

ABSTRAK, EXECUTIVE SUMMARY

Bidang Unggulan: Kopi untuk kesejahteraan nasional

Kode>Nama Rumpun Ilmu: 112/Kimia

LAPORAN PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI



**PENGEMBANGAN KEMOSENSOR DAN BIOSENSOR
ANTIOKSIDAN SEBAGAI METODE CEPAT DAN MUDAH
UNTUK PENENTUAN KUALITAS BIJI BERASAN KOPI**

Tahun ke-2 dari rencana 2 tahun

Oleh:

Dr. Agus Abdul Gani, M.Si.

NIDN: 0001085707

Prof. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D.,

NIDN:0001026907

Moch. Amrun Hidayat, M.Farm., Apt.

NIDN:0026017801

UNIVERSITAS JEMBER

Nopember 2014

PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI

Bidang Unggulan : Kopi untuk kesejahteraan nasional
Kode>Nama Rumpun Ilmu: 112/Kimia

Peneliti : Agus Abdul Gani¹, Bambang Kuswandi², Moch Amrun Hidayat³,
Mahasiswa terlibat : Imamah Listiya Annisa⁴, Pratama Putra Ramadan⁴
Sumber Dana : BOPTN-DIKTI 2014
Kontak Email : agusagani@yahoo.com
Diseminasi : belum ada

¹ Jurusan Pendidikan MIPA - Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan

² Jurusan Kimia Farmasi - Fakultas Farmasi Universitas Jember

³ Jurusan Biologi Farmasi - Fakultas Farmasi Universitas Jember

⁴ Jurusan Kimia Farmasi – Fakultas Farmasi Universitas Jember.

ABSTRAK

PENGEMBANGAN KEMOSENSOR DAN BIOSENSOR ANTIOKSIDAN SEBAGAI METODE CEPAT DAN MUDAH UNTUK PENENTUAN KUALITAS BIJI BERASAN KOPI

Dari berbagai studi ilmiah diketahui bahwa kopi memiliki efek positif terhadap kesehatan. Efek farmakologi kopi tersebut terkait erat dengan kandungan senyawa antioksidan di dalamnya seperti kafein dan asam klorogenat. Berbagai metode dikembangkan untuk mendeteksi senyawa antioksidan di dalam kopi, misalnya dengan teknik metode HPLC dan spektrofotometri UV-Vis. Namun demikian, metode kromatografi dan spektrometri tersebut memiliki beberapa kelemahan. Oleh karenanya dibutuhkan alternatif metode pengujian aktifitas antioksidan kopi yang cepat, tepat, murah dan mudah. Pengembangan alat uji antioksidan sederhana telah dilakukan melalui desain, konstruksi dan fabrikasi kemosensor dan biosensor berbasis *3-metil-2-benzothiozolin hidrazon* (MBTH) dan enzim *polyphenol oxidase* (PPO). Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan sampel kopi yakni dengan mengukur perubahan warna yang ditimbulkan oleh interaksi senyawa antioksidan dalam kopi dengan reagen MBTH dan enzim PPO. Desain sensor menggunakan matriks pendukung *blister* dan *96 multiwellplate* yang kecil, kompak dan sederhana sehingga mudah di bawa kemanapun (*portable*). Kontribusi dari penelitian ini adalah memberikan solusi nyata, berupa alat dan metode penentuan kualitas kopi, sehingga kualitas kopi Indonesia dapat ditingkatkan melalui *screening* menggunakan biosensor antioksidan yang dapat dioperasikan secara cepat, tepat, mudah dan murah. Selain itu, penelitian ini merupakan bagian dari penelitian unggulan Universitas Jember 2013-2020 yakni “Kopi untuk kesejahteraan Nasional”. Fabrikasi biosensor dengan menggunakan reagen MBTH yang dipadu dengan enzim PPO, dan diimobilisasikan pada material pendukung telah berhasil dilakukan. Biosensor antioksidan hasil fabrikasi memiliki waktu respon 14 menit, linieritas (25-300) ppm, volume larutan sampel optimum 4 μ L, linieritas 0,997 dengan sensitifitas 0,085 ppm, LOD 20,601 ppmCE, LOQ 68,671 ppmCE, RSD kepresisian 3,111 %, keakuratan (recovery) 103,068 %. Aplikasi biosensor terhadap sampel nyata memberikan hasil tidak berbeda dengan penggunaan metode spektroskopi yang telah distandarkan. Berarti biosensor antioksidan berbasis MBTH dan PPO hasil fabrikasi memiliki kelayakan untuk diaplikasikan penentuan kualitas biji berasan kopi.

Kata Kunci : Biosensor, Antioksidan, MBTH, PPO, Biji berasan kopi

PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI

Bidang Unggulan : Kopi untuk kesejahteraan nasional

Kode>Nama Rumpun Ilmu: 112/Kimia

Peneliti : Agus Abdul Gani¹, Bambang Kuswandi², Moch Amrun Hidayat³,
Mahasiswa terlibat : Imamah Listiya Annisa⁴, Pratama Putra Ramadan⁴
Sumber Dana : BOPTN-DIKTI 2014
Kontak Email : agusagani@yahoo.com
Diseminasi : belum ada

¹ Jurusan Pendidikan MIPA - Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan

² Jurusan Kimia Farmasi - Fakultas Farmasi Universitas Jember

³ Jurusan Biologi Farmasi - Fakultas Farmasi Universitas Jember

⁴ Jurusan Kimia Farmasi – Fakultas Farmasi Universitas Jember.

RINGKASAN

PENGEMBANGAN KEMOSENSOR DAN BIOSENSOR ANTIOKSIDAN SEBAGAI METODE CEPAT DAN MUDAH UNTUK PENENTUAN KUALITAS BIJI BERASAN KOPI

Kopi merupakan salah satu komoditi subsektor perkebunan yang memegang peranan penting dalam perekonomian nasional khususnya sebagai sumber devisa dan penyedia lapangan kerja. Dari berbagai studi ilmiah diketahui bahwa kopi memiliki efek positif terhadap kesehatan. Kopi dapat menurunkan resiko penyakit diabetes, menurunkan resiko penyakit Parkinson serta meningkatkan kesadaran dan suasana hati. Efek farmakologi kopi tersebut terkait erat dengan kandungan senyawa antioksidan di dalamnya seperti kafein dan asam galat.

Berbagai metode dikembangkan untuk mendeteksi senyawa antioksidan di dalam kopi, misalnya dengan spektrofotometri UV-Vis, HPLC atau spektroskopi. Namun demikian, metode spektrometri dan kromatografi tersebut memiliki beberapa kelemahan, yakni: membutuhkan peralatan yang relatif mahal, analisis harus memiliki pengetahuan dan keterampilan kimia analisis yang memadai, waktu analisis yang relatif lama serta membutuhkan volume sampel yang relatif besar. Oleh karenanya dibutuhkan alternatif metode pengujian aktifitas antioksidan kopi yang cepat, tepat, murah dan mudah.

Pengembangan alat uji antioksidan sederhana dapat dilakukan melalui desain, konstruksi dan fabrikasi biosensor enzim yang spesifik terhadap keberadaan senyawa antioksidan. Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan sampel kopi yakni dengan mengukur perubahan warna yang ditimbulkan oleh interaksi senyawa antioksidan dalam kopi dengan enzim. Desain sensor menggunakan matriks pendukung *blister* dan *96 multiwellplate* yang kecil, kompak dan sederhana sehingga mudah di bawa kemanapun (*portable*).

Penelitian ini dilakukan bertujuan, memberikan solusi alternative cara control kualitas kopi secara mudah dan cepat, melalui fabrikasi atau mendesain biosensor berbasis *imobilisasi* enzim yang spesifik terhadap keberadaan senyawa antioksidan seperti *polyphenol oxidase* (PPO). Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan sampel kopi yakni dengan mengukur perubahan warna yang ditimbulkan oleh interaksi senyawa antioksidan dalam kopi dengan enzim PPO. Desain sensor menggunakan matriks pendukung *blister* dan *96 multiwellplate* yang kecil, kompak dan sederhana sehingga mudah di bawa kemanapun (*portable*). Berdasarkan perubahan warna sensor dan intensitasnya, dapat ditentukan kandungan senyawa antioksidan dalam kopi.

Biosensor hasil fabrikasi selanjutnya dilakukan uji kapabilitas yang meliputi waktu respon, linieritas, keakuratan dan kepresisian sensor dalam proses deteksi dan determinasi antioksidan dalam biji berasan kopi. Kababilitas sensor juga dibandingkan dengan metode yang sudah distandarkan, yaitu Spektrometri UV-Vis.

Kontribusi dari penelitian ini adalah memberikan solusi nyata, berupa alat dan metode penentuan kualitas kopi, sehingga kualitas kopi Indonesia dapat ditingkatkan melalui *screening* kualitas kopi menggunakan biosensor antioksidan yang dapat dioperasikan secara cepat, tepat, mudah dan murah. Selain itu, penelitian ini merupakan bagian dari penelitian unggulan Universitas Jember 2013-2020 yakni “Kopi untuk kesejahteraan Nasional”.

Langkah awal pada penelitian tahun kedua ini dilakukan fabrikasi biosensor dengan cara mengimobilisasikan enzim Polyphenol Oksidase (PPO) ke material gel pendukung. Enzim tersebut ditetaskan pada blister obat. Blister obat yang telah terisi gel dan terimobilisasi enzim selajutnya dikeringkan selama 30 menit untuk membentuk biosensor polifenol. Wujud sensor hasil fabrikasi berupa lembaran sensor, kapabilitas sensor berdasarkan interaksinya dengan antioksidan dalam larutan sampel kopi dipaparkan sebagaimana data-data dan gambar-gambar berikut.

Biosensor yang dihasilkan memberikan warna keunguan, namun ketika sensor tersebut diaplikasikan pada sampel terjadi perubahan warna dari ungu menjadi berwarna merah. Hal tersebut disebabkan karena terjadi oksidasi polifenol karena adanya enzim PPO yang menghasilkan kuinon, kemudian kuinon berikatan dengan MBTH membentuk kompleks berwarna merah kecoklatan, sebagaimana dipaparkan pada Gambar 1.



Sebelum kontak dengan larutan sampel



Sesudah kontak dengan larutan sampel

Gambar 1. Wujud sensor hasil fabrikasi dan perubahan warna sensor.

Optimasi MBTH, terjadinya perubahan warna dapat diamati seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Perubahan warna yang terjadi pada optimasi konsentrasi MBTH

Secara visual perubahan warna berdasar nilai $\Delta mean RGB$ yang paling baik diperoleh pada konsentrasi 12 mg/mL $\Delta mean RGB$ yang dihasilkan cukup tinggi yaitu 27,665.

Optimasi Perbandingan Volume Reagen

Optimasi perbandingan volume reagen dilakukan untuk menentukan perbandingan volume MBTH dengan enzim PPO yang mampu memberikan hasil yang optimal. Hasil dari optimasi perbandingan volume reagen yang telah direaksikan dengan kafein 150 ppm ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Perubahan warna yang terjadi pada optimasi perbandingan volume reagen MBTH (m) dan enzim PPO (e)

Gambar 3 menunjukkan bahwa perbandingan 1:1 merupakan nilai perbandingan yang paling optimal, dengan nilai $\Delta mean RGB$ yang paling besar yaitu 27,903. Perbandingan 1:1 menunjukkan volume MBTH dan enzim PPO yang diimobilisasikan pada *chip* kertas adalah sebanyak 5,0 ml MBTH 12 mg/mL dan 5,0 ml PPO 500 unit/mL.

Waktu Respon Sensor

Waktu respon sensor berdasarkan intensitas sinyal yang dihasilkan didapatkan bahwa intensitas sinyal mulai stabil setelah mencapai waktu 14 menit. Dengan demikian berarti waktu respon sensor kimia berbasis enzim PPO dan 3-metil-2-benzothiazolinon (MBTH) untuk deteksi polifenol adalah 14 menit.

Optimasi Volume Larutan Sampel

Optimasi volume larutan sampel dalam proses deteksi fenolat dilakukan dengan memvariasikan volume larutan sampel dan metode pencelupan. Selanjutnya antara kedua metode di tetapkan optimasi terbaik untuk volume larutan sampel. Berdasarkan data, didapatkan realita bahwa metode celup dengan menggunakan sensor didapatkan intensitas RGB 52,828. Berdasarkan variasi volume larutan sampel, didapatkan bahwa volume larutan sampel yang dialirkan untuk berinteraksi dengan sensor terbaik, yang sesuai dengan metode celup adalah 4 μ L memberikan intensitas RGB 52, 389, mendekati teknik celup.

Linieritas Sensor dan Sensitivitas

Penentuan linieritas dilakukan dengan membuat seri konsentrasi standar asam klorogenat 25-300 ppm. Standar asam klorogenat diteteskan pada biosensor polifenol dan kemudian diukur perubahan intensitas warna yang terjadi ($\Delta \text{mean RGB}$). Realitanya dapat diketahui bahwa adanya hubungan yang proporsional antara konsentrasi analit terhadap respon dari biosensor polifenol. Linieritas berada pada rentang 25-300 ppm dengan persamaan regresi $y = 0,1078x + 28,231$. Linieritas tersebut telah memenuhi parameter linieritas dengan nilai koefisien korelasi (r) mendekati ± 1 (Harmita, 2004) dan lebih besar dari $r_{\text{tabel}} = 0,917$ (Supardi, 2012) dengan nilai r yang dihasilkan adalah 0,997 dan nilai koefisien variasi dari fungsi (V_{x_0}) tidak lebih besar dari 5% (Yuwono dan Indrayanto, 2005) yaitu sebesar 4,7%. Berdasarkan persamaan regresi, nilai slope yang dihasilkan sebesar 0,1078. Nilai tersebut dapat diartikan bahwa dengan adanya perubahan konsentrasi sebesar 1 ppm CE akan mengakibatkan perubahan $\Delta \text{mean RGB}$ sebesar 0,1078.

Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas terkecil konsentrasi polifenol CE dalam sampel yang masih dapat terdeteksi oleh biosensor polifenol dapat diketahui dengan menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi biosensor polifenol. Berdasar data linieritas, simpangan baku residual (Sy/x) data linieritas tersebut sebesar 0,5324. Sehingga didapatkan nilai untuk batas deteksi adalah 20,601 ppm CE dan batas kuantitasi biosensor polifenol adalah 68,671 ppm CE .

Selektivitas

Penentuan selektivitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan dari metode ini untuk mengukur kadar polifenol secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang ada dalam sampel. Komponen lain yang sering ada dalam beberapa sampel minuman kopi adalah gula sebagai pemanis. Keberadaan gula ini cukup sering ditemukan sehingga dilakukan uji selektivitas biosensor polifenol ini terhadap gula. Penentuan selektivitas dilakukan menggunakan asam klorogenat dengan gula adalah 1:0,67 ; 1:1,34 ; 1:2,00 ; 1:2,67 dan 1:3,33. Selektivitas ditentukan dengan cara mengukur nilai mean RGB dari standar asam klorogenat 150 ppm dengan adanya pengganggu gula dibandingkan dengan standar asam klorogenat 150 ppm yang tidak mengandung pengganggu gula. Realita menunjukkan bahwa keberadaan gula tidak berpengaruh sebagai pengganggu dari kerja biosensor polifenol. Penambahan gula sampai sebesar 500 ppm pada standar asam klorogenat 150 ppm atau dengan perbandingan antara asam klorogenat dan gula sebesar 1:3,33 memberikan nilai interferensi 4,117 %. Nilai tersebut masih lebih rendah dari nilai % interferensi yang diperbolehkan yaitu 5% (Yuwono dan Indrayanto, 2005), berarti biosensor layak digunakan.

Presisi

Presisi merupakan hasil pengulangan pengukuran yang menunjukkan kedekatan respon biosensor polifenol. Pengukuran sampel direplikasi sebanyak 6 kali. Hasil pengukuran kepresisian didapatkan persamaan regresi yang berdasar kurva kalibrasi adalah $y = 0,1091x + 28,11$. Sampel yang digunakan adalah kopi

Arabika. Berdasarkan data tersebut dapat diketahui rata-rata kadar polifenol dalam sampel sebesar 155,420 ppm *CE*. Nilai *RSD* yang didapatkan adalah 3,111%. Sedangkan kriteria penerimaan nilai *RSD* berdasarkan konsentrasi analit yang diperiksa adalah 5,3% untuk analit dengan konsentrasi sekitar 100 ppm *CE* (Huber, 2007). Karena nilai *RSD* yang dihasilkan oleh biosensor polifenol ini lebih kecil dari 5,3% maka dapat dikatakan bahwa biosensor polifenol memenuhi persyaratan parameter presisi.

Akurasi

Akurasi ditentukan dengan menghitung nilai % perolehan kembali, dilakukan dengan metode standar adisi yaitu dengan menambahkan standar asam klorogenat konsentrasi tertentu pada sampel kopi Arabika. Berdasarkan data didapatkan bahwa nilai perolehan kembali sampel adalah sebesar 103,068 %. Nilai tersebut memenuhi persyaratan parameter akurasi untuk konsentrasi analit sekitar 100 ppm *CE* yaitu 90-107% (Huber, 2007).

Waktu Pakai

Waktu pakai biosensor polifenol ini ditentukan dari stabilitasnya. Pada penelitian dilakukan pengujian stabilitas pada 3 kondisi yaitu suhu ruang ($\pm 27^{\circ}\text{C}$), suhu *chiller* (2-8 $^{\circ}\text{C}$) dan suhu *freezer* [(-20)-(0) $^{\circ}\text{C}$]. Waktu pakai habis jika respon yang dihasilkan mengalami penurunan 15% dari respon awal. Penurunan terjadi lambat pada biosensor yang disimpan pada suhu *freezer*. Pada suhu *freezer* penurunan respon biosensor polifenol lebih 15% terjadi pada hari ke-9, pada suhu *chiller* pada hari ke-5 dan pada suhu ruang terjadi pada hari pertama. Sehingga penetapan batas waktu pakai pada suhu *freezer* adalah selama 8 hari dan pada suhu *chiller* selama 4 hari. Sedangkan penyimpanan pada suhu ruang harus dihindari karena biosensor polifenol ini tidak stabil di suhu ruang dan waktu pakai akan langsung habis dalam 1 hari saja jika dilakukan penyimpanan di suhu ruang.

Aplikasi Sampel Nyata

Sampel yang digunakan merupakan produk minuman kopi dalam kemasan botol plastik. Sampel didapat dari supermarket dan minimarket yang berada di wilayah Jember. Sampel yang diuji terdiri dari 5 merk yang telah diberi kode A (Robusta 100%), B (Arabika 100%), C (Blend robusta : arabika = 9:1), D (Blend robusta : arabika = 3:1), dan E (Green Coffee robusta). Pengujian sampel pada biosensor polifenol dilakukan dengan meneteskan sampel pada biosensor yang sebelumnya telah ditetesi larutan mediator. Setelah 15 menit perubahan warna yang terjadi diukur. Kemudian dihitung konsentrasi polifenol dalam sampel dengan memasukkan nilai $\Delta mean RGB$ (y) ke dalam persamaan garis kurva hubungan antara konsentrasi asam klorogenat dengan $\Delta mean RGB$, $y = 0,1088x + 28,11$ ($r = 0,997$). Dari persamaan diperoleh konsentrasi polifenol (x) dari masing-masing sampel yang setara dengan ppm *CE*. Hasil dari pengujian sampel menggunakan biosensor polifenol dapat dilihat pada Tabel 1 di halaman berikut.

Tabel 1 Data hasil pengukuran polifenol dalam sampel nyata menggunakan biosensor polifenol hasil fabrikasi

Sampel	Konsentrasi polifenol (ppm CE)
A (Robusta 100%)	164,224 ± 1,318
B (Arabika 100%)	216,809 ± 5,886
C (Blend robusta : arabika = 9:1)	116,948 ± 0,768
D (Blend robusta : arabika = 3:1)	161,598 ± 3,101
E (Green Coffee robusta)	129,944 ± 2,469

Perbandingan Metode

Perbandingan metode dilakukan dengan mengukur kadar polifenol pada sampel yang sama namun dengan menggunakan 2 metode yang berbeda dan kedua hasil yang telah diperoleh dibandingkan. Metode pertama menggunakan biosensor polifenol. Metode kedua merupakan metode yang telah ada dan diterima, yaitu dengan mengukur kadar polifenol total menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu (FC)*. Data lengkap hasil pengukuran sebagaimana tertera dalam Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Data perbandingan konsentrasi polifenol (ppm CE) dalam sampel menggunakan metode biosensor polifenol dan FC (n=3)

Sampel	Konsentrasi polifenol (ppm CE)	
	Biosensor polifenol	FC
A (Robusta 100%)	164,224 ± 1,318	178,589 ± 2,478
B (Arabika 100%)	216,809 ± 5,886	232,756 ± 1,566
C (Blend robusta : arabika = 9:1)	116,948 ± 0,768	111,301 ± 0,914
D (Blend robusta : arabika = 3:1)	161,598 ± 3,101	158,879 ± 3,867
E (Green Coffee robusta)	129,944 ± 2,469	134,135 ± 0,855

Hasil konsentrasi polifenol dalam sampel menggunakan biosensor polifenol dan FC tersebut dibandingkan menggunakan uji t-perpasangan (*paired t-test*). Dari hasil uji t-perpasangan ini didapatkan nilai t_{hitung} sebesar 2,247 sedangkan t_{tabel} nya adalah 3,710. Sehingga dapat dinyatakan bahwa metode biosensor polifenol ini tidak memberikan perbedaan yang signifikan karena nilai t_{hitung} lebih kecil dari t_{tabel} (Gandjar dan Rohman, 2012). Dengan demikian biosensor polifenol yang telah dikembangkan ini dapat menjadi metode alternatif untuk mengukur kadar polifenol.

Berdasarkan hasil penelitian, fabrikasi biosensor antioksidan yang telah dibuat, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut. (1) Biosensor antioksidan kualitas kopi telah berhasil difabrikasi menggunakan reagen 3-metil-2-benzothiazolinon (MBTH), enzim PPO yang diimmobilisasikan pada kertas whatman. (2) Biosensor antioksidan hasil fabrikasi dari sisi waktu respon, linieritas dan batas deteksi, selektivitas, kepresisian, akurasi, waktu pakai, memiliki kapabilitas yang layak untuk mengidentifikasi kualitas kopi melalui larutan berasan kopi. (3) Determinasi kualitas kopi dengan menggunakan biosensor antioksidan hasil fabrikasi memberikan kuantitas yang sama (tidak berbeda nyata) dengan metode deteksi yang sudah distandarkan, berarti biosensor antioksidan hasil fabrikasi memiliki kelayakan diaplikasikan untuk menentukan kualitas kopi di lapangan dengan operasional yang sederhana, cepat dan biaya murah.

Kata Kunci : Biosensor, Antioksidan, MBTH, PPO, Biji berasan kopi

DAFTAR PUSTAKA

- AEKI. (2005). Statistik Kopi Tahun 2003-2005. Asosiasi Eksportir Kopi Indonesia, Jakarta.
- Al-Othman, Z.A., Aqel, A., Alharbi, M.K.E., Badjah-Hadj-Ahmed, A.Y., Al-Warthan, A.A. (2012). Fast chromatographic determination of caffeine in food using a capillaryhexyl methacrylate monolithic column. *Food Chemistry*. 132, 2217–2223.
- Ayelign, A., Sabally K.(2013). Determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans using HPLC. *American Journal of Research Communication*, 1,2, 78-91.
- Belay, A., Gholap, A.V.(2009). Characterization and determination of chlorogenicacids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 3,11, 234-240.
- Berker, K. I., Guclu, K., Tor, Izzet., Demirata, B., dan Apak, R. (2010). TotalAntioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian BlueMethod. *Food Analytical Methods*,3, 3, 154-168.
- Bisht, S., Sisodia, S. (2010). Coffea arabica: A wonder gift to medical science. *J. Natural Pharmaceuticals*, 1, 1,58-65.
- Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002).Chemicalcharacterization and antioxidant properties of coffee melanoidins.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6527–6533.
- Coughlin, J. R. (2006). Coffee and health: The holistic approach. In Proceedings of the21st ASIC colloquium, Montpellier, France, pp. 29–35.
- Czech, K., Johnson, A., Rodeberg, N. (2011). Simultaneous determination of caffeine and theobromine in local area coffee brews. *Concordia College Journal of Analytical Chemistry*, 2, 17-22.
- Farah, A., Paulis, T.D., Moreira, D.P., Trugo, L.C., Martin, P.R. (2006).*J. Agric. Food Chem.* 54, 374-381.
- Gandjar, I. G., dan Rohman, A. 2012. *Kimia Farmasi Analisis*. (Edisi ketiga). Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3): 117 – 135.
- Huber, L. 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories. (Second Edition)*. New York: Informa Health Care USA, Inc.
- Kuswandi B, 2010b. *Bioensor (Konsep, Desain & Eksperimentasi)*. Jember: Jember University Press.
- Ling, L.S.,Daud, N.I.N., Hassan, O. (2001). Determination Of Coffee Content In Coffee Mixtures. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 7, 2, 327-332

- López-Martínez, L., López-de-Alba, P.L., García-Campos, R., León-Rodríguez, L.M.D. (2003). Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. *Analytica Chimica Acta*, 493, 83-94.
- Maidon, A.B.M.A., Mansoer, A.O., Sulistyarti, H. (2012). *Journal of Applied Sciences Research*, 8, 5, 2439-2442.
- Minunni M, Bilia AR, 2008. Biosensing approach in natural product research, in: Colegate SM, Molyneux RJ (Eds.). *Bioactive natural products-detection, isolation, and structural determination*. 2nd edition. New York: CRC Press. 299-321.
- Oestreich-Janzen, S. (2010). *Chemistry of Coffee*, 3.25, Elsevier Ltd., 1085-1113.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, M. B., & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, 133, 2812–2819.
- Phan, T.T.D., Kuban, V., Kráčmar, S. (2012). Determination of caffeine contents of coffee brands in the Vietnamese market. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1, 995-1002.
- Reiger, H.P. (1994). *Electrochemistry*. 2nd edition. New York: Chapman and Hall, Inc.
- Sánchez-Gonzalez, I., Jiménez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90, 133–139.
- Supardi. 2012. *Aplikasi Statistika dalam Penelitian*. Jakarta: UFUK Press.
- Yuwono, M., dan Indrayanto, G. 2005. *Validation of Chromatographic Methods of Analysis*. Dalam Brittain, H. (Ed). Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology. 32: 243-259. Elsevier Inc.