

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Alat**

Alat - alat yang diperlukan diantaranya adalah oven, hot plate (Thermolyne Cimarec SP131320-33Q), ayakan, KCKT (Waters HPLC), spektrofotometer Uv/Visible (Shimadzu UV-1800), sonikator (Elmasonic), lumpang, alu, dan alat-alat gelas standar laboratorium.

#### **3.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah cabe rawit (*Capsicum frutescens* L.), sekam padi, cangkang telur keong, bentonit, aquabidestillata, etanol 96% teknikal, metanol, asetonitril, etil asetat teknikal, n-heksana teknikal, pereaksi Mayer dan Dragendorff, HCl 2 M; 1,6 M, NaOH 2 M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M.

#### **3.3 Prosedur Penelitian**

##### 3.3.1 Preparasi adsorben

- a. Preparasi adsorben cangkang telur keong mengikuti prosedur yang telah dilakukan oleh Nopriansyah, *et al.* (2016) yang dimodifikasi. Cangkang telur keong mas dibersihkan dan dicuci dengan air dan beberapa pelarut organik, kemudian dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 100 °C. Setelah cangkang kering dan bersih kemudian di gerus sampai halus dan diayak untuk mendapatkan adsorben dengan ukuran yang lebih seragam.
- b. Preparasi adsorben sekam padi mengikuti prosedur yang telah dilakukan oleh Kaloari, *et al.* (2014) yang dimodifikasi. Sekam padi terlebih dahulu direndam di dalam larutan 2 M HCl selama 4 jam untuk melepaskan berbagai mineral pengotor yang melekat pada sekam padi dan dilanjutkan dengan NaOH. Mencuci sekam padi dengan akuades beberapa kali hingga sisa NaOH hilang sama sekali dan dikeringkan dengan oven 100 °C.
- c. Preparasi bentonit dilakukan dengan menggunakan pelarut yang bersifat asam (metanol) untuk mengaktifkan situs aktif yang terdapat pada permukaan partikel bentonit.

### 3.3.3 Isolasi kapsaisin

Cabai rawit segar dicuci, disortasi, dirajang dan dikeringkan di oven pada suhu 60 °C, hingga kadar air <10%. Simplisia cabai rawit direfluks dengan pelarut etanol 96% selama 2x4 jam dimana setiap 4 jam dilakukan pergantian pelarut. Ekstrak cair kemudian diuapkan dengan menggunakan metode destilasi hingga diperoleh ekstrak pekat dan dilanjutkan pemekatan pada lemari asam. Ekstrak pekat yang diperoleh di KLT sesuai dengan prosedur yang tertera pada Farmakope Herbal Indonesia (2010). Ekstrak pekat kemudian dipisahkan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pelarut n-heksana dan metanol. Fraksi metanol yang dihasilkan kemudian diaplikasikan pada masing-masing adsorben dengan massa fraksi yang sama. Metode pemisahan dengan adsorben sekam padi dan serbuk cangkang telur keong diaplikasikan dengan kromatografi kolom gravitasi. Sedangkan adsorben bentonit diaplikasikan dengan metode filtrasi. Proses elusi dilakukan secara bertahap dengan dua jenis pelarut berturut-turut yaitu n-heksana dan metanol dengan volume masing-masing sebanyak 6 mL. Hasil pemisahan ditampung pada vial dengan volume penampungan masing-masing sebanyak 2 mL. Hasil pemisahan selanjutnya dilakukan analisa dengan spektrofotometer UV/Visibel dan HPLC.

### 3.3.4 Analisis Kapsaisin

Pada penelitian ini dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum pengukuran serapan larutan kapsaisin dengan konsentrasi 100 ppm pada panjang gelombang 200 s/d 400 nm menggunakan spektrofotometer UV. Yan, *et al.* (2017), melakukan pengujian kualitatif dan kuantitatif kandungan kapsaicin dan dihydrokapsaicin dari buah *Capsici fructus* dengan menggunakan HPLC. Analisis dilakukan pada kolom C18 (250) × 4,6 mm, 5 µm), fase gerak terdiri dari 50% air dan asetonitril 50% dengan elusi isokratik pada laju aliran

1,0 mL/menit selama 30 menit. Dilakukan identifikasi pada panjang gelombang 280 nm dan volume injeksi sampel adalah 20  $\mu$ L.