

Optimasi Ekstraksi dari *capsicum frutescens L* dengan Microwave-Assisted Soxhlet Extraction (MASE) Menggunakan Response Surface Methodology (RSM)

Optimization of Extraction for Microwave-Assisted Soxhlet Extraction (MASE) from capsicum frutescens L using Response Surface Methodology (RSM)

Yeni Variyana^{1*}, Yuni Susanti²

^{1,2}Program Studi Teknik Kimia, Institut Teknologi dan Bisnis Muhammadiyah Banyuwangi
Jl. Diponegoro No.60 Genteng-Banyuwangi 68465, Indonesia
email: ¹yenivariyana@itbmb.ac.id, ²ysusanti@itbmb.ac.id

ABSTRAK

DOI;
10.30595/jrst.v5i2.10677

Histori Artikel:

Diajukan:
11/06/2021

Diterima:
18/09/2022

Diterbitkan:
19/09/2022

Capsicum Frutescens L. memiliki senyawa aktif berupa rasa pedas yang disebut capsaicin. Senyawa ini telah banyak dimanfaatkan di berbagai sektor industri dan farmasi. Proses pengambilan senyawa melalui ekstraksi dengan *microwave-assisted soxhlet extraction* (MASE). Pada penelitian ini menggunakan parameter siklus ekstraksi (2, 6, 10 siklus), daya *microwave* (300, 450, 600 W) dan massa cabai rawit (20, 60, 100 g). Parameter tersebut didesain berdasarkan optimasi *response surface methodology* (RSM). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *yield* ekstraksi tertinggi pada kondisi 6 siklus, 400 W, dan 20 g sebesar 7,7285. Kemudian model optimasi menunjukkan 6,33 siklus, 405,33 W dan 20,46 g sebagai *yield* tertinggi dengan hasil 7,7708. Kedua hasil tersebut menyatakan bahwa persentase kesalahan antara data penelitian dengan model optimasi yaitu <0,05%. Selanjutnya, analisis varian (ANOVA) memberikan respon signifikan berdasarkan *p-value* <0,01%. Respon ini mengindikasikan bahwa parameter-parameter yang telah didesain oleh RSM dapat digunakan sebagai model untuk mengetahui titik-titik optimum dan *yield* tertinggi. Selain itu, hasil ekstrak dilakukan analisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS dan SEM *energy dispersive x-ray* (EDX) untuk mengetahui panjang gelombang dan morfologi capsaicin.

Kata Kunci: Capsaicin, MASE, RSM, *yield*

ABSTRACT

Capsicum Frutescens L has an active compound in the form of a spicy taste called capsaicin. This compound has been widely used in diverse industrial and pharmaceutical sectors. The extraction using microwave-assisted soxhlet extraction (MASE). This research was used parameters of extraction cycle (2, 6, 10 cycles), microwave power (300, 450, 600 W) and mass of cayenne pepper (20, 60, 100 g). These parameters were designed as optimization using response surface methodology (RSM). The results showed that the highest extraction yield were 6 cycles, 400 W, and 20 g of 7.7285. Furthermore, the model optimization resulted in 6.33 cycles, 405.33 W and 20.46 g as the highest yield of 7.7708. The error rate between the experimental data and model optimization was <0.05%. In addition, analysis of variance on extraction (ANOVA) gave a significant response with *p-value* <0.01%. The response indicates that the parameters designed by RSM can be used as a model to obtain the optimum points and the highest yield. In addition, the extract was analyzed by UV-VIS spectrophotometer and SEM energy dispersive x-ray (EDX) to determine the wavelength and the morphology capsaicin.

Keywords: Capsaicin, MASE, RSM, yield.

1. PENDAHULUAN

Penggunaan cabai rawit umumnya digunakan pada bahan pangan sebagai bahan baku di industri pangan. Dengan perkembangan teknologi, masyarakat Indonesia telah banyak melakukan riset dan pengembangan terhadap pemanfaatan cabai rawit sebagai pembuatan obat-obatan di bidang kesehatan. Adanya pengembangan tanaman obat secara umum berdampak positif terhadap peningkatan produktivitas petani dan pemanfaatan keanekaragaman hayati di Indonesia. Salah satu pemanfaatan dengan dilakukan ekstrak dari cabai rawit dalam bentuk oleoresin. Oleoresin merupakan ekstrak berupa minyak yang memiliki kandungan senyawa berupa *capsaicin* (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamida).

Capsaicin merupakan senyawa utama berfungsi sebagai metabolit sekunder yang memberikan rasa pedas dari cabai rawit (Yaldiz, Ozguven and Sekeroglu, 2010; Sganzerla *et al.*, 2014; Naves *et al.*, 2019). Manfaat lainnya adalah senyawa aktif dalam melawan peradangan neurogenik (Szolcsányi, 2004). Banyak peneliti melaporkan bahwa *capsaicin* disebut golongan alkaloid kuat yang bermanfaat dalam pengobatan *rheumatoid arthritis* dan *neuralgia postherpetic* (Teixeira *et al.*, 2015), neuropati diabetik (Derry *et al.*, 2008), dan antikanker (Damião *et al.*, 2014) dan lain-lain.

Dalam penelitian terakhir, beberapa metode ekstraksi cabai rawit telah banyak dilakukan, salah satunya oleh Catchpole *et al.* (2003) menggunakan *soxhlet* dalam kondisi superkritis dan subkritis dengan pelarut aseton, namun dalam aplikasinya membutuhkan biaya tinggi dan instalasi alat yang kompleks. Ekstrak *capsaicin* yang dihasilkan dari penelitian tersebut hanya 0,2% (Catchpole *et al.*, 2003). Teknik penelitian lain oleh Enkelejda Goci, *et al.* (2014) dengan membandingkan 3 metode konvensional yaitu maserasi, *soxhlet*, dan ultrasonik dengan menghasilkan kandungan *capsaicin* secara berturut-turut sebesar 0,3084%, 0,2078%, dan 0,0450% (Goci *et al.*, 2014). Kemudian dalam perkembangannya, *microwave-assisted extraction* (MAE) dan *ultrasound-assisted extraction* (UAE) diterapkan dan dilaporkan bahwa kedua metode efektif untuk ekstraksi cabai rawit (Vázquez-Espinosa *et al.*, 2019). Teknologi ramah lingkungan untuk

ekstraksi menggunakan *microwave*. Selain itu, metode tersebut menghasilkan *yield* tinggi dan waktu ekstraksi yang cepat (Castejón, Luna and Señoráns, 2018), akan tetapi belum diketahui kondisi parameter optimum dalam ekstraksi cabai rawit. Selanjutnya, untuk menentukan parameter optimum terhadap hasil ekstraksi perlu dilakukan perancangan secara matematis ataupun menggunakan optimasi. Desain *response surface methodology* (RSM) telah digunakan untuk mengoptimasi kondisi operasi dalam beberapa tahun terakhir (Sagwan, Survase and Annapure, 2010; Agcam, Akyıldız and Balasubramaniam, 2017; Aydar, Bağdatlıoğlu and Köseoğlu, 2017; Wang *et al.*, 2017). Penggunaannya sangat berguna untuk menganalisis pengaruh parameter independen dan interaksi untuk meningkatkan *yield* ekstraksi (Myres, Montgomery and Anderson-Cook, 2002).

Dari uraian diatas, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi dan menentukan kondisi optimum berdasarkan analisis parameter independen dan interaksi terhadap *yield* ekstraksi *Capsicum Frutescens L* menggunakan *microwave-assisted soxhlet extraction* (MASE). Selain itu, optimasi menggunakan *surface response methodology* (RSM) dapat dirancang sebagai parameter untuk percobaan skala besar. Sebagai tambahan, analisis secara kualitatif pada ekstrak cabai rawit dengan uji spektrofotometri UV-VIS dan SEM *energy dispersive x-ray* (EDX).

2. METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Cabai rawit (*Capsicum Frutescens L*) dalam kondisi segar diperoleh dari Pasar Surabaya, Jawa Timur, Indonesia. Pelarut etanol (EtOH) 98% digunakan untuk melarutkan ekstrak di dalam *Capsicum Frutescens L*. Kemudian air digunakan sebagai pendingin kondensor.

Tabel 1. *Box-Behnken Design* (BBD) untuk Menentukan Parameter Eksperimen

Parameter	Kode		
	Satuan	-1	1
A	siklus	2	10
B	W	400	800
C	g	20	100

Desain eksperimen dan analisis parameter ekstraksi *Capsicum Frutescens L*.

Desain *box-behnken design* (BBD) diterapkan pada ekstraksi dengan 3 parameter (Yu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2017; Variyana, Muchammad and Mahfud, 2019). Parameter kondisi yang digunakan A, B dan C secara berturut-turut merupakan siklus ekstraksi (siklus), daya *microwave* (W) dan massa cabai rawit (g). Hasil RSM ditunjukkan **Tabel 2** sebanyak 17 percobaan dengan pengulangan 3 titik dan Y sebagai *yield* ekstraksi (mg/g basis kering). Persamaan analisis regresi untuk data eksperimen menggunakan model orde dua mengikuti rumus berikut:

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

di mana, $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}$ dan β_{ij} adalah koefisien regresi berupa intersep, linear, kuadrat, dan interaksi; X_i dan X_j adalah parameter independen. *Design-Expert* 11 (trial version; State-Ease Inc., Minneapolis, USA) telah digunakan sebagai metode statistik terhadap desain eksperimental serta menemukan kondisi optimum. Selanjutnya, sebelum dilakukan optimasi maka diperlukan beberapa evaluasi, diantaranya nilai-p, R^2 , koefisien variasi (C.V.) dan signifikansi respon dinyatakan dengan *p-test* dan *lack of fit*.

Microwave-assisted soxhlet extraction (MASE)

Dalam ekstraksi ini, alat yang digunakan berupa *microwave* (EMM2308X, merk Electrolux, daya maksimum yang disuplai 800 W). Alat *microwave* sudah dimodifikasi dengan penambahan *distiller* dengan kapasitas 250 mL dan dihubungkan dengan kondensor. Kemudian perangkat ekstraksi ditutup dengan PTFE untuk

mencegah hilangnya panas selama proses ekstraksi.

Tabel 2. Hasil *box-behnken design* (BBD)

Parameter			Yield ekstraksi(%)	
A	B	C	Eksperimen	Model
6	600	60	5,81	5,69
2	600	100	3,02	2,92
6	600	60	5,69	5,69
6	600	60	5,62	5,69
10	600	100	5,72	5,69
6	400	20	7,73	7,72
6	400	100	5,97	6,10
2	400	60	3,88	3,85
10	600	20	6,99	7,09
10	400	60	6,89	6,79
6	600	60	5,71	5,69
6	800	100	5,42	5,43
2	800	60	3,99	4,09
2	600	20	5,24	5,28
6	800	20	7,68	7,55
10	800	60	5,69	5,72
6	600	60	5,62	5,69

Prosedur ekstraksi dengan 100 mL pelarut etanol dilakukan pada tekanan atmosferik, massa *Capsicum Frutescens* (20; 60; 100 g), siklus ekstraksi (2; 6; 10 siklus) dan daya *microwave* beroperasi (400; 600; 800 W). Desain parameter ekstraksi ditentukan oleh optimasi *design expert*. Kemudian hasil ekstrak dikondisikan pada ± 60 °C untuk menguapkan pelarut etanol. Hasil ekstraksi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Yield ekstraksi} = (\text{massa ekstrak/massa cabai rawit}) \times 100 \quad (2)$$

Hasil ekstraksi dengan *yield* tertinggi dilakukan analisis kualitatif dengan menggunakan SEM-EDX dan spektrofotometri UV-VIS.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Varian dan Parameter Ekstraksi

Berdasarkan hasil ANOVA pada **Tabel 3** menunjukkan respon parameter terhadap hasil ekstraksi secara signifikan. Signifikansi model ditentukan oleh *p-value* dan *F-value* dari ANOVA yaitu 0,001% dan 196,69. Menurut Bayraktar (2001), nilai *F-test* yang tinggi dengan *p-value*

yang kecil maka nilai signifikansi model sangat berpengaruh terhadap hasil uji (Bayraktar, 2001). Dilanjutkan dengan evaluasi parameter independen antara lain siklus ekstraksi (A), daya *microwave* (B), dan massa cabai rawit (C) dengan ($p < 0,05$). Selain itu, interaksi antara siklus ekstraksi dan daya *microwave* (AB); interaksi siklus ekstraksi dan massa cabai rawit (AC) juga memberikan respon signifikan ($p < 0,05$), yang artinya *yield* ekstraksi dipengaruhi oleh dua interaksi parameter tersebut.

Analisis dari *lack of fit* menunjukkan hasil yang tidak signifikan, hal ini mengindikasikan bahwa probabilitas hipotesis *null* (tidak ada interaksi parameter) tidak terjadi sehingga BBD dapat mengoptimasi dengan baik. Lebih lanjut,

koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9961, dimana mendekati 1,00 artinya derajat hubungan antara data eksperimen dan model optimasi yang sangat kuat (Belhaj *et al.*, 2017). Koefisien variasi (C.V.) pada model adalah 2,08% mempresentasikan keakuratan model terhadap *yield* yang akan dihasilkan (Šumić *et al.*, 2016). Sehingga dari hasil optimasi diperoleh persamaan orde dua sebagai berikut:

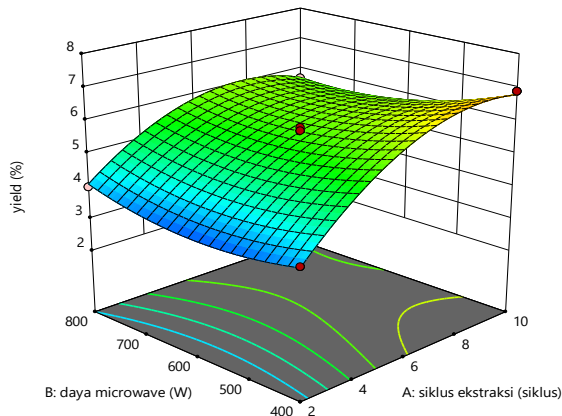
$$\text{Yield ekstraksi Capsicum} = 5,69 + 1,14 A - 0,2113 B - 0,9388 C - 0,3275 AB + 0,2375 AC - 0,1250 BC - 1,02 A^2 + 0,4400 B^2 + 0,5700 C^2 \quad (3)$$

Tabel 3. Analisis varian (ANOVA) terhadap hasil respon

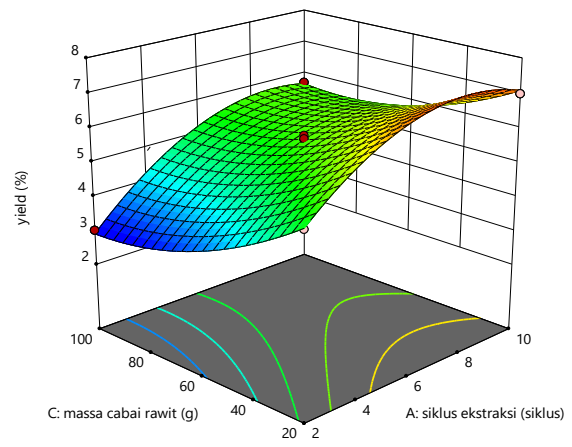
	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	24,83	9	2,760	196,69	< 0,0001	*
A-siklus ekstraksi	10,49	1	10,49	747,82	< 0,0001	
B-daya microwave	0,3570	1	0,3570	25,46	0,0015	
C-massa cabai rawit	7,05	1	7,05	502,67	< 0,0001	
AB	0,4290	1	0,4290	30,59	0,0009	*
AC	0,2256	1	0,2256	16,09	0,0051	*
BC	0,0625	1	0,0625	4,46	0,0727	**
A²	4,36	1	4,36	310,82	< 0,0001	
B²	0,8152	1	0,8152	58,12	0,0001	
C²	1,37	1	1,37	97,54	< 0,0001	
Residual	0,0982	7	0,0140			
Lack of Fit	0,0736	3	0,0245	3,99	0,1074	**
Pure Error	0,0246	4	0,0061			
Cor Total	24,93	16				
R² = 0,9961						
C.V. = 2,08						

Signifikan (*)
Insignifikan (**)

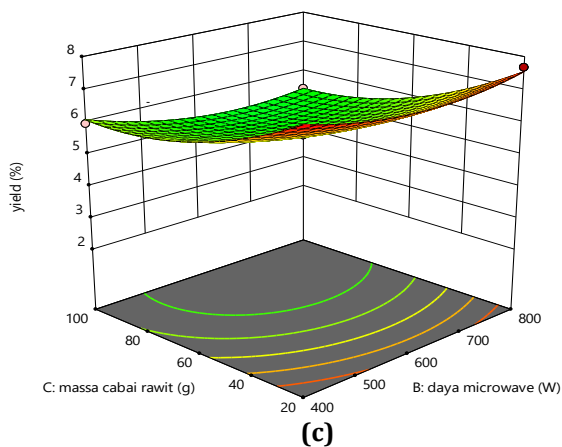
Pengaruh interaksi parameter ekstraksi



(a)



(b)



Gambar 1. Interaksi antara beberapa parameter (a) AB (b) AC (c) BC

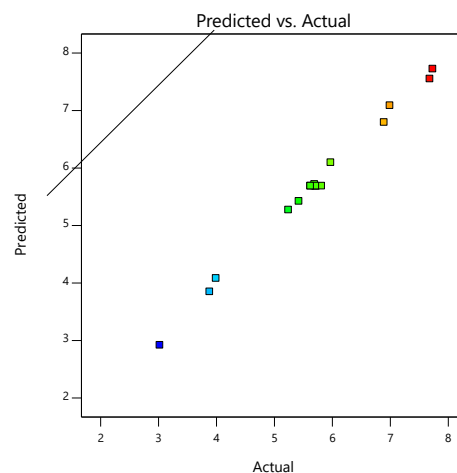
Pengaruh interaksi parameter antara siklus ekstraksi dan daya *microwave* dapat dilihat pada Gambar 1 (a). Kontur tersebut menunjukkan respon ketika siklus ekstraksi berada pada variabel paling kecil (A= 2 siklus) dengan variasi daya *microwave* (B= 400; 600; 800 W) menghasilkan *yield* ekstraksi paling kecil. Seiring meningkatnya siklus ekstraksi pada 4 dan 6 siklus maka *yield* ekstraksi semakin besar. Hal ini mengindikasikan bahwa peningkatan siklus ekstraksi memberikan pengaruh linear terhadap *yield* ekstraksi. Hal ini berkaitan dengan waktu ekstraksi yang menyebabkan kontak antara pelarut dengan bahan materi semakin intens sehingga memperbesar difusivitas pelarut dan kelarutan senyawa ekstrak (Dhobi M., 2009).

Pada Gambar 1 (b) menjelaskan interaksi antara massa cabai rawit dengan siklus ekstraksi (AC), secara umum semakin besar parameter AC maka *yield* ekstraksi yang didapatkan akan semakin kecil. Selanjutnya, siklus ekstraksi akan memberikan respon yang lebih signifikan terhadap peningkatan *yield* ekstraksi daripada variabel massa cabai rawit. Hal ini mendukung hasil kontur interaksi sebelumnya (AB) dimana parameter siklus ekstraksi lebih dominan.

Selanjutnya, interaksi antara daya *microwave* dengan massa cabai rawit (BC) memberikan respon tidak signifikan ($p > 0,05$). Pada kondisi ini, interaksi ditunjukkan pada Gambar 1 (c).

Dari Gambar 2 menyatakan hubungan data eksperimen dan model optimasi yang saling berpotongan melalui regresi linear. Hal ini

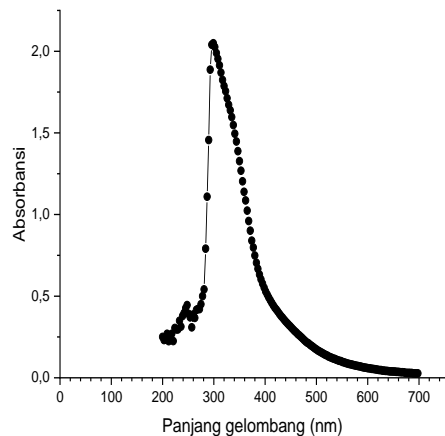
membuktikan secara matematis bahwa hasil model optimasi dan eksperimen mempunyai R^2 yang mendekati 100% sehingga garis tersebut cenderung berupa garis lurus. Kecenderungan garis tersebut memberikan konfirmasi untuk memperkuat bahwa model optimasi dapat memprediksi dengan baik *yield* ekstraksi pada eksperimen.



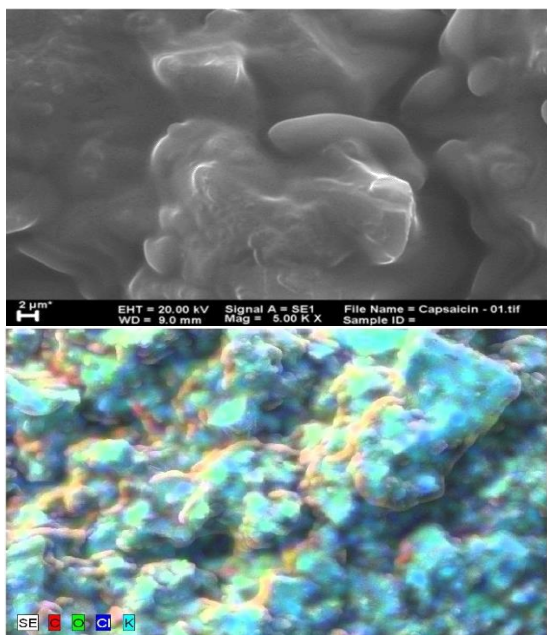
Gambar 2. Perbandingan antara model dan data eksperimen

Verifikasi dan validasi untuk optimasi kondisi ekstraksi

Menurut Raissi and Farsani (2009), respon *yield* oleh parameter eksperimen maupun model dapat mencapai kondisi ideal ketika nilai *desirability* adalah 1 (Raissi and Farsani, 2009). Dalam studi ekstraksi *Capsicum Frutescens L*, optimasi ekstraksi berada pada siklus ekstraksi (6,33 siklus), daya *microwave* (405,33 W) dan massa bahan baku (20,46 g). Sedangkan *yield* ekstraksi tertinggi hasil eksperimen adalah 6 siklus, 400 W, dan 20 g yaitu 7,7285, dimana mendekati model optimasi sebesar 7,7708. Selain itu, *error rates* antara keduanya adalah $<0,05\%$. Hal ini menunjukkan bahwa desain model menggunakan persamaan polinomial orde dua dapat digunakan untuk mengetahui pengaruh parameter dan menentukan kondisi optimum.



Gambar 3. Analisis panjang gelombang senyawa *capsaicin*



Gambar 4. Morfologi *capsaicin* menggunakan SEM-EDX

Analisis spektrofotometri UV-VIS dalam penelitian bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang terkandung di dalam sampel (setelah dilakukan ekstraksi) dengan mengambil nilai absorbansi paling besar. Dari Gambar 3 didapatkan panjang gelombang *capsaicin* yaitu 283 nm dengan nilai absorbansi terbesar 2,049. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan senyawa *capsaicin* berada pada panjang gelombang 281-285 nm (González-Zamora *et al.*, 2015). Selain itu, penelitian lain

melaporkan kandungan terbesar *capsaicin* berada pada panjang gelombang 230 nm dan 280 nm (Davis *et al.*, 2007; Vázquez-Espinosa *et al.*, 2019). Kemudian pada Gambar 4 terlihat bahwa *capsaicin* memiliki permukaan berbentuk kristal dan granular. Morfologi *capsaicin* tersebut berdasarkan uji morfologi menggunakan SEM *energy dispersive x-ray test* (EDX).

4. KESIMPULAN

Ekstraksi *Capsicum Frutescens L* menggunakan *microwave assisted soxhlet extraction* dipengaruhi oleh beberapa parameter independen dan interaksi. Pengaruh semua parameter independen (A, B, C) dan interaksi AB dan AC memberikan pengaruh signifikan terhadap *yield* ekstraksi. Kondisi *yield* tertinggi berada pada siklus ekstraksi (6 siklus), daya *microwave* (400 W), dan massa cabai rawit (20 g). Selanjutnya, hasil optimasi RSM menghasilkan kondisi optimal pada 6,33 siklus, 405,33 W dan 20,46 g. *Response surface methodology* (RSM) ternyata dapat mengevaluasi dan memvalidasi dengan baik dengan persentase kesalahan <0,05%. Hal ini dapat dijadikan rujukan untuk mendesain parameter ekstraksi *Capsicum Frutescens L* apabila digunakan pada skala besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Agcam, E., Akyıldız, A. and Balasubramaniam, V. M. (2017) 'Optimization of Anthocyanins Extraction from Black Carrot Pomace with Thermosonication', *Food Chemistry*, 237, pp. 461–470. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.098.
- Aydar, A., Bağdatlıoğlu, N. and Köseoğlu, O. (2017) 'Effect of ultrasound on olive oil extraction and optimization of ultrasound-assisted extraction of extra virgin olive oil by response surface methodology (RSM)', *International journal of fats and oils*, 68. doi: 10.3989/gya.1057162.
- Bayraktar, E. (2001) 'Response surface optimization of the separation of DL-tryptophan using an emulsion liquid membrane', *Process Biochemistry*, 37(2), pp. 169–175. doi: 10.1016/S0032-9592(01)00192-3.
- Belhaj, D. *et al.* (2017) 'Box-Behnken design for extraction optimization of crude polysaccharides from Tunisian *Phormidium versicolor* cyanobacteria (NCC

- 466): Partial characterization, in vitro antioxidant and antimicrobial activities', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 105, pp. 1501–1510. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.046.
- Castejón, N., Luna, P. and Señoráns, F. J. (2018) 'Alternative oil extraction methods from *Echium plantagineum L.* seeds using advanced techniques and green solvents', *Food Chemistry*, 244, pp. 75–82. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.014.
- Catchpole, O. J. *et al.* (2003) 'Extraction of Chili, Black Pepper, and Ginger with Near-Critical CO₂, Propane, and Dimethyl Ether: Analysis of the Extracts by Quantitative Nuclear Magnetic Resonance', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), pp. 4853–4860. doi: 10.1021/jf0301246.
- Cheng, Z. *et al.* (2017) 'Simultaneous extraction and purification of polysaccharides from *Gentiana scabra Bunge* by microwave-assisted ethanol-salt aqueous two-phase system', *Industrial Crops and Products*. Elsevier B.V., 102, pp. 75–87. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.03.029.
- Damião, M. C. F. C. B. *et al.* (2014) 'Novel Capsaicin Analogues as Potential Anticancer Agents: Synthesis, Biological Evaluation, and In Silico Approach', *Archiv der Pharmazie*, 347(12), pp. 885–895. doi: 10.1002/ardp.201400233.
- Davis, C. B. *et al.* (2007) 'Determination of Capsaicinoids in Habanero Peppers by Chemometric Analysis of UV Spectral Data', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), pp. 5925–5933. doi: 10.1021/jf070413k.
- Derry, S. *et al.* (2008) 'Topical capsaicin for chronic neuropathic pain in adults', in Moore, M. (ed.) *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1002/14651858.CD007393.
- Dhobi M., M. V. and H. S. (2009) 'Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan - silybinin', *Journal of Chemical Metrology*, 1(2009), pp. 13–23. Available at: <http://www.acgpubs.org/JCM/2009/Volu>
- me 3/Abstracts/JCM_0909_15.htm.
- Goci, E. *et al.* (2014) 'Application and Comparison of Three Different Extraction Methods of Capsaicin From Capsicum Fruits', *Albanian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(1), pp. 16–19.
- González-Zamora, A. *et al.* (2015) 'Measurement of capsaicinoids in chiltepin hot pepper: A comparison study between spectrophotometric method and high performance liquid chromatography analysis', *Journal of Chemistry*, 2015. doi: 10.1155/2015/709150.
- Li, R. *et al.* (2010) 'Extraction of essential oils from garlic (*Allium sativum*) using ligarine as solvent and its immunity activity in gastric cancer rat', *Medicinal Chemistry Research*, 19(9), pp. 1092–1105. doi: 10.1007/s00044-009-9255-z.
- Myres, R. H., Montgomery, D. C. and Anderson-Cook, C. M. (2002) 'Process and Product Optimization Using Designed Experiments', in *Response Surface Methodology*. 2nd edn. New York.
- Naves, E. R. *et al.* (2019) 'Capsaicinoids: Pungency beyond Capsicum', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 24(2), pp. 109–120. doi: 10.1016/j.tplants.2018.11.001.
- Raissi, S. and Farsani, R.-E. (2009) 'Statistical Process Optimization Through Multi-Response Surface Methodology', *International Journal of Mathematical and Computational Sciences*, 3(3), pp. 197–201.
- Sagwan, L., Survase, S. and Annapure, U. S. (2010) 'Application of Response Surface Methodology for Production of Capsaicin from *Capsicum Annum L.*', *International Journal of Biotechnology Research*, 4, pp.11–18.
- Sganzerla, M. *et al.* (2014) 'Fast method for capsaicinoids analysis from Capsicum chinense fruits', *FRIN*. Elsevier Ltd, 64, pp. 718–725. doi: 10.1016/j.foodres.2014.08.003.
- Šumić, Z. *et al.* (2016) 'Modeling and optimization of red currants vacuum drying process by response surface methodology (RSM)', *Food Chemistry*, 203, pp. 465–475. doi:

10.1016/j.foodchem.2016.02.109.

Szolcsányi, J. (2004) 'Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology', *Neuropeptides*, 38(6), pp. 377–384. doi: 10.1016/j.npep.2004.07.005.

Teixeira, M. J. *et al.* (2015) 'Liposomal topical capsaicin in post-herpetic neuralgia: a safety pilot study', *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 73(3), pp. 237–240. doi: 10.1590/0004-282X20140232.

Variyana, Y., Muchammad, R. S. C. and Mahfud, M. (2019) 'Box-behnken design for the optimization using solvent-free microwave gravity extraction of garlic oil from *Allium sativum* L.', *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 673(1). doi: 10.1088/1757-899X/673/1/012005.

Vázquez-Espinosa, M. *et al.* (2019) 'Optimizing and comparing ultrasound- And microwave-assisted extraction methods applied to the extraction of antioxidant capsinoids in peppers', *Agronomy*, 9(10). doi: 10.3390/agronomy9100633.

Wang, J. *et al.* (2008) 'Food Chemistry Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran', *Food Chemistry*, 106, pp. 804–810. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.06.062.

Wang, Z. D. *et al.* (2017) 'Optimisation of steam distillation extraction oil from onion by response surface methodology and its chemical composition', *Natural Product Research*. Taylor & Francis, 32, pp. 112–115. doi: 10.1080/14786419.2017.1327863.

Yaldiz, G., Ozguven, M. and Sekeroglu, N. (2010) 'Variation in capsaicin contents of different *Capsicum* species and lines by varying drying parameters', *Industrial Crops and Products*. Elsevier B.V., 32(3), pp. 434–438. doi: 10.1016/j.indcrop.2010.06.013.

Yu, J. *et al.* (2007) 'Food Chemistry Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds', *Food Chemistry*, 105, pp. 1026–1031. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.062.