan yang didapatkan sebelumnya sehingga dapat diketahui kadar kapsaisin pada sampel bubuk cabe “Bon Cabe” (No Batch 8995899250143) adalah 2.06 ppm pada

panjang gelombang 227 nm dan 16,88 ppm pada panjang gelombang 281 nm. Berdasarkan kromatogram yang dihasilkan, dapat dilihat bahwa pemisahan pada panjang gelombang 281 nm lebih baik dibandingkan dengan pemisahan pada panjang gelombang 227 nm. Hal ini dapat dilihat dari banyaknya *tailing* pada pengukuran dengan panjang gelombang 227 nm. Pemisahan pada panjang gelombang 281 nm lebih baik dikarenakan resolusinya lebih tinggi dimana resolusi adalah derajat pemisahan dua komponen campuran.

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa dalam sampel bubuk cabe “Bon Cabe” (No Batch 8995899250143) memiliki kadar kapsaisin sebesar 2,06 ppm pada panjang gelombang 227 nm dan 16,8 ppm pada panjang gelombang 281 nm. Selain itu, dapat diketahui pula bahwa pemisahan senyawa kapsaisin pada panjang gelombang 281 nm lebih baik dibandingkan pemisahan senyawa pada panjang gelombang 227 nm.

DAFTAR PUSTAKA

- Cairns, Donald. 2004. *Intisari Kimia Farmasi Edisi 2*. Jakarta:EGC
- Ito K., Nakazato T., and Yamato K., "Induction of Apoptosis in Leukemic Cells by Homovanillic Acid Derivative, Kapsaisin, through Oxidative Stress: Implication of Phosphorylation of p53 at Ser-15 Residue by Reactive Oxygen Species," *Cancer Research*, 64 (3): 1071–1078, 2004.
- Mori A., Lehmann S., and O'Kelly J, "Kapsaisin, a Component of Red Peppers, Inhibits the Growth of Androgen-Independent, p53 Mutant Prostate Cancer Cells," *Cancer Research*, 66(6):3222–3229, 2006
- Perucka, I. W., and Oleszek. 2000. Extraction and Determination of Capsaicinoids in Fruit of Hot Pepper *Capsicum Annum L.* By Spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography, *Food Chem*, 71, 287-291.
- Razavi R., Chan Y., Afifiyan F.N., Liu X.J., Wan X., and Yantha J., "TRPV1+ Sensory Neurons Control Beta Cell Stress and Islet Inflammation in Autoimmune Diabetes," Toronto, Canada, *Cell*. 15;127(6):1123-35, 2006.
- Saksit, C., Jureerat J., and Suchila, T. 2012. Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Some Chili Varieties using Accelerated Solvent Extraction Associated with Solid-Phase Extraction Methods and RP HPLC Fluorescence, *Coden Ecjhao*, 9, 1550-1551.
- Sanatombik K. and G.J. Sharma, "Kapsaisin Content and Pungency of Different *Capsicum* spp. Cultivars," Department of Life Sciences, Manipur University, India, 36 (2), 2008.
- Sukrasno, et al. 1997. Kandungan Kapsaisin dan Dihidro-kapsaisin Pada Berbagai Buah *Capsicum*. *JMS Vol.2 No.1* hal 28-34