



**PENGEMBANGAN BIOSENSOR POLIFENOL BERBASIS
POLIFENOL OKSIDASE (PPO) DAN 3-METIL-2-
BENZOTHIOZOLINONHIDRAZON (MBTH)
UNTUK DETEKSI POLIFENOL PADA
PRODUK MINUMAN KOPI**

SKRIPSI

Oleh

**Imamah Listiya A.
NIM 112210101032**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



**PENGEMBANGAN BIOSENSOR POLIFENOL BERBASIS
POLIFENOL OKSIDASE (PPO) DAN 3-METIL-2-
BENZOTHIOZOLINON HIDRAZON (MBTH)
UNTUK DETEKSI POLIFENOL PADA
PRODUK MINUMAN KOPI**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

oleh

**Imamah Listiya A.
NIM 112210101032**

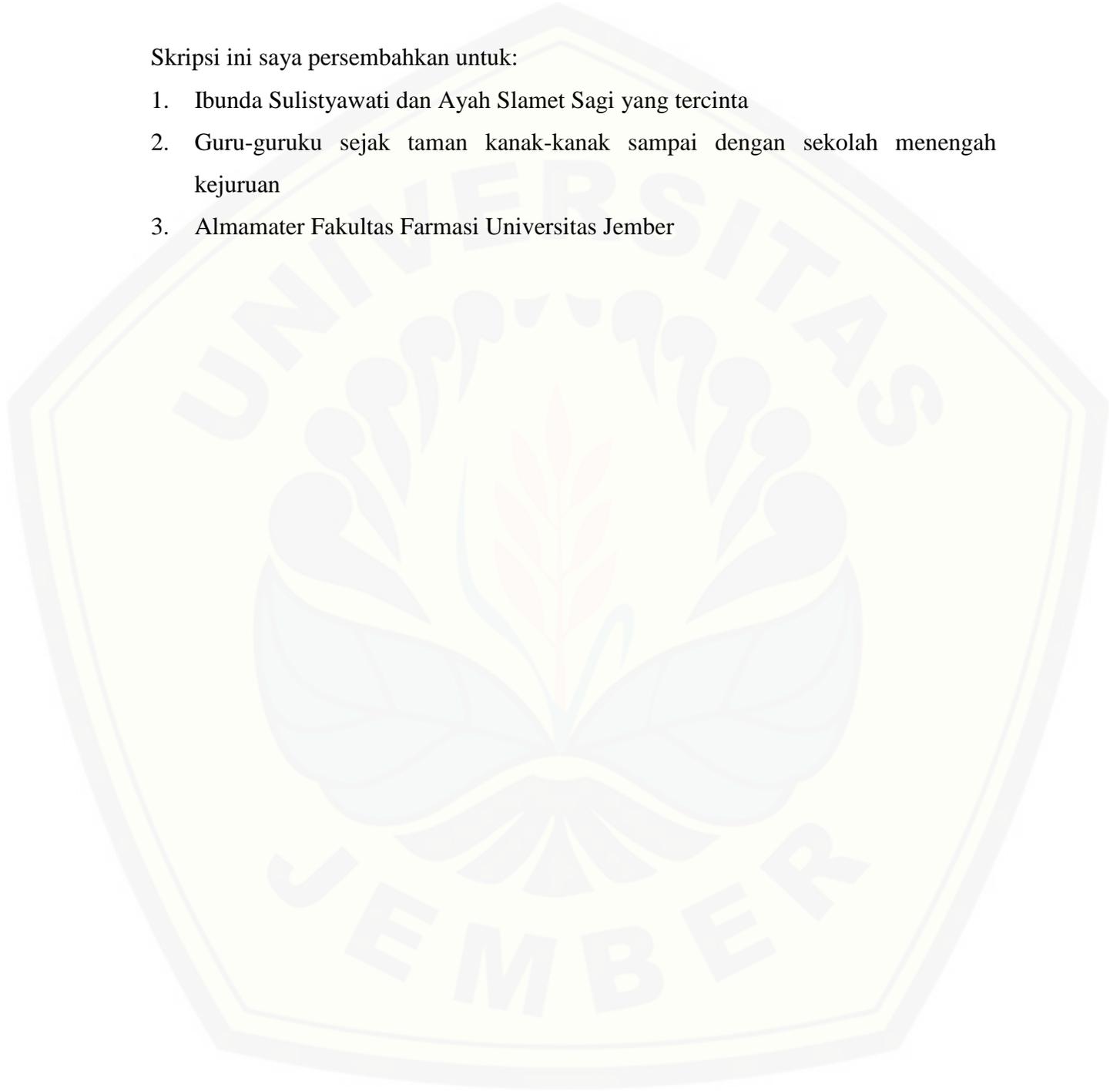
**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Sulistyawati dan Ayah Slamet Sagi yang tercinta
2. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan sekolah menengah kejuruan
3. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember



MOTTO

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka jika kamu telah selesai (dari sebuah urusan), kerjakan dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain.

Dan hanya kepada Tuhanmu-lah hendaknya kamu berharap

(QS. Al-Insyirah ayat 6-8)

Barang siapa yang memudahkan urusan orang lain di dunia niscaya Allah akan memudahkan urusannya di dunia dan di akhirat (HR. Muslim)

Barang siapa membuat kedua orang tuanya ridho, maka Allah akan ridho kepadanya (HR. Hakim dan Thabrani)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini ;

Nama : Imamah Listiya Annisa

NIM : 112210101032

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Pengembangan Biosensor Polifenol Berbasis Polifenol Oksidase (PPO) dan 3-Metil-2-Benzothiazolinon Hidrazon (MBTH) untuk Deteksi Polifenol pada Produk Minuman Kopi” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 7 Agustus 2015

Yang menyatakan,



Imamah Listiya A.

NIM 112210101032

SKRIPSI

**PENGEMBANGAN BIOSENSOR POLIFENOL BERBASIS
POLIFENOL OKSIDASE (PPO) DAN 3-METIL-2-
BENZOTHIOZOLINON HIDRAZON (MBTH)
UNTUK DETEKSI POLIFENOL PADA
PRODUK MINUMAN KOPI**

Oleh

Imamah Listiya Annisa
NIM 112210101032

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D.
Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Drs. Agus Abdul Gani, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengembangan Biosensor Berbasis Polifenol Oksidase (PPO) dan 3-Metil-2-Benzothiozolinon Hidrazon (MBTH) untuk Deteksi Polifenol pada Produk Minuman Kopi” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Jumat, 7 Agustus 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing,

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,



Prof. Drs. Bambang Kuswandi, Msc., Ph.D.
NIP 196902011994031002



Dr. Drs. Agus Abdul Gani, M.Si.
NIP 195708011984031004

Tim Penguji,

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,



Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt.
NIP 197806092005012004



Nia Kristiningrum, S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP 198204062006042001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,




Lesty Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.
NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Pengembangan Biosensor Berbasis Polifenol Oksidase (PPO) dan 3-Metil-2-Benzothiozolinon Hidrazon (MBTH) untuk Deteksi Polifenol pada Produk Minuman Kopi; Imamah Listiya Annisa, 112210101032; 2015; 69 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kopi tidak hanya menjadi minuman favorit tapi juga sebagai komoditas ekspor ekonomi utama di dunia setelah minyak bumi. Indonesia salah satunya, merupakan negara penghasil kopi keempat di dunia setelah Brazil, Kolombia, dan Vietnam. Selain sebagai minuman sehari-hari yang memiliki banyak manfaat, kopi dapat menjadi sumber senyawa fenolik (polifenol). Berdasarkan studi epidemiologi, mengkonsumsi sedikitnya tiga cangkir kopi per hari dapat menurunkan resiko penyakit diabetes tipe, parkinson, dan hipertensi khususnya pada wanita.

Polifenol pada kopi hampir seluruhnya merupakan asam klorogenat dan efek biologis yang ditimbulkan dari meminum kopi bergantung pada metabolisme dan katabolisme asam klorogenat. Meskipun tidak memiliki nilai gizi tinggi, polifenol memiliki peran penting terhadap kesehatan karena aktivitas antioksidan yang dimiliki. Penetapan aktivitas antioksidan dari polifenol dapat dilakukan dengan berbagai metode yang didasarkan pada kemampuan polifenol untuk mengurangi aktivitas radikal bebas. Dua metode yang paling sering digunakan adalah dengan radikal 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH·) dan penentuan fenol total (*Total Phenolic Content*) menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Namun, beberapa metode tersebut membutuhkan preparasi yang rumit dan peralatan yang sangat mahal sehingga diperlukan metode lain yang lebih sederhana, murah, dan memiliki sensitivitas tinggi terhadap polifenol seperti penggunaan biosensor.

Tujuan penelitian ini adalah pengembangan metode biosensor polifenol untuk mendeteksi polifenol pada sampel kopi. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah fabrikasi biosensor polifenol, karekterisasi biosensor polifenol, dan

pembandingan metode biosensor dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Kondisi analisis yang dioptimasi meliputi optimasi konsentrasi reagen MBTH, optimasi volume reagen, dan optimasi perbandingan volume reagen. Tahapan karakterisasi biosensor meliputi penetapan waktu respon, uji linieritas, penentuan sensitivitas, uji selektivitas, penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi, uji presisi, uji akurasi, dan penentuan waktu pakai biosensor.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa biosensor polifenol menunjukkan perubahan warna dari berwarna putih menjadi merah. Kondisi optimum untuk analisis ini antara lain konsentrasi reagen MBTH sebesar 12 mg/mL. Volume reagen (enzim PPO 500 unit/mL dan MBTH) total sebesar 14 μ L dengan perbandingan 1:1. Karakterisasi biosensor polifenol menghasilkan waktu respon pada 13-17 menit, uji linieritas memberikan hasil analisis yang linier dengan koefisien korelasi (r) = 0,9961, nilai V_{x0} = 4,648 %, dan nilai sensitivitas sebesar 0,1119; biosensor polifenol peka dengan batas deteksi = 20,217 μ g dan batas kuantitasi = 67,391 μ g; selektif karena dengan adanya bahan pengganggu (gula dan susu) tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap ketersediaan asam klorogenat pada kopi; presis dengan nilai RSD pada kopi arabika dan robusta berturut-turut adalah sebesar 1,246 % dan 2,663 % dengan konsentrasi asam klorogenat pada kopi arabika dan robusta masing-masing secara berurutan sebesar 144,652 ppm CAE dan 99,103 ppm CAE; akurat dengan nilai rata-rata perolehan kembali untuk kopi arabika dan robusta berturut-turut sebesar 101,406 % dan 101,154 %; dan stabil pada penyimpanan dengan suhu *freezer* (-20) – 0 °C selama 10 hari. Hasil konsentrasi asam klorogenat yang didapat dari metode biosensor terkarakterisasi kemudian dibandingkan dengan metode Spektrofotometri UV-Vis dan menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara konsentrasi asam klorogenat yang diperoleh dari metode biosensor polifenol dan metode Spektrofotometri UV-Vis.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, atas segala limpahan rahmat, kenikmatan, petunjuk dan hidayah sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengembangan Biosensor Berbasis Polifenol Oksidase (PPO) dan 3-Metil-2-Benzothiozolinon Hidrazon (MBTH) untuk Deteksi Polifenol pada Produk Minuman Kopi”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kesempatan kali ini, penulis bermaksud mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang mendukung terselesainya penyusunan skripsi ini, yaitu :

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember sekaligus Dosen Pembimbing Akademik;
2. Bapak Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. dan Bapak Dr. Drs. Agus Abdul Gani, M.Si., selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, perhatiannya dengan penuh kesabaran memberi ilmu, pengarahan, bimbingan dan saran dalam penulisan skripsi ini;
3. Bapak Moch. Amrun Hidayat, S.Si., M.Farm., Apt., yang telah sabar membimbing, memberi masukan, saran, dan motivasi untuk semangat belajar;
4. Ibu Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt. dan Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., M.Farm., Apt., selaku Dosen Penguji yang dengan sabar memberikan masukan untuk penulis;
5. Seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, berbagi pengalaman dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan, staff dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Orang tua tercinta Ibunda Sulistyawati, Ayah Slamet Sagi, dan adik Ulfa Dwi Arizka yang senantiasa memberi doa, kasih sayang, semangat, dan motivasi yang tidak terhingga untuk mengiringi perjalanan hidup penulis;

7. Keluarga besar Alm. Bapak Suhud dan Alm. Bapak Saekan yang selalu memberikan dukungan dan semangat;
8. Teman-teman *Happy Family*, lilicung, bunda el, ci'oo, dan miumiu yang telah mengisi hari-hari penulis dalam suka dan duka selama menimba ilmu di Fakultas Farmasi;
9. Tim skripsi Biosensor Polifenol, Pratama Putra Ramadhan yang selalu memberikan doa, dukungan, dan semangat;
10. Teman seperjuangan Fakultas Farmasi Universitas Jember Angkatan 2011 (ASMEF) yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu;
11. Sahabat-sahabatku CANSEL, Cindy, Adinda, Shela, Eka, Lilian yang selalu menghibur, memberi semangat, dan pelukan; serta duo Muhammad, Zaka dan Yudi yang selalu memberikan doa dan dukungan;
12. Teman-teman geng gebetan, Chancan dan Tiwi; dan kos Daliyanto, mbak Rina dan Ima yang selalu memberikan hiburan, dukungan, dan semangat selama ini;
13. Teman-teman geng KKN 06, Emak, Geabby, Lanang, Kikim, Luki, dan Eko yang selalu merepotkan, memberikan cerita berbeda, dan mengajarkan untuk saling menghargai; dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah. Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 7 Agustus 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.5 Batasan Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kopi	6
2.1.1 Klasifikasi Kopi	6
2.1.2 Morfologi Tanaman Kopi	7
2.1.3 Jenis-jenis Kopi	8
2.2 Kandungan Kimia Kopi	9

2.2.1 Senyawa Polifenol	10
2.2.2 Senyawa Asam Klorogenat	10
2.3 Metode Penetapan Polifenol	11
2.3.1 Metode <i>Total Phenolic Content</i> (TPC)	11
2.3.2 Pengujian dengan DPPH	12
2.3.3 Metode HPLC	13
2.3.4 Metode FRAP	13
2.3.5 Metode ABTS	14
2.4 Biosensor	15
2.4.1 Komponen Penyusun Biosensor	16
2.4.2 Imobilisasi Reagen	16
2.4.3 Enzim	20
2.4.4 Polifenol Oksidase (PPO)	22
2.4.5 Indikator MBTH	22
2.4.6 Reagen <i>Folin-Ciocalteu</i>	23
2.4.7 Karakteristik Biosensor	25
BAB 3. METODE PENELITIAN	29
3.1 Jenis Penelitian	29
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	29
3.3 Rancangan Penelitian	29
3.3.1 Definisi Operasional.....	29
3.3.2 Rancangan Operasional.....	30
3.3.3 Diagram Alur Penelitian	30
3.4 Alat dan Bahan	31
3.4.1 Alat	31
3.4.2 Bahan	31
3.5 Prosedur Penelitian	31
3.5.1 Penyiapan Bahan	31
3.5.2 Fabrikasi Biosensor Polifenol	32

3.5.3 Karakteristik Biosensor	34
3.5.4 Aplikasi Biosensor pada Sampel	39
3.5.5 Perbandingan Metode	39
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	41
4.1 Fabrikasi Biosensor Polifenol	41
4.1.1 Optimasi Konsentrasi MBTH	42
4.1.2 Optimasi Volume Reagen	44
4.1.3 Optimasi Perbandingan Volume Reagen	45
4.2 Karakteristik Biosensor	46
4.2.1 Waktu Respon	46
4.2.2 Linieritas	48
4.2.3 Sensitivitas	50
4.2.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi	50
4.2.5 Selektivitas	51
4.2.6 Presisi	52
4.2.7 Akurasi	55
4.2.8 Waktu Pakai	56
4.3 Aplikasi Sampel pada Biosensor Polifenol	58
4.4 Perbandingan Metode	59
BAB 5. PENUTUP	62
5.1 Kesimpulan	62
5.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	64

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Kriteria Penerimaan Nilai RSD	28
3.1 Contoh perhitungan simpangan baku residual (Sy).....	35
3.2 Contoh perhitungan presisi	37
4.1 Keterangan waktu dan <i>mean RGB</i> biosensor untuk karakteristik waktu respon.....	48
4.2 Data hasil pengukuran Δ <i>mean RGB</i> untuk linieritas	49
4.3 Data nilai interferensi biosensor dengan pengganggu gula	51
4.4 Data nilai interferensi biosensor dengan pengganggu susu	52
4.5 Data hasil pengukuran presisi pada sampel kopi robusta	53
4.6 Data hasil pengukuran presisi pada sampel kopi arabika	54
4.7 Data hasil pengukuran akurasi pada sampel kopi robusta	55
4.8 Data hasil pengukuran akurasi pada sampel kopi arabika.....	55
4.9 Data konsentrasi polifenol (ppm <i>CAE</i>) dalam kopi arabika menggunakan metode biosensor polifenol dan spektrofotometri UV-Vis	60
4.10 Data konsentrasi polifenol (ppm <i>CAE</i>) dalam kopi robusta menggunakan metode biosensor polifenol dan spektrofotometri UV-Vis	60

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman kopi	7
2.2 Struktur kimia asam klorogenat	11
2.3 Prinsip kerja biosensor	15
2.4 Skema komponen penyusun biosensor	16
2.5 Imobilisasi reagen dengan metode adsorpsi	18
2.6 Teknik <i>entrapment</i>	19
2.7 Teknik ikatan kovalen	19
2.8 Teknik imobilisasi dengan <i>cross-linking</i>	20
2.9 Ilustrasi prinsip kerja enzim	21
2.10 Reaksi oksidasi fenol dan <i>o</i> -difenol menjadi <i>o</i> -kuinon	22
2.11 Rumus bangun dari MBTH	23
2.12 Pembentukan kompleks berwarna merah	23
3.1 Diagram alur penelitian	30
3.2 Desain biosensor polifenol	33
4.1 Perubahan warna biosensor polifenol sebelum dan setelah bereaksi dengan analit	42
4.2 Perubahan warna <i>chip</i> biosensor yang terjadi pada optimasi konsentrasi MBTH	42
4.3 Grafik hasil pengukuran $\Delta mean RGB$ optimasi konsentrasi MBTH.....	43
4.4 Optimasi volume reagen	45
4.5 Perubahan warna <i>chip</i> biosensor pada optimasi perbandingan volume reagen MBTH dan enzim PPO	45
4.6 Grafik hasil pengukuran $\Delta mean RGB$ untuk optimasi perbandingan volume reagen MBTH dan enzim PPO	46

4.7	Kurva waktu respon biosensor polifenol	48
4.8	Kurva linieritas biosensor polifenol	49
4.9	Grafik <i>mean RGB</i> selektivitas biosensor polifenol terhadap pengganggu gula dan susu dalam beberapa perbandingan konsentrasi	51
4.10	Kurva kalibrasi karakteristik presisi biosensor polifenol	53
4.11	Grafik penurunan respon biosensor suhu ruang ($\pm 27\text{ }^{\circ}\text{C}$)	57
4.12	Grafik penurunan respon biosensor suhu <i>chiller</i> ($2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$)	57
4.13	Grafik penurunan respon biosensor pada suhu <i>freezer</i> ($-20\text{ - }0\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	57

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Waktu respon biosensor	70
B. Linieritas, batas deteksi, dan batas kuantitasi biosensor	71
C. Selektivitas	74
D. Presisi	76
E. Akurasi	78
F. Waktu pakai biosensor	83
G. Aplikasi sampel	85
H. Metode <i>Total Phenolic Content</i> (TPC) dengan spektrofotometri UV-Vis	86
I. Hasil perbandingan metode	87
J. Kemasan biosensor	93
K. Brosur	94
L. Alat dan bahan	95

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Meminum kopi sudah menjadi kebiasaan bagi sebagian besar orang, tidak terbatas *gender* dan usia. Mulanya hanya berupa warung kopi yang identik sebagai tempat berkumpulnya bapak-bapak, namun menjadi sangat tren dengan banyak dibangunnya kafe yang nyaman sehingga kaum wanita dan anak muda pun menjadi tertarik untuk mengkonsumsi minuman kopi. Kopi tidak hanya menjadi minuman favorit tapi juga sebagai komoditas ekspor ekonomi utama di dunia setelah minyak bumi. Indonesia salah satunya, merupakan negara penghasil kopi keempat di dunia setelah Brazil, Kolombia, dan Vietnam (Panggabean, 2011).

Jenis kopi yang banyak dibudidayakan yakni kopi arabika (*Coffea arabica*) dan robusta (*Coffea robusta*) (Vignoli, *et al.*, 2011) sementara itu, ada juga jenis *Coffea liberica* dan *Coffea congensis* yang merupakan perkembangan dari jenis arabika. Dahulu, kopi liberika pernah dibudidayakan di Indonesia namun karena rendahnya rendemen biji kopi liberika (hanya sekitar 10-12%) dan bobot biji kopi keringnya hanya sekitar 10% dari bobot kopi basah menyebabkan jenis kopi ini tidak dikembangkan di Indonesia. Berbeda dengan kopi liberika, kopi jenis arabika mampu menghasilkan rendemen yang lebih besar (18-20%) namun memiliki ketahanan yang rendah terhadap serangan hama. Sedangkan kopi robusta memiliki adaptasi yang lebih baik dibandingkan dengan kopi jenis arabika dan memberikan rendemen terbanyak yakni sekitar 20-22% (Panggabean, 2011).

Selain sebagai minuman sehari-hari yang memiliki banyak manfaat, kopi dapat menjadi sumber senyawa fenolik (polifenol). Berdasarkan studi epidemiologi, mengkonsumsi sedikitnya tiga cangkir kopi per hari dapat menurunkan resiko penyakit diabetes tipe 2 (van Dieren *et al.*, 2009), parkinson (Sääksjärvi *et al.*, 2008), dan hipertensi khususnya pada wanita (Geleijnse, 2008). Menurut Suri dan Crozier

(2012), polifenol pada kopi hampir seluruhnya merupakan asam klorogenat (100-200 mg/mL). Efek biologis yang ditimbulkan dari meminum kopi bergantung pada metabolisme dan katabolisme asam klorogenat dan dalam 200 mL kopi instan terdapat 29,1% asam klorogenat. Meskipun tidak memiliki nilai gizi tinggi, polifenol memiliki peran penting terhadap kesehatan karena aktivitas antioksidan yang dimiliki (Arslan, 2006). Secara kimia, polifenol merupakan suatu kelompok senyawa alam yang memiliki struktur fenol (Tsao, 2010) dan merupakan metabolit sekunder tanaman yang diklasifikasikan sebagai turunan asam fenolat, flavonoid, dan tanin (Podsdek *et al.*, 2000).

Penetapan aktivitas antioksidan dari polifenol dapat dilakukan dengan berbagai metode yang didasarkan pada kemampuan polifenol untuk mengurangi aktivitas radikal bebas. Dua metode yang paling sering digunakan adalah dengan radikal 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH·) dan penentuan fenol total (*Total Phenolic Content*) menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Metode penetapan polifenol dengan radikal DPPH menggunakan DPPH stabil kemudian diperhatikan absorbansinya dimana dengan penambahan antioksidan, absorbansi DPPH menurun sehingga kapasitas antioksidan polifenol dapat ditentukan. Metode kedua yakni penentuan fenol total (*Total Phenolic Content*) menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Pada metode ini digunakan reagen *Folin-Ciocalteu* yang bertindak sebagai oksidan. Reaksi yang terjadi pada metode ini adalah perubahan intensitas warna reagen yang sebanding dengan penurunan aktivitas oksidan. Selain kedua metode tersebut, penentuan kandungan polifenol dapat menggunakan metode analisis kualitatif dan kuantitatif seperti HPLC dan GC-MS. Namun, beberapa metode tersebut membutuhkan preparasi yang rumit dan peralatan yang sangat mahal. Berdasarkan alasan tersebut, diperlukan metode lain yang lebih sederhana, murah, dan memiliki sensitivitas tinggi terhadap polifenol seperti penggunaan biosensor (Gomes dan Rebelo, 2003; Photinon *et al.*, 2010).

Biosensor merupakan peralatan analisis yang menggunakan material biologis atau biomolekul (misalnya jaringan, mikroorganisme, organella, sel, enzim, antibodi,

DNA dsb.) yang terintegrasi dengan transduser sehingga menghasilkan sinyal–sinyal tertentu (Kuswandi, 2010). Pendeteksian menggunakan biosensor mulai dikembangkan karena biosensor memiliki beberapa kelebihan antara lain: preparasi yang mudah, selektif, sensitif, biaya yang relatif murah, reproduibel, waktu respon yang cukup cepat, mudah dalam penyimpanan, dan waktu pakai yang cukup panjang (Gomes dan Rebelo, 2003).

Enzim merupakan material biologi yang dapat digunakan dalam biosensor. Biosensor berbasis enzim untuk deteksi antioksidan ini menggunakan polifenol oksidase (PPO) untuk mengetahui adanya polifenol. Selain polifenol oksidase (PPO), dapat pula digunakan peroksidase (Nokthai *et al.*, 2010) dan *laccase* (Gomes dan Rebelo, 2003). Dalam penelitian kali ini digunakan polifenol oksidase (PPO) sebagai basis dalam biosensor polifenol karena metode ini sederhana, cepat, dan memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi terhadap polifenol (Xue dan Shen, 2002). PPO merupakan *copper-containing enzym* yang bertanggung jawab terhadap hidrosilasi monofenol menjadi *o*-difenol dan oksidasi *o*-difenol menjadi *o*-dikuinon (Mazzafera dan Robinson, 2000). Kuinon yang terbentuk selanjutnya akan membentuk pigmen berwarna merah jika bereaksi dengan 3-metil-2-benzothiozolinon hidrazon (MBTH) (Kıralp, 2003)

Penelitian yang berjudul “Pengembangan Biosensor Polifenol Berbasis Polifenol Oksidase (PPO) dan 3-Metil-2-Benzothiozolinon Hidrazon (MBTH) untuk Deteksi Polifenol pada Produk Minuman Kopi” ini dilakukan dengan cara sederhana, yakni dengan mengimobilisasi PPO dan reagen MBTH pada material pendukung (kertas *whatman*). MBTH digunakan sebagai indikator perubahan warna yang dapat diamati oleh mata. Intensitas perubahan warna kemudian diukur dengan perangkat lunak *ImageJ* untuk mengetahui nilai ΔRGB sehingga kuantitas kandungan polifenol dapat diketahui. Biosensor dalam bentuk *chip* ini selanjutnya digunakan untuk mendeteksi kandungan polifenol dan diharapkan dapat menjadi alternatif sebagai pengontrol kualitas kopi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka didapatkan beberapa rumusan masalah, antara lain:

- 1.2.1 Bagaimanakah fabrikasi biosensor polifenol berbasis PPO dan MBTH pada kertas saring *whatman*?
- 1.2.2 Bagaimanakah kondisi optimum operasional (konsentrasi reagen, perbandingan volume reagen, dan volume reagen) biosensor berbasis PPO dan MBTH dalam penentuan polifenol?
- 1.2.3 Bagaimanakah karakteristik (selektivitas, waktu respon, linieritas, sensitivitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, presisi, akurasi, dan waktu pakai) biosensor berbasis PPO dan MBTH dalam penentuan polifenol?
- 1.2.4 Apakah biosensor polifenol terkarakterisasi dapat diaplikasikan dalam penentuan polifenol pada produk minuman kopi?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjawab rumusan masalah, antara lain:

- 1.3.1 Menentukan fabrikasi biosensor polifenol berbasis PPO dan MBTH pada kertas saring *whatman*.
- 1.3.2 Menentukan kondisi optimum operasional (konsentrasi reagen, perbandingan volume reagen, dan volume reagen) biosensor polifenol berbasis PPO dan MBTH.
- 1.3.3 Menentukan karakteristik (waktu respon, linieritas, sensitivitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas, presisi, akurasi, dan waktu pakai) biosensor berbasis PPO dan MBTH dalam penentuan polifenol.
- 1.3.4 Menentukan aplikasi biosensor polifenol terkarakterisasi dalam penentuan polifenol pada produk minuman kopi.

1.4 Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat yang dapat diperoleh dari penelitian ini antara lain:

- 1.4.1 Memberikan informasi tentang teknologi biosensor yang dapat digunakan untuk mendeteksi polifenol.
- 1.4.2 Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai kandungan polifenol dalam minuman kopi.
- 1.4.3 Sebagai dasar penelitian di bidang analisis kimia atau bidang-bidang lain yang terkait.

1.5 Batasan Penelitian

Batasan masalah dalam penelitian ini antara lain:

- 1.5.1 Sampel yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah kopi instan arabika dan robusta yang berasal dari PTPN X Jember.
- 1.5.2 Standar yang digunakan untuk biosensor polifenol adalah senyawa asam klorogenat.
- 1.5.3 Pengujian interferensi menggunakan sampel gula “Gulaku” dan susu “Dancow”.
- 1.5.4 Bahan yang digunakan untuk fabrikasi *chip* biosensor adalah kertas saring (*whatman no.40*).

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kopi

Tanaman kopi mulanya tumbuh liar di hutan dataran tinggi Ethiopia, Afrika kemudian menyebar ke India dan Inggris. Tanaman kopi masuk ke Indonesia pada tahun 1700-an oleh seorang berkebangsaan Belanda yang kemudian ditanam pertama kali di daerah Pondok Kopi, Jakarta. Setelah tumbuh dengan baik, tanaman kopi mulai dibudidayakan di Jawa Barat, Sumatera dan Sulawesi (Panggabean, 2011). Menurut Butt & Sultan (2011), studi epidemiologi, meta analisis, dan investigasi terhadap kandungan kimia dan manfaat mengkonsumsi kopi telah banyak dikembangkan. Hal tersebut terjadi karena berkembangnya pengetahuan masyarakat tentang manfaat kopi dan telah mendorong popularitasnya sebagai minuman terlaris kedua di dunia. Proses pembuatan kopi dimulai dari pemungutan biji tanaman *Coffea arabica* maupun *Coffea canephora*, pengeringan, pengovenan, dan penggilingan biji hingga menghasilkan serbuk kopi. Setelah biji kopi menjadi serbuk, untuk membuat minuman kopi dilakukan penyaringan dan dekafeinasi. Proses tersebut menyebabkan perubahan fisika dan kimia pada kopi, misalnya perubahan rasa dan berkurangnya zat antioksidan.

2.1.1 Klasifikasi Kopi

Tanaman kopi ditunjukkan pada Gambar 2.1. Menurut Butt & Sultan (2011), kopi arabika dan robusta dikualifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida

Subkelas : Asteridae
Ordo : Rubiales
Famili : Rubiaceae
Genus : *Coffea*
Species : *Coffea* sp. (*C. arabica* dan *C. canephora*)



Gambar 2.1 Tanaman kopi (Plantamor, 2012)

2.1.2 Morfologi Tanaman Kopi

Kopi merupakan jenis tanaman semak belukar dan memiliki akar tunggang. Secara umum, daun kopi berbentuk seperti telur, bergaris ke samping, bergelombang (talang air), berwarna hijau pekat, kekar, dan meruncing di bagian ujungnya. Daun tumbuh secara berdampingan di ketiak batang, cabang, dan ranting. Sepasang daun terletak di bidang yang sama di cabang dan ranting yang tumbuh mendatar. Bunga kopi terbentuk pada akhir musim hujan dan akan menjadi buah hingga siap petik pada awal musim kemarau. Setiap ketiak daun menghasilkan 2-4 kelompok bunga dan setiap kelompok bunga menghasilkan 4-6 kuntum bunga. Kuntum bunga kopi berukuran kecil yang tersusun dari kelopak bunga, mahkota bunga, benang sari, tangkai putik, dan bakal buah. Kelopak bunga berwarna hijau dan mahkota bunga terdiri atas 3-8 helai daun. Buah kopi mentah berwarna hijau muda dan berubah

menjadi hijau tua, lalu kuning. Buah kopi matang (*ripe*) berwarna merah atau merah tua (Panggabean, 2011).

2.1.3 Jenis-jenis Kopi

Terdapat kurang lebih 70 spesies kopi di seluruh dunia tetapi yang lebih dikenal adalah kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora*) dimana kedua jenis tersebut memiliki rasa, tampilan, dan kandungan kafein yang berbeda. Selain kedua jenis kopi tersebut, ada pula kopi liberika dan hibrida yang sudah jarang dibudidayakan (Cagliani *et al.*, 2013).

a. Kopi Arabika

Kopi arabika merupakan kopi yang paling banyak dikembangkan di Indonesia. Kopi jenis ini ditanam di lereng gunung dengan ketinggian 1.000-2.100 meter di atas permukaan laut. Tanaman kopi arabika menghasilkan rendemen sebanyak 18-20%. Biji kopi arabika berbentuk agak memanjang dengan bidang cembung yang tidak terlalu tinggi. Selain itu, biji kopi arabika lebih berkilau dibanding jenis lainnya. Untuk biji yang sudah dipanggang (*roasting*), celah tengah terlihat putih sedangkan pada biji yang sudah diolah terkadang masih terdapat kulit ari yang menempel di celah atau parit biji kopi. Selain memiliki adaptasi yang rendah, kopi arabika juga memiliki kerentanan terhadap serangan *Hemelia vastatrix* (Panggabean, 2011).

b. Kopi Robusta

Kopi robusta disebut juga kopi *canephora* berasal dari Afrika. Kopi robusta memiliki adaptasi yang lebih baik dibandingkan dengan kopi arabika dimana kopi jenis ini dapat tumbuh di ketinggian yang lebih rendah dibandingkan dengan lokasi perkebunan arabika (Panggabean, 2011). Akibatnya, tumbuhan kopi robusta lebih resisten terhadap penyakit sehingga produksinya lebih mudah dan menghasilkan rasa kopi yang kuat (Cagliani *et al.*, 2013). Rendemen yang dihasilkan oleh kopi robusta relatif lebih tinggi dibandingkan dengan rendemen kopi arabika (20-22%). Biji kopi

robusta berbentuk agak bulat dengan lengkungan biji lebih tebal dibandingkan dengan jenis arabika. Untuk biji yang sudah diolah, tidak terdapat kulit ari di bagian parit biji (Panggabean, 2011).

c. Kopi Liberika

Kopi liberika berasal dari dataran rendah Monrovia di daerah Liberika. Pohon kopi liberika tumbuh subur di daerah yang panas dan memiliki tingkat kelembapan tinggi. Kopi jenis ini memiliki kualitas dan rendemen yang lebih rendah dibandingkan kopi arabika dan robusta namun lebih tahan terhadap serangan *Hemelia vastatrix* (Panggabean, 2011).

d. Kopi Hibrida

Kopi hibrida merupakan turunan pertama hasil perkawinan antara dua spesies atau varietas sehingga mewarisi sifat unggul dari kedua induknya. Namun, keturunan dari golongan hibrida sudah tidak mempunyai sifat yang sama dengan induk hibridanya sehingga kopi jenis ini sudah jarang dibudidayakan (Panggabean, 2011)

2.2 Kandungan Kimia Kopi

Menurut Cagliani (2013), senyawa kimia yang terdapat pada biji kopi antara lain kafein, asam amino, asam klorogenat, sakarida, dan senyawa logam. Selain itu juga terdapat beberapa fraksi lemak misalnya asam lemak, sterol, diterpen, dan tokoferol. Senyawa kimia pada kopi dibedakan atas senyawa volatil dan non volatil. Senyawa volatil adalah senyawa yang mudah menguap, terutama jika terjadi peningkatan suhu sedangkan senyawa non volatil berpengaruh terhadap mutu kopi. Senyawa volatil yang berpengaruh terhadap aroma kopi antara lain golongan aldehid dan keton, sedangkan senyawa non volatil pada biji kopi antara lain kafein, asam klorogenat, dan senyawa-senyawa nutrisi. Golongan asam yang dominan pada biji kopi adalah asam klorogenat yaitu sekitar 8% pada biji kopi.

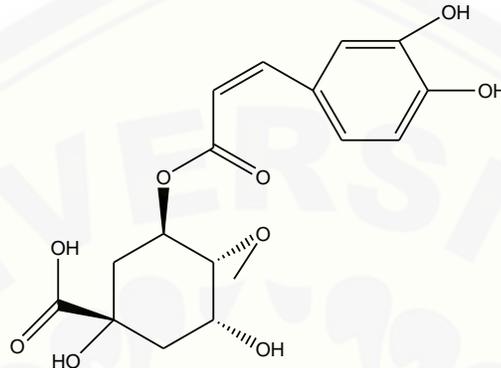
2.2.1 Senyawa Polifenol

Senyawa polifenol merupakan metabolit sekunder tanaman dengan cincin aromatis yang memiliki gugus hidroksil lebih dari satu dan potensial delokalisasi elektron-*pi* dengan cincin individu. Karena hal itu, polifenol juga dikenal sebagai senyawa fenol (Manach *et al.*, 2004; Tsao, 2010). Polifenol dibagi menjadi tiga kelompok besar yakni asam fenolat (asam hidroksibenzoat dan asam hidroksisinamat), flavonoid (antosianin, flavonol, flavono, flavonas, isoflavon dan kalkon), dan tanin (tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi) (Mello *et al.*, 2003). Senyawa polifenol pada kopi memiliki beberapa aktivitas biologis antara lain dapat meningkatkan ketahanan terhadap serangan ultraviolet atau agregasi oleh patogen dengan menangkap radikal bebas, sebagai agen pengkelat logam, dan penghambat oksidasi lipoprotein (Manach *et al.*, 2004). Selain aktivitas sebagai antioksidan, dalam beberapa jurnal juga disebutkan bahwa polifenol memiliki efek positif terhadap penyakit degeneratif dan menurunkan resiko kanker. Salah satu komponen polifenol yang terdapat dalam jumlah banyak di dalam kopi adalah asam klorogenat, yaitu sekitar 90% dari total fenol di dalam kopi (Nardini *et al.*, 2002).

2.2.2 Senyawa Asam Klorogenat

Asam klorogenat merupakan senyawa kimia dengan rumus molekul $C_{16}H_{18}O_9$ dengan berat molekul sebesar 354,31. Senyawa ini berupa serbuk berbentuk kristal jarum dengan titik lebur 208 °C. Kelarutan asam klorogenat antara lain: dapat larut dalam air panas, alkohol, dan aseton; dan sukar larut dalam air pada suhu 25 °C dan etil asetat (Niu *et al.* 2014; Tice, 1998). Senyawa asam klorogenat merupakan golongan ester yang terbentuk antara asam kinin dan trans-asam sinamat yang terdistribusi luas dalam tanaman, terutama dalam biji kopi. Kandungan asam klorogenat dalam biji kopi tidak kurang dari 45% (Jaiswal *et al.*, 2010). Asam klorogenat memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Dalam suatu minuman, asam klorogenat berperan dalam keasaman dan rasa pahit. Efek farmakologi dari asam

klorogenat di antaranya adalah memberikan efek positif terhadap penderita depresi, pecandu alkohol, penyakit degeneratif, penyakit kardiovaskular, dan kanker (Yassin, 2008). Struktur kimia dari senyawa asam klorogenat ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur kimia asam klorogenat (Yassin, 2008).

2.3 Metode Penetapan Polifenol

Deteksi adanya aktivitas antioksidan suatu sampel dapat dilakukan dengan menentukan kadar polifenol. Penentuan kadar polifenol ini dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain dengan metode *Total Phenolic Content* (TPC), pengujian dengan DPPH, metode HPLC, FRAP, dan ABTS.

2.3.1 Metode *Total Phenolic Content* (TPC)

Telah diketahui bahwa senyawa polifenol tersebar luas dalam tanaman. Penentuan polifenol dengan metode *Total Phenolic Content* (TPC) didasarkan pada prinsip peningkatan intensitas warna reagen *Folin-Ciocalteu* yang sebanding dengan peningkatan aktivitas antioksidan. Metode ini telah banyak digunakan karena mudah penggunaannya dan memberikan hasil yang relatif cepat (Blainski *et al.*, 2013). Reagen *Folin-Ciocalteu* digunakan karena senyawa fenolik mampu berikatan dengan reagen ini membentuk larutan berwarna yang dapat diukur absorbansinya. Prinsip dari metode ini adalah terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru akibat adanya senyawa fenolik dalam sampel, intensitas warna biru yang dihasilkan proporsional

dengan konsentrasi analit (Alfian dan Susanti, 2012). Penetapan polifenol dengan reagen *Folin-Ciocalteu* dapat dilakukan jika kandungan senyawa pengganggu (asam askorbat, gula dan asam amino) dalam sampel sudah dihilangkan karena dapat menurunkan aktivitas reagen folin-ciocalteu (George *et al.*, 2006).

Penetapan kadar polifenol dengan metode kolorimetri dilakukan dengan melarutkan 0,3 mL sampel dalam 1,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu* kemudian digojog dan didiamkan selama 3 menit. Campuran ini kemudian ditambahkan 1,2 mL Na_2CO_3 7,5%, digojog dan didiamkan kembali selama 3 menit pada suhu ruang. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi larutan pada 765 nm (Alfian dan Susanti, 2012). Total fenol yang diperoleh ekuivalen (mg/g bobot kering) dengan standar yang digunakan (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008).

2.3.2 Pengujian dengan DPPH

Radikal 1,1-*diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH•) memiliki intensitas warna violet dengan absorbansi maksimum pada 517 nm. Warna dari DPPH dapat hilang akibat pengikatan elektron bebas oleh antioksidan. Penambahan antioksidan menyebabkan penurunan absorbansi yang proporsional dengan konsentrasi dan aktivitas antioksidan senyawa (Wootton-Beard *et al.*, 2011). DPPH digunakan untuk menguji kemampuan senyawa fenol dalam mentransfer atom H tidak stabil menjadi radikal dimana total atom yang didonor dievaluasi dalam indeks *Efficacy Concentration 50%* (EC_{50}) dan lamanya waktu untuk mencapai EC_{50} disebut *Time Efficacy Concentration 50%* (TEC_{50}). Nilai ini selanjutnya dianggap sebagai laju reaksi radikal bebas (Villaño *et al.*, 2007).

Pengujian dilakukan dengan melarutkan radikal DPPH dalam metanol sehingga didapat konsentrasi 25 mg/L. Proses pelarutan ini dilakukan tiap hari dan harus dilindungi dari cahaya. Dilakukan kontrol absorbansi untuk mengetahui stabilitas radikal selama analisis. Kemudian dibuat lima konsentrasi DPPH• yang berbeda yakni antara 63 sampai 13 μM . 0,1 mL sampel dilarutkan dalam 15% etanol

dalam air yang ditambahkan pada 3,9 mL larutan metanolik DPPH•. Absorbansi diukur pada 515 nm dan dilakukan pada interval waktu yang berbeda sampai reaksi mencapai kesetimbangan (Villaño *et al.*, 2007).

2.3.3 Metode HPLC

Seperti yang diketahui, metode pemisahan substrat dari sampel yang paling baik adalah dengan kromatografi. Terdapat berbagai macam metode kromatografi, salah satunya adalah dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Metode penetapan kadar dengan HPLC memiliki kelebihan antara lain dapat menganalisis sampel dengan reagen yang sedikit, metodenya sederhana dan analisis yang sensitif. Pada metode spektroskopi hanya dapat dilakukan identifikasi total fenol tapi dengan HPLC dapat dilakukan pemisahan masing-masing turunan fenol sehingga metode HPLC lebih unggul dari pada spektroskopi dalam hal identifikasi masing-masing turunan fenol.

Penetapan kadar polifenol dapat pula dilakukan dengan metode ini dimana akan dilakukan pemisahan pada sampel sehingga didapat sepuluh macam turunan fenol dalam sekali *running*. Pada analisis kuantitatif polifenol dengan *reverse phase*-HPLC, larutan sampel dilarutkan dalam metanol dan dicampur dengan asetonitril pro HPLC. Kemudian masing-masing standar dilarutkan dalam 50 mL asetonitril pro HPLC. Kondisi analisis yang digunakan antara lain suhu dibuat 27° C, laju alir 1mL/menit dengan pelarut A adalah air dan pelarut B adalah 0,02% *trifluoroacetic acid* (TFA) dalam asetonitril pada λ 280 nm (Kumar *et al.*, 2008). Penetapan polifenol dengan HPLC dapat digabung dengan spektroskopi massa ataupun *Electrospray Ionization–Mass Spectrometry* (EI-MS) (Li *et al.*, 2003).

2.3.4 Metode FRAP

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) biasa digunakan untuk mengukur total penurunan aktivitas antioksidan yang didasarkan pada reduksi

kompleks *ferric-tripyridyltriazine* (Fe^{III} -TPTZ) menjadi *ferro-tripyridyltriazine* (Fe^{II} -TPTZ) yang berwarna biru jika terdapat antioksidan (Benzie dan Straint, 1996). Kompleks berwarna tersebut terbentuk pada pH rendah. Metode ini sederhana dan mudah distandarisasi. Metode FRAP mengukur penurunan aktivitas ketika terjadi peningkatan absorbansi sampel karena pelepasan ion ferro. Uji ini mungkin tidak terjadi secara penuh meskipun setelah beberapa jam setelah reaksi dimulai karena titik akhir reaksi tidak dapat ditentukan (Guo *et al.*, 2003; Biglari *et al.*, 2008). Sehingga, penetapan aktivitas antioksidan polifenol tidak dapat ditentukan dengan cepat.

Pada metode ini digunakan reagen FRAP yang mengandung 10 mM larutan 2,4,6-*tri(2-pyridyl)-s-triazine* (TPTZ) dalam 40 mM HCl yang ditambah dengan 2,5 mL 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan 25 mL 0,3 M buffer asetat pH 3,6. Pada metode ini larutan 900 μL reagen FRAP dibuat pada suhu 37 °C dan dicampur dengan 120 μL sampel. Kemudian dilakukan analisis dengan spektrofotometri pada λ_{maks} 595 nm (Marfil *et al.*, 2011). Metode uji dengan FRAP memberikan hasil dengan cepat, reproduisibel dengan antioksidan dalam sampel cair maupun berupa plasma. Metode FRAP tergantung pada kandungan polifenol sampel yang digunakan. Jika hanya sedikit kandungan polifenol dalam sampel maka sensitivitas metode ini sangat rendah (Maksimović *et al.*, 2005).

2.3.5 Metode ABTS

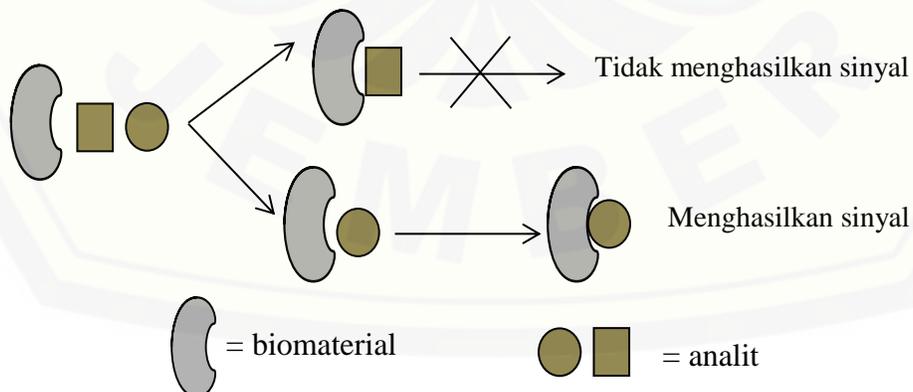
Pengujian dengan 2,2'-*azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid)* atau ABTS didasarkan pada aktivasi metmyoglobin dengan hidrogen peroksida (H_2O_2) untuk menghasilkan kation radikal ABTS yang bereaksi dengan antioksidan. Penambahan antioksidan akan menurunkan aktivitas ABTS sampai batas waktu tertentu tergantung konsentrasi antioksidan dan lama reaksi. Dengan demikian, tingkat dekolorisasi yang dianggap sebagai persen penghambatan radikal ABTS

ditentukan sebagai fungsi dari konsentrasi dan waktu terhadap reaktivitas Trolox sebagai standar (Re *et al.*, 1999).

Pada metode ini, mula-mula dilakukan pembuatan larutan kation radikal $ABTS^{\cdot+}$ yang telah diinkubasi pada $23^{\circ}C$ selama 16 jam. Larutan ini kemudian diencerkan dengan etanol 80% untuk mendapatkan absorbansi sebesar $0,70 \pm 0,005$ pada 734 nm. Sebanyak 3,9 mL larutan $ABTS^{\cdot+}$ ditambahkan pada 0,1 mL sampel uji dan kemudian dicampur sampai merata pada $23^{\circ}C$ selama 6 menit dan diukur absorbansinya pada 734 nm. Kurva standar didapatkan dari hasil perbandingan dengan standar *6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid* (Trolox) pada beberapa konsentrasi berbeda (0-15 μM) dalam etanol 80%. Aktivitas antioksidan dari polifenol ekuivalen dengan standar Trolox (Biglari *et al.*, 2008).

2.4 Biosensor

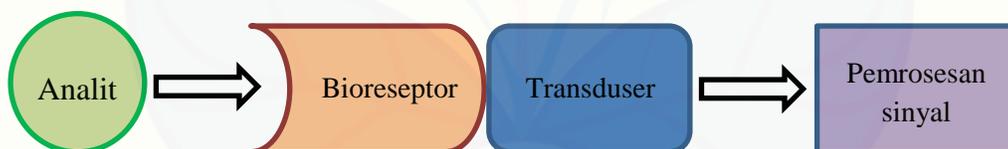
Biosensor merupakan suatu piranti sensor yang menggunakan materi biologi atau biomolekul yang terintegrasi dengan transduser tertentu dan menghasilkan sinyal elektronik yang proporsional dengan jumlah analit (Kuswandi, 2010). Penggunaan biosensor memberikan hasil uji yang lebih cepat, sensitif terhadap substans, dan proses fabrikasi yang sederhana. Biosensor bekerja secara spesifik dan selektif, yakni hanya dapat bereaksi dengan target dan analit tertentu untuk menghasilkan sinyal baik secara kualitatif maupun kuantitatif seperti yang dapat diuraikan seperti Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Prinsip kerja biosensor (Kuswandi, 2010)

2.4.1 Komponen Penyusun Biosensor

Menurut Kuswandi (2010), komponen dasar biosensor terdiri atas komponen biodeteksi, transduser dan pemrosesan sinyal. Interaksi yang terjadi antara analit dengan komponen biologi menghasilkan perubahan sifat fisika yang dapat terdeteksi dan terukur oleh transduser. Proses ini dapat diilustrasikan seperti Gambar 2.4. Berdasarkan prinsip kerjanya, biosensor dibagi menjadi katalitik biosensor dan afinitas biosensor. Katalitik biosensor merupakan biosensor yang menggunakan biokatalitik seperti enzim, mikroorganisme, organela dan jaringan. Sedangkan afinitas biosensor merupakan biosensor yang menggunakan molekul reseptor untuk berikatan dengan analit seperti antibodi, DNA, sel, hormon reseptor, dan biomimetik. Komponen transduksi biosensor dapat berupa transduksi elektrokimia (potensiometrik, voltametrik, konduktometrik, dan FET sensor), transduksi optik, pizo-elektrik, dan termal. Komponen pemrosesan sinyal digunakan untuk mengkonversi perubahan parameter fisika kimia yang terjadi pada permukaan sensor karena adanya interaksi antara analit dengan biomolekul atau bioreseptor menjadi sinyal yang dapat diukur (Kuswandi, 2010).



Gambar 2.4 Skema komponen penyusun biosensor (Kuswandi, 2010).

2.4.2 Imobilisasi Reagen

Imobilisasi reagen merupakan suatu peristiwa pengikatan reagen (secara fisika dan kimia) pada material pendukung secara merata yang memungkinkan untuk terjadinya pertukaran dengan larutan sampel dimana terdapat analit untuk dideteksi. Secara garis besar imobilisasi reagen dapat digolongkan menjadi dua jenis metode yaitu metode fisika dan metode kimia. Metode imobilisasi secara fisika meliputi proses penjerapan (adsorpsi), pemerangkapan (*entrapment*), dan pengkapsulan

(enkapsulasi). Sedangkan secara kimia meliputi pembentukan ikatan kovalen dan *cross-linking* (Kuswandi, 2010).

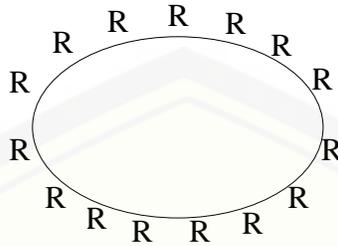
a. Metode immobilisasi secara fisika

Metode immobilisasi reagen secara fisika dilakukan dengan bantuan media padat ataupun polimer biasanya berupa gel untuk memerangkap reagen agar tetap berada dalam media padat sehingga substrat dapat bereaksi dengan reagen sampai reaksi selesai. Metode ini dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain adsorpsi, enkapsulasi, dan *entrapment*.

1) Adsorpsi

Adsorpsi merupakan teknik immobilisasi yang paling sederhana dimana terjadi ikatan adhesi antara reagen dengan material pendukung. Namun ikatan yang terjadi biasanya bersifat lemah karena ikatan yang terbentuk selama proses adsorpsi tidak mudah untuk ditentukan. Selain itu metode ini juga rentan terhadap perubahan pH dan temperatur. Ikatan yang biasa terjadi dalam immobilisasi secara adsorpsi adalah ikatan “*Van der Waals*” dan ikatan hidrogen. Metode immobilisasi secara adsorpsi biasanya digunakan untuk proses dimana biomolekul diserap oleh material pendukung (Kuswandi, 2010). Keuntungan metode ini antara lain biaya murah, tidak diperlukan modifikasi senyawa biomolekul, matriks dapat diregenerasi dan memiliki aktivitas retensi maksimal (Kuswandi & Ahmad, 2014).

Material pendukung (adsorben) yang biasa digunakan dalam immobilisasi reagen antara lain polimer berpori, material karbon dan material anorganik. Polimer berpori biasanya banyak disukai dalam immobilisasi secara adsorpsi karena luas permukaan yang lebar dan kapasitas ikat yang tinggi. Material karbon juga memiliki luas permukaan yang tinggi akan tetapi material ini memiliki kelemahan yaitu warnanya hitam sehingga menyebabkan perubahan warna pada indikator tidak dapat diamati dengan mudah menggunakan transduser optik. Teknik immobilisasi adsorpsi ditunjukkan pada Gambar 2.5.



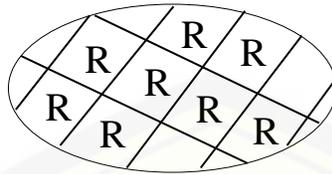
Gambar 2.5 Imobilisasi reagen (R) dengan metode adsorpsi (Kuswandi, 2010)

2) Enkapsulasi

Enkapsulasi atau sering pula disebut mikroenkapsulasi biasanya menggunakan sebuah membran semipermeabel untuk memerangkap biomolekul pada permukaan sensor. Pada teknik ini, biomaterial diletakkan di bawah membran yang kemudian akan terjadi kontak langsung antara biomaterial dan transduser (Eggins, 2008). Material membran yang sering digunakan misalnya polivinilklorida, selulosa asetat, polikarbonat, nafion, dan polianilin (PANI). Teknik imobilisasi dengan enkapsulasi banyak digunakan dalam pengembangan biosensor karena cukup stabil terhadap perubahan pH, temperatur, kekuatan ion, dan komposisi kimia (Kuswandi, 2010). Selain itu, metode ini hanya memerlukan perlakuan sederhana, biaya murah, dan tidak membutuhkan modifikasi kimia (Kuswandi dan Ahmad, 2014).

3) *Entrapment*

Menurut Kuswandi & Ahmad (2014), metode *entrapment* dilakukan dengan melarutkan gel polimer dalam larutan yang mengandung biomaterial kemudian mengalami polimerisasi untuk membentuk membran baik berupa lapisan tipis film maupun gel, sehingga reagen akan terperangkap dalam matriks. Polimer yang sering digunakan dalam metode ini adalah poliakrilamida. Namun, metode ini dapat menimbulkan masalah yakni terbentuknya barrier luas yang dapat menghambat difusi substrat sehingga memperlambat reaksi dan menurunkan waktu respon sensor. Imobilisasi reagen dengan teknik *entrapment* ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Teknik *entrapment* (Eggins, 1996)

b. Metode immobilisasi secara kimia

Berbeda dengan metode immobilisasi secara fisika, pada metode immobilisasi reagen secara kimia didasarkan pada ikatan gugus fungsional. Metode ini dapat dilakukan dengan dua cara yakni dengan ikatan kovalen dan *cross-linking*.

1) Ikatan kovalen

Teknik immobilisasi secara kimia dengan metode ikatan kovalen melibatkan rancangan ikatan gugus fungsional dalam biomaterial untuk mendukung matriks seperti pada Gambar 2.7. Gugus nukleofilik dalam asam amino dari biomaterial tidak mempengaruhi reaksi katalisis enzim. Gugus nukleofilik kemudian dipasangkan dengan gugus amin pada biomaterial untuk pembentukan ikatan amida dengan menggunakan enzim. Reaksi harus berjalan di bawah beberapa kondisi tertentu antara lain suhu rendah, kekuatan ionik rendah dan pH netral (Eggins, 1996).

Kelebihan metode ini terdapat pada aktivitas biomaterial pada membran yang relatif konstan sehingga tidak terjadi pelepasan biomaterial pada matriksnya. Hal ini disebabkan adanya ikatan kovalen yang kuat dan stabil, sehingga metode ini tidak terpengaruh pH, temperatur, serta variasi pelarut. Namun, immobilisasi secara kimia biasanya memiliki efek detrimental biomolekul (Kuswandi, 2010).



Gambar 2.7 Teknik ikatan kovalen (Arslan, 2006)

2) *Cross-linking*

Dalam metode ini, biomaterial terikat secara kimia pada fase padat atau material pendukung lain, misalnya gel. Reagen yang digunakan misalnya glutaraldehid yang merupakan reagen dengan fungsi ganda (Eggins, 2008). Metode *cross-linking* melibatkan penggabungan reseptor yang satu dengan lainnya sehingga menghasilkan struktur tiga dimensi yang kompleks seperti pada Gambar 2.8. Metode ini dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu cara fisika dan cara kimia. Cara fisika dilakukan dengan teknik flokulasi sedangkan cara kimia dilakukan dengan melibatkan kombinasi ikatan kovalen yang terjadi antara biomolekul dengan bantuan multifungsional reagen. Kelebihan metode ini adalah stabil dan dapat dikombinasikan dengan metode lain. Sedangkan kerugiannya adalah molekul aktif yang digunakan dapat rusak dan adanya batas difusi (Eggins, 1996).

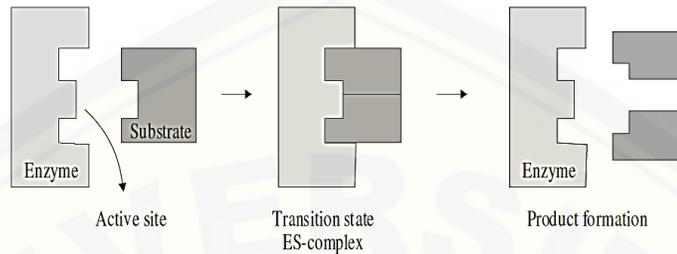


Gambar 2.8 Teknik immobilisasi dengan *cross-linking* (Arslan, 2006)

2.4.3 Enzim

Enzim merupakan protein yang bertindak sebagai katalis pada suatu reaksi. Prinsip kerja enzim didasarkan pada peristiwa kunci dan gembok seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.9. Sebagian besar enzim memerlukan kofaktor (molekul non protein) untuk menjadikannya aktif. Tanpa adanya kofaktor, aktivitas katalitik enzim dapat menurun. Kofaktor dapat berupa zat anorganik (contohnya ion logam), zat organik (contohnya adalah flavin dan heme), gugus prostetik yang mengikat dengan kuat, ataupun koenzim yang akan melepaskan diri dari bagian aktif enzim pada saat reaksi. Apoenzim atau apoprotein merupakan enzim yang belum aktif sehingga memerlukan kofaktor untuk mengaktifkan diri. Sedangkan enzim yang telah berikatan dengan kofaktornya merupakan bentuk enzim aktif dan disebut holoenzim (Arslan, 2006). Enzim umumnya sangat selektif dan sensitif jika dibandingkan dengan bahan kimia. Reaksi menggunakan enzim berlangsung lebih cepat

dibandingkan dengan menggunakan reseptor biologi lainnya (Marazuela dan Bondi, 2002).



Gambar 2.9 Ilustrasi prinsip kerja enzim

Penggunaan enzim sebagai komponen biokatalis umumnya digunakan karena enzim memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan komponen biologi lain, di antaranya adalah:

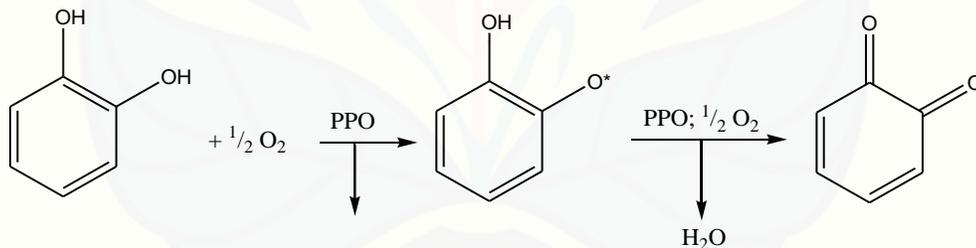
- Enzim dapat langsung mengikat substrat yang ingin dijadikan sampel.
- Enzim memiliki selektivitas yang tinggi.
- Aktivitas katalitik enzim dapat meningkatkan sensitivitas sensor.
- Reaksi umumnya berlangsung cepat.
- Enzim merupakan zat yang paling umum digunakan sebagai molekul bioaktif dalam biosensor.

Namun penggunaan enzim sebagai komponen biokatalis juga memiliki beberapa kelemahan yang di antaranya meliputi :

- Enzim biasanya sangat mahal, hal ini terkait dengan proses pemisahan enzim yang sulit dan lama.
- Sering terjadi kerusakan (kehilangan aktivitas katalitik) pada saat diimobilisasi pada transduser.
- Sering terjadi deaktivasi sisi aktif molekul dalam waktu yang relatif singkat.

2.4.4 Polifenol Oksidase (PPO)

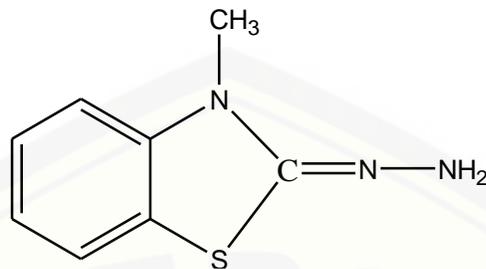
Polifenol oksidase juga dikenal sebagai *tyrosinase*, *polyphenolase*, *phenolase*, *catechol oxidase*, *cresolase* atau *catecholase*. PPO terdapat di sebagian besar jaringan tanaman dan menyebabkan warna kecokelatan pada buah dan sayur. Warna kecokelatan ini timbul karena adanya reaksi enzimatik sebagai hasil dari oksidasi senyawa fenolik tanaman oleh PPO menjadi bentuk kuinon dan reaksi polimerisasi menghasilkan pigmen melanin yang berwarna kecokelatan. Enzim ini secara luas terdistribusi pada hewan, tumbuhan, fungi, dan bakteri. Pada hewan PPO ditemukan dalam produk *seafood* (Crustacean) seperti dalam udang. PPO banyak ditemukan dalam berbagai jenis buah misalnya apel, pisang, alpukat, ketimun, mangga, *peach*, *apricot*, nanas, jamur, dan beberapa jenis sayuran (Yoruk & Marshall, 2003). PPO memiliki dua atom tembaga (Cu) pada inti molekul. PPO mengkatalisis reaksi oksidasi fenol dan *o*-difenol menjadi *o*-kuinon dengan oksigen sebagai oksidan utama yang ditunjukkan pada Gambar 2.10 (Yoruk & Marshall, 2003).



Gambar 2.10 Reaksi oksidasi fenol dan *o*-difenol menjadi *o*-kuinon (Yoruk & Marshall, 2003)

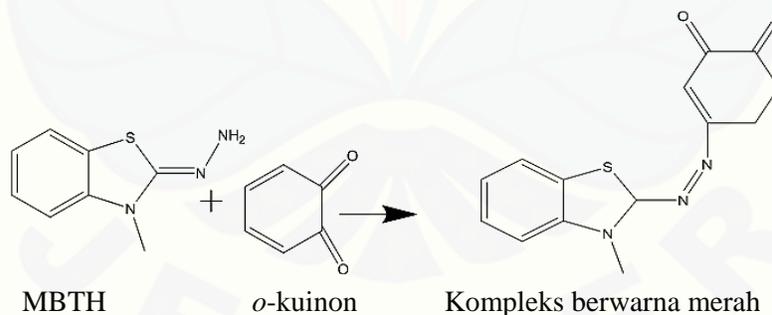
2.4.5 Indikator MBTH

MBTH memiliki rumus molekul (RM) $C_8H_9N_3S$ dan berat molekul (BM) sebesar 215,70 g/mol. MBTH berupa kristal atau serbuk kristal atau serbuk yang berwarna putih hingga putih kekuningan dan dapat larut dalam air dengan konsentrasi 50 mg/mL. Larutan MBTH berwarna kekuningan hingga tidak berwarna (Sigma, 2013). Rumus bangun MBTH ditunjukkan pada Gambar 2.11.



Gambar 2.11 Rumus bangun dari MBTH (Kiralp *et al.*, 2003)

Reaksi yang terjadi pada senyawa fenol ini dikatalisis oleh PPO sehingga menghasilkan suatu kuinon yang bersifat sangat reaktif. Kuinon yang tidak stabil dapat membentuk pigmen melanin melalui reaksi autopolimerisasi non-enzimatik yang mengakibatkan pencoklatan pada makanan (Yoruk & Marshall, 2002). Reaksi autopolimerisasi non-enzimatik ini tidak terjadi karena kuinon akan bereaksi dengan MBTH untuk menghasilkan warna merah (Kiralp *et al.*, 2003) atau marun (Hamzah *et al.*, 2011; Oktem *et al.*, 2012). Berdasarkan peristiwa enzimatik tersebut maka MBTH dapat digunakan sebagai indikator warna dalam mengukur kandungan polifenol. Pembentukan kompleks berwarna merah hingga marun ditunjukkan dalam reaksi pada Gambar 2.12.



Gambar 2.12 Pembentukan kompleks berwarna merah (Kiralp *et al.*, 2003)

2.4.6 Reagen *Folin-Ciocalteu*

Folin-ciocalteu merupakan reagen yang digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan suatu senyawa. Reagen *Folin-Ciocalteu* merupakan modifikasi

dari reagen folin-denis dimana dilakukan penambahan senyawa litium sulfat dan bromida pada reagen fosfotungstat-fosfomolibdat di akhir pendidihan yang diikuti dengan proses pendinginan dan pelarutan. Penambahan litium mencegah pembentukan endapan yang dapat mempengaruhi kuantifikasi intensitas warna. Pereaksi ini mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (fosfotungstat-fosfomolibdat) yang terdapat dalam pereaksi *Folin-Ciocalteu* menjadi suatu kompleks molibdenum-tungsten. Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu* hanya dalam suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat. Hasilnya, reagen *Folin-Ciocalteu* digunakan untuk menentukan kandungan tirosin dan triptofan dalam protein terhidrolisis serta kandungan senyawa fenol, terutama polifenol dengan menentukan jumlah cincin aromatik senyawa dalam sampel (Vermerris & Nicholson, 2007; Radulescu *et al.* 2011; Alfian & Susanti, 2012).

Metode analisis dengan reagen folin-ciocalteu telah digunakan selama bertahun-tahun untuk menentukan kandungan senyawa fenol dan nonfenol dalam media basa dengan mereduksi reagen asam fosfomolibdat/fosfotungstat menjadi kompleks berwarna biru yang dapat dideteksi secara spektrofotometri. Sehingga, penurunan kemampuan folin-ciocalteu sebanding dengan aktivitas antioksidan suatu senyawa. Analisis dengan metode ini hanya membutuhkan sedikit reagen dan sampel serta limbah yang ditimbulkan sangat sedikit sehingga ramah terhadap lingkungan. Namun, metode ini tidak cocok digunakan untuk menentukan total fenol dalam sampel dengan kandungan fenol rendah kecuali dilakukan penghilangan senyawa pengganggu misalnya asam askorbat, fruktosa dan sulfit (Magalhães *et al.*, 2010). Reagen folin-ciocalteu bereaksi dengan vitamin, thiol, dihidrooksiaseton, garam anorganik dan senyawa yang mengandung nitrogen. Pembentukan kompleks dengan Cu meningkatkan reaktivitas reagen folin-ciocalteu (Biglari *et al.*, 2008).

2.4.7 Karakteristik Biosensor

Karakteristik biosensor terdiri dari beberapa kriteria yang dapat menilai kelayakan biosensor. Karakteristik tersebut antara lain selektivitas, sensitivitas, presisi, akurasi, linieritas, batas deteksi dan batas kuantitasi, waktu respon, dan waktu pakai.

a. Waktu Respon

Waktu respon dari biosensor dapat dinyatakan sebagai waktu antara pertama kali sensor direaksikan dengan analit sampai ketika respon sensor menghasilkan sinyal yang relatif stabil (Kuswandi, 2010).

b. Linieritas

Menurut Harmita (2004), linearitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk dapat memberikan respon yang baik dan proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linieritas suatu metode dapat ditentukan dengan membuat satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50-150% kadar analit dalam sampel. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko. Penggunaan koefisien korelasi (r) saja untuk menunjukkan linieritas sangat tidak dianjurkan karena nilai (r) hanya menunjukkan hubungan antara dua parameter acak dan tidak menunjukkan hubungan pada kurva kalibrasi. Sehingga untuk mengevaluasi linieritas kurva kalibrasi, perlu digunakan lebih dari satu parameter.

Parameter yang digunakan untuk menentukan linieritas antara lain nilai standar deviasi (V_{xo}), uji Mandel, nilai X_p , plot antara respon dan konsentrasi, residual plot, dan variansi analisis (ANOVA). Konsentrasi terendah yang digunakan untuk kurva kalibrasi tidak boleh kurang dari nilai X_p . Nilai koefisien korelasi (r) yang baik adalah yang mendekati 1 atau tidak kurang dari 0.999. jika nilai (r) kurang dari 0.999 maka perlu digunakan parameter lain misalnya nilai V_{xo} , X_p , uji ANOVA, dan sebagainya (Yuwono & Indrayanto, 2005).

c. Sensitivitas

Sensitivitas suatu sensor merupakan tingkat kemampuan suatu sensor untuk membedakan konsentrasi analit yang sangat kecil yang ditunjukkan dengan

perubahan sinyal pengukuran per unit konsentrasi analit. Nilai sensitivitas suatu sensor ditunjukkan dari nilai kemiringan (*slope*) grafik yang diperoleh dari kurva kalibrasi. Semakin besar nilai *slope* maka metode tersebut memiliki sensitivitas yang semakin baik (Kuswandi, 2010).

d. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi adalah konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi di bawah kondisi analisis yang digunakan dan masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Sedangkan batas kuantitasi merupakan konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria akurasi dan presisi. Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko. Sedangkan pada analisis yang tidak menggunakan instrumen batas deteksi dapat ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat (Harmita, 2004).

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x) (Harmita, 2004). Selain dengan cara tersebut, perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dilakukan dengan memperhitungkan data regresi linear dimana akan didapatkan konsentrasi terendah analit yang kemudian digunakan untuk menghitung nilai X_p . Nilai batas deteksi dapat ditunjukkan dari $\frac{1}{4}$ nilai X_p . Sedangkan untuk batas kuantitasi didapatkan dari nilai RSD konsentrasi terendah analit, yakni $\leq 2\%$. Untuk aplikasi klinis, batas kuantitasi harus kurang dari 10% dari konsentrasi efektivitas minimal (Yuwono & Indrayanto, 2005)

e. Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan suatu metode untuk hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin

ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cecair, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan (Harmita, 2004). Suatu metode dikatakan tidak selektif jika nilai % interferensi lebih dari 5 % (Yuwono & Indrayanto, 2005).

f. Presisi

Presisi merupakan suatu nilai yang menunjukkan bahwa dengan adanya pengulangan beberapa kali pada pengukuran analit yang sama akan menghasilkan nilai dengan perbedaan yang tidak bermakna. Presisi dibagi menjadi tiga kategori yakni pengulangan (*repeatability*), ketertiruan (*reproducibility*), dan *intermediate precision*. Analisis pada *repeatability* dilakukan dalam satu hari oleh satu analis menggunakan satu peralatan dalam satu laboratorium dan hasil didapatkan pada hari yang sama. Pengujian ini dilakukan dengan membuat tiga tingkat konsentrasi (misalnya 80%, 100%, dan 120% dari konsentrasi target) yang kemudian dilakukan sekurang-kurangnya enam kali analisis (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

Suatu metode yang baik akan memberikan nilai *Relative Standard Deviation (RSD)* atau koefisien variasinya (KV) untuk *repeatability* adalah $\leq 2\%$ dengan jumlah $n \geq 6$. Sedangkan untuk *intermediate precision*, pengujian dilakukan dalam satu laboratorium menggunakan peralatan dan reagen yang berbeda, dan analisis dilakukan selama beberapa hari atau minggu. Untuk menunjukkan presisi intermediet, dibuat tiga konsentrasi sampel dalam waktu yang berbeda dan dilakukan sekurang-kurangnya enam kali analisis sehingga totalnya adalah sebanyak 54 sampel. Nilai *Relative Standard Deviation (RSD)* atau koefisien variasi (KV) untuk presisi intermediet adalah $\leq 3\%$ dengan jumlah $n \geq 6$ (Yuwono & Indrayanto, 2005; Harmita, 2004). Berdasarkan konsentrasi analit yang diperiksa, kriteria penerimaan nilai *RSD* ditunjukkan pada Tabel 2.1.

g. Akurasi

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan ketepatan analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Sebagai parameter untuk akurasi adalah % perolehan kembali (*%recovery*) (Yuwono & Indrayanto, 2005). Menurut Harmita (2004), akurasi dapat ditentukan dengan dua metode yaitu metode simulasi dan metode adisi. Berdasarkan konsentrasi analit yang diperiksa, kriteria penerimaan nilai % perolehan kembali ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kriteria penerimaan nilai RSD

Konsentrasi Analit (%)	Unit	Rata-rata <i>recovery</i> (%)	Presisi (<i>RSD</i> , %)
100	100%	98-102	1,3
10	1%	98-102	2,8
1	10%	97-103	2,7
0,1	0,1%	95-105	3,7
0,01	100 ppm	90-107	5,3
0,001	10 ppm	80-110	7,3
0,0001	1 ppm	80-110	11
0,00001	100 ppb	80-110	15
0,000001	10 ppb	60-115	21
0,0000001	1 ppb	40-120	30

Sumber: Yuwono & Indrayanto (2005)

h. Waktu Pakai

Waktu pakai sensor dapat dinyatakan sebagai suatu waktu dimana sensor masih memberikan reaksi yang sama dan stabil terhadap suatu analit. Penurunan respon sensor terhadap analit yang dihasilkan tidak boleh lebih dari 15% dari respon awal (Kuswandi, 2010).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian *experimental laboratories* yang bertujuan untuk mengembangkan biosensor polifenol menggunakan PPO dan MBTH yang diimmobilisasi pada kertas saring serta didesain menjadi biosensor polifenol berupa *chip* kertas.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Oktober 2014 sampai selesai dan bertempat di laboratorium *Chemo and Biosensor Group*, Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Definisi Operasional

- a. Biosensor polifenol berupa *chip* kertas yang telah diimmobilisasi dengan enzim PPO dan MBTH.
- b. Kadar polifenol diukur berdasarkan perubahan intensitas warna putih kekuningan pada permukaan biosensor polifenol menjadi merah.
- c. *RGB (Red, Green and Blue)* adalah intensitas warna merah, hijau dan biru akibat perubahan warna yang terjadi pada saat larutan sampel maupun standar diteteskan pada biosensor polifenol.
- d. *Mean RGB* merupakan rata-rata nilai *red, green and blue* pada masing-masing pembacaan warna dengan program *ImageJ for Windows*.
- e. Kadar polifenol yang diukur setara dengan ppm ekuivalen asam klorogenat (*CAE* atau *Chlorogenic Acid Equivalent*).

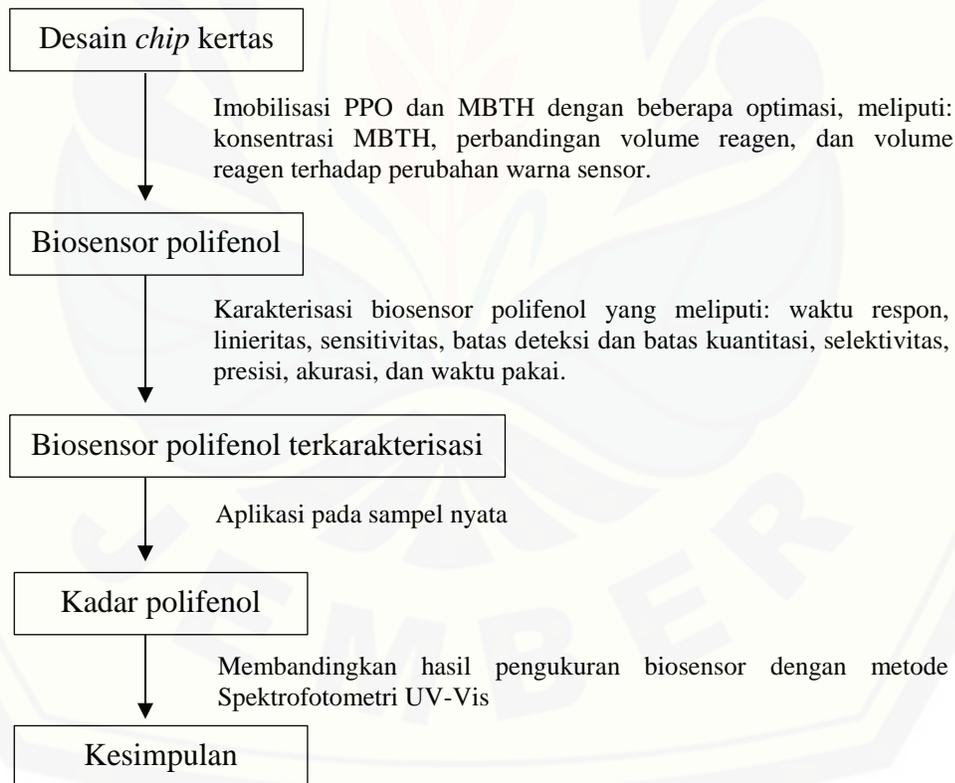
3.3.2 Rancangan Operasional

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Fabrikasi bisensor polifenol yang berupa *chip* kertas.
- b. Penentuan kondisi optimum biosensor polifenol meliputi konsentrasi indikator MBTH, perbandingan volume reagen, dan volume reagen terhadap perubahan warna sensor.
- c. Karakterisasi biosensor polifenol (waktu respon, linieritas, sensitivitas, batas deteksi dan batas kuantitasi, selektivitas, presisi, akurasi, dan waktu pakai).
- d. Aplikasi biosensor polifenol pada sampel nyata.

3.3.3 Diagram Alur Penelitian

Diagram alur penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Diagram alur penelitian

3.4 Alat dan Bahan

Beberapa peralatan dan bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: seperangkat alat gelas, vial, botol semprot, gunting, neraca analitik, mikropipet, *yellow tip*, kertas saring (*whatman* no.40, diameter 11 cm), *stopwatch*, *scanner* (Canon LiDE 110), dan spektrofotometer UV-Vis.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: enzim PPO (Sigma-aldrich), reagen MBTH (Fluka), asam klorogenat 99% p.a, akuades, metanol p.a, dapar fosfat pH 7 (KH_2PO_4 0,2 M teknis dan NaOH 0,2 M teknis), gula “Gulaku, susu “Dancow”, Na_2CO_3 Light teknis, reagen *Folin-Ciocalteu* (Merck), serta sampel kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora*).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Penyiapan Bahan

a. Preparasi Larutan Dapar Fosfat

Larutan dapar fosfat pH 7 dibuat dengan mencampurkan 50 mL KH_2PO_4 0,2 M dengan 29,1 mL larutan NaOH 0,2 M kemudian ditambahkan akuades ad 200 mL. pH larutan dikontrol menggunakan pH meter (DepKes, 1995).

b. Preparasi Larutan Induk Asam Klorogenat

Larutan induk asam klorogenat 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 25 mg asam klorogenat menggunakan metanol p.a dalam labu ukur 25 mL sampai tepat tanda batas labu ukur. Larutan induk asam klorogenat 2500 ppm dibuat dengan melarutkan 125 mg asam klorogenat dengan metanol p.a dalam labu ukur 50 mL sampai tepat tanda batas.

c. Preparasi Larutan Standar Asam Klorogenat

Larutan standar baku induk 1000 ppm masing-masing dipipet 1,0; 2,0; dan 3,0 mL kemudian dimasukkan ke labu ukur 10,0 mL dan ditambahkan metanol sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 100; 200 dan 300 ppm. Larutan standar klorogenat 2500 ppm dipipet 1,0 mL dan dimasukkan ke labu ukur 10,0 mL dan ditambahkan metanol sampai tanda batas sehingga didapatkan standar klorogenat dengan konsentrasi 250 ppm. Selanjutnya, larutan standar asam klorogenat 2500 ppm masing-masing dipipet 100,0; 200,0; 300,0; dan 600,0 μ L kemudian dimasukkan ke labu ukur 10,0 mL dan ditambahkan metanol sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi standar asam klorogenat 25,0; 50,0; 75,0; dan 150,0 ppm.

d. Preparasi Larutan PPO

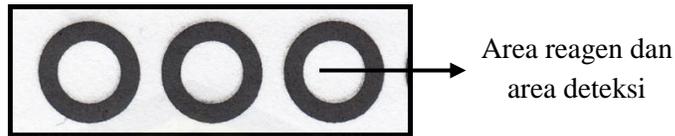
PPO sebanyak 5000 IU dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat pH 7 kemudian diambil sebanyak 1 mL sehingga didapatkan larutan PPO yang digunakan adalah 500 unit/mL. Larutan PPO dengan konsentrasi inilah yang selanjutnya digunakan dalam analisis (Maharani, 2013).

e. Preparasi Larutan Indikator MBTH

Larutan indikator MBTH dibuat dengan melarutkan 48 mg MBTH dalam 2 mL akuades (24,0 mg/mL). Larutan ini kemudian dibuat menjadi tiga seri pengenceran sehingga diperoleh empat seri konsentrasi yaitu 3,0; 6,0; 12,0; dan 24,0 ppm.

3.5.2 Fabrikasi Biosensor Polifenol

Biosensor polifenol dibuat dalam bentuk *chip* kertas berbentuk lingkaran dengan diameter 0,8 cm seperti yang terlihat pada Gambar 3.2. Pembuatan *chip* kertas dilakukan menggunakan teknik cetak sablon kemudian PPO dan MBTH diimobilisasikan pada *chip* kertas dengan teknik adsorpsi.



Gambar 3.2 Desain biosensor polifenol dari kertas saring (*whatman* no.40)

Perlu dilakukan beberapa optimasi agar dapat menghasilkan biosensor yang optimum. Optimasi yang dimaksud antara lain optimasi konsentrasi MBTH, optimasi volume reagen, dan optimasi perbandingan volume reagen. Optimasi ini dilakukan dengan melihat intensitas perubahan warna ketika biosensor polifenol direaksikan dengan standar asam klorogenat. Intensitas warna yang terbentuk kemudian diukur menggunakan program *ImageJ*. Sebelum direaksikan dengan standar asam klorogenat, biosensor polifenol terlebih dahulu ditetesi dengan dapar fosfat pH 7 sebagai mediator.

a. Optimasi konsentrasi indikator MBTH

Larutan MBTH dibuat dalam berbagai konsentrasi antara lain 6,0; 12,0; dan 24,0 mg/mL. Total volume reagen yang diimobilisasikan pada biosensor polifenol adalah sebanyak 10,0 μL , 14,0 μL , dan 16,0 μL dengan perbandingan awal reagen adalah 1:1 (1 bagian enzim PPO 500 unit/mL dan 1 bagian reagen MBTH) yang kemudian direaksikan dengan standar asam klorogenat 150 ppm (Maharani, 2013). Konsentrasi MBTH yang digunakan adalah yang memberikan perubahan warna yang dapat terlihat jelas secara visual, menunjukkan nilai *mean RGB* yang besar dan efisien terhadap penggunaan bahan.

b. Optimasi volume reagen

Optimasi ini dilakukan menggunakan tiga perbandingan seri volume MBTH dan PPO yaitu 10,0; 14,0; dan 16,0 μL . Perbandingan volume reagen ini didapatkan dari hasil optimasi sebelumnya. Volume reagen terpilih adalah volume reagen yang dapat mengering dalam waktu yang cukup cepat, dapat memenuhi seluruh permukaan *chip*, dan dapat memberikan perubahan warna yang memenuhi area deteksi biosensor polifenol setelah direaksikan dengan standar asam klorogenat.

c. Optimasi perbandingan volume reagen

Perbandingan volume reagen yang dimaksud adalah perbandingan volume indikator MBTH dan volume PPO. Volume reagen yang digunakan adalah untuk imobilisasi adalah sebanyak 14,0 μL yang terdiri dari indikator MBTH dan PPO 500 unit/mL. Optimasi dilakukan menggunakan tiga perbandingan volume yaitu 1:1, 1:2 dan 2:1 yang kemudian direaksikan dengan standar asam klorogenat 150 ppm. Perbandingan volume reagen terpilih adalah yang memberikan perubahan warna yang dapat terlihat jelas secara visual dan memberikan nilai $\Delta mean RGB$ yang paling besar.

Pengukuran *mean RGB* pada *chip* biosensor dilakukan dengan menentukan area pada *chip* yang berwarna merah. Area pada *chip* yang dimaksud merupakan area deteksi yang telah ditunjukkan pada Gambar 3.2. Setelah area terpenuhi oleh lingkaran pengukur pada perangkat lunak *imageJ*, kemudian dilakukan analisis sehingga didapat nilai *mean RGB* yang diinginkan.

3.5.3 Karakteristik Biosensor

a. Waktu respon

Waktu respon biosensor ditentukan dengan mengukur berapa waktu yang dibutuhkan oleh biosensor untuk dapat bereaksi dengan substrat hingga menghasilkan warna yang relatif konstan. Dalam hal ini, penentuan waktu respon dilakukan dengan mengukur waktu yang dibutuhkan 14,0 μL asam klorogenat 150 ppm untuk bereaksi dengan biosensor sampai memberikan respon warna (*mean RGB*) yang relatif konstan. Pengukuran perubahan warna dilakukan menggunakan *stopwatch* setiap menit. Interval waktu yang digunakan yaitu mulai menit ke-0 sampai perubahan warna yang terjadi konstan. Waktu respon yang dipilih adalah waktu saat biosensor polifenol memberikan perubahan intensitas warna yang relatif konstan.

b. Linieritas

Penentuan linieritas biosensor polifenol dilakukan menggunakan standar asam klorogenat dengan konsentrasi sebesar 25-300 ppm. Sebagai parameter adanya hubungan linieritas digunakan koefisien korelasi (r) antara konsentrasi standar asam klorogenat dengan $\Delta mean RGB$ dan nilai koefisien variasi dari fungsi (Vx_0). Koefisien korelasi (r) dihitung dengan menggunakan analisis regresi linier $y = bx + a$, dimana y adalah $\Delta mean RGB$, b adalah *slope*, x adalah konsentrasi standar asam klorogenat, dan a adalah intersep pada kurva. Cara perhitungan simpangan baku residual (Sy) ditunjukkan pada Tabel 3.1 dan dihitung dengan persamaan 3.1. kemudian dihitung nilai standar deviasi (SD) dari fungsi (Sx_0) dengan persamaan 3.2 dan nilai koefisien variasi dari fungsi (Vx_0) dengan persamaan 3.3.

c. Sensitivitas

Penentuan sensitivitas dilakukan dengan melihat nilai b (*slope*) dari persamaan linieritas hasil uji penentuan linieritas. Nilai sensitivitas yang besar menunjukkan bahwa perubahan kecil dari analit dapat memberikan respon yang berarti. Semakin besar nilai b maka sensitivitas biosensor semakin baik (Kuswandi, 2010).

Tabel 3.1 Contoh perhitungan simpangan baku residual (Sy)

Konsentrasi asam klorogenat (ppm)	<i>mean RGB</i>	$\Delta mean RGB (y)$	Y_i	$y - y_i$	Δy^2
Blanko	A				
25	B	C	D	E	F
50					
75					
100					
150					
200					
250					
300					
Jumlah					G

$$S_y = \sqrt{\frac{G}{n-2}} \quad (3.1)$$

$$S_{x0} = S_y / b \quad (3.2)$$

$$V_{x0} = (S_{x0} / x) \cdot 100\% \quad (3.3)$$

Keterangan:

$$Y_i = bx + a$$

b = nilai *slope* pada persamaan garis linier kurva antara respon biosensor terhadap konsentrasi

d. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dilakukan dengan menguji biosensor polifenol dengan standar asam klorogenat konsentrasi 25-300 ppm. Kemudian dilakukan pengamatan terhadap perubahan yang terjadi dan ditentukan konsentrasi terkecil standar asam klorogenat yang masih dapat dideteksi dan yang dapat memberikan perubahan warna signifikan terhadap blangko. Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi dijelaskan pada persamaan 3.4.

$$\text{Batas deteksi} = \frac{3 \times S_y}{b} \quad (3.4)$$

$$\text{Batas kuantitasi} = \frac{10 \times S_y}{b}$$

Keterangan :

S_y = nilai simpangan baku residual

b = nilai *slope* dari persamaan regresi garis linier dari kurva antara respon biosensor terhadap konsentrasi analit.

e. Selektivitas

Selektivitas biosensor diuji dengan penambahan senyawa pengganggu. Interferensi atau gangguan suatu senyawa ditentukan dengan mengukur dan membandingkan intensitas perubahan warna (*meanRGB*) dari hasil analisis sampel yang mengandung senyawa pengganggu dengan hasil pengukuran sampel tanpa

penambahan senyawa pengganggu. Senyawa pengganggu yang digunakan adalah gula dan susu. Penggunaan gula dan susu sebagai pengganggu karena beberapa sampel kopi di pasaran sudah dicampur dengan gula dan susu. Selain itu, menurut Yusmarini (2011), penambahan susu akan menurunkan ketersediaan asam klorogenat karena terjadinya interaksi antara protein dan asam klorogenat.

Penentuan selektivitas dilakukan dengan pembuatan sampel kopi kemudian ditambahkan gula “Gulaku” dan susu “Dancow” dengan beberapa perbandingan yakni [1:1; 1:2; 1:4; 1:6; 1:8; dan 1:10 (b/b)] (Puspitaningtyas, 2014). Kemudian dilakukan perbandingan nilai *mean RGB* yang dihasilkan dari sampel kopi yang tidak mengandung senyawa pengganggu dan sampel kopi yang mengandung senyawa pengganggu. Nilai % interferensi dihitung dengan persamaan 3.5 dan memenuhi syarat apabila tidak lebih dari 5% (Yuwono & Indrayanto, 2005).

$$\% \text{ interferensi} = 100\% \times \frac{(\text{mean } RGB_{\text{uji}} - \text{mean } RGB_{\text{sampel}})}{\text{mean } RGB_{\text{sampel}}} \quad (3.5)$$

f. Presisi

Presisi ditentukan dengan meneteskan sampel kopi pada biosensor polifenol kemudian diamati perubahan warna yang terjadi. Penentuan presisi dilakukan dengan menghitung nilai standar deviasi relatif (RSD) dari enam kali replikasi menggunakan persamaan 3.6 dan 3.7. Presisi biosensor terhadap analit dapat digolongkan baik bila nilai RSD yang dihasilkan memenuhi kriteria penerimaan nilai RSD seperti pada Tabel 2.1. Contoh perhitungan presisi ditunjukkan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Contoh perhitungan presisi

Replikasi	<i>mean RGB</i>	$\Delta \text{mean } RGB (y)$	Kadar
Blanko	I		
1	J	K	Li
2			
3			
4			
5			

6

Konsentrasi rata-rata	M
-----------------------	---

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (M-Li)^2}{n-1}} \quad (3.6)$$

(3.7)

$$RSD = 100\% \times \frac{SD}{M}$$

g. Akurasi

Akurasi ditentukan dengan metode adisi dimana telah diketahui sebelumnya kadar polifenol dalam sampel. Kemudian dibuat tiga macam larutan dengan konsentrasi berbeda dan masing-masing larutan ditambahkan analit dengan konsentrasi sebesar 30, 45, dan 60% dari konsentrasi sampel hasil pengukuran presisi. Nilai $\Delta mean RGB$ yang didapatkan kemudian dimasukkan ke persamaan 3.8. Akurasi biosensor dikatakan baik apabila didapatkan nilai % *recovery* yang memenuhi kriteria seperti pada Tabel 2.1.

$$\% \text{ recovery} = 100\% \times \frac{\text{Nilai hasil pengukuran}}{\text{Nilai teoritis}} \quad (3.8)$$

h. Waktu pakai

Waktu pakai biosensor polifenol ditentukan dengan mengukur nilai $\Delta mean RGB$ yang didapatkan setelah biosensor direaksikan dengan standar asam klorogenat 150 ppm. Waktu yang digunakan untuk pengujian waktu pakai adalah selama 24 jam dimana biosensor disimpan dalam tiga kondisi ruang yang berbeda. Kondisi tersebut antara lain suhu ruang (± 27 °C), suhu *chiller* (2–8 °C) dan suhu *freezer* (-20–0 °C). Waktu pakai biosensor polifenol dikatakan telah habis apabila respon yang dihasilkan pada waktu tersebut mengalami penurunan nilai $\Delta mean RGB$ sebesar $\geq 15\%$ dari respon awal (hari ke-0) (Kuswandi, 2010).

3.5.4 Aplikasi biosensor pada sampel

Sampel yang digunakan merupakan kopi instan arabika dan robusta yang berasal dari PTPN X Jember. Preparasi sampel kopi dilakukan dengan menimbang masing-masing 125 mg kopi arabika dan robusta kemudian ditambahkan 15 mL akuades panas dalam gelas beker dan digojog sampai sampel kopi larut. Larutan sampel kemudian dipindah ke labu ukur 25 mL dan ditambahi akuades sampai volume tepat batas labu ukur. Sampel kemudian disaring dengan kertas saring sehingga didapatkan filtrat dan residu. Filtrat dari sampel siap digunakan untuk analisis penentuan aktivitas antioksidan.

Pengujian sampel kopi arabika dan robusta yang ada di pasaran sebagai penentuan kualitas kopi adalah dengan menambahkan 14,0 μL sampel pada biosensor polifenol yang telah disiapkan. Perubahan warna diukur menggunakan *scanner* setelah 13 menit, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi dan dilakukan pengukuran nilai *mean RGB* menggunakan program *ImageJ*. Nilai perubahan *mean RGB* (y) digunakan untuk menghitung konsentrasi polifenol dalam sampel dengan memasukkan nilai $\Delta\text{mean RGB}$ ke persamaan kurva hubungan antara konsentrasi asam klorogenat terhadap $\Delta\text{mean RGB}$ ($y = bx + a$). Dari persamaan ini akan diperoleh konsentrasi polifenol (x) masing-masing sampel yang setara dengan ppm asam klorogenat (CAE/*Chlorogenic Acid Equivalent*). Hasil pengukuran kadar polifenol menggunakan *imageJ* dibandingkan dengan hasil penentuan kadar polifenol dengan metode *Total Phenolic Content* (TPC) menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

3.5.5 Perbandingan Metode

Metode penentuan kadar polifenol dalam sampel kopi menggunakan biosensor polifenol dibandingkan dengan metode *Total Phenolic Content* (TPC) menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Prinsip dari metode ini adalah pengukuran kapasitas reduksi dari sampel (polifenol) terhadap reagen *Folin-Ciocalteu*. Metode

spektrofotometri dilakukan dengan mereaksikan 0,1 mL larutan standar asam klorogenat (25-300 ppm) dengan 1,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, digojog dan didiamkan selama 3 menit. Kemudian ditambahkan 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5% dalam larutan tersebut, digojog sampai homogen dan didiamkan kembali selama 15 menit (Alfian & Susanti, 2013). Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum 740 nm (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008).

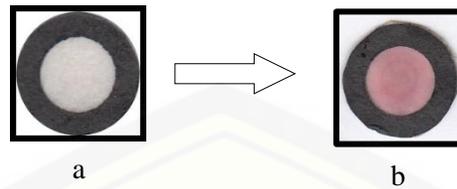
Absorbansi yang diperoleh dari hasil pengukuran tersebut kemudian dibuat kurva baku antara konsentrasi asam klorogenat terhadap absorbansi yang terbentuk sehingga didapatkan persamaan regresi. Masing-masing sampel direaksikan dengan langkah yang sama sehingga dapat diketahui nilai absorbansi sampel (y). Nilai y kemudian dimasukkan ke persamaan regresi sehingga didapatkan nilai x sebagai nilai konsentrasi polifenol yang setara dengan ppm ekuivalen asam klorogenat (*CAE*). Hasil konsentrasi sampel yang didapatkan dengan metode spektrofotometri kemudian dibandingkan dengan hasil dari pengukuran polifenol dengan biosensor polifenol. Perbandingan ini dilakukan menggunakan *paired t-test* dengan $p = 0,05$.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Fabrikasi Biosensor Polifenol

Biosensor merupakan peralatan analisis yang menggunakan materi biologi atau biomolekul dan dapat menghasilkan sinyal atau *output* elektronik yang proporsional dengan jumlah analit, dalam hal ini adalah polifenol dalam sampel. Materi biologi yang digunakan dalam biosensor ini adalah enzim polifenol oksidase (PPO). Selain menggunakan materi biologi, dalam biosensor ini juga digunakan reagen 3-metil-2-benzothiozolin hidrazon (MBTH) sebagai pendeteksi aktivitas antioksidan pada sampel yang ditunjukkan oleh keberadaan polifenol. Biosensor polifenol didesain dalam bentuk *chip* kertas dari kertas saring (*whatman* no.40) yang dibuat dengan teknik cetak sablon menggunakan tinta berbasis minyak. Desain *chip* kertas berupa lingkaran yang memiliki diameter sebesar 0,8 cm. Area di dalam lingkaran merupakan tempat imobilisasi reagen serta merupakan area dimana reagen dan analit akan bereaksi dan memberikan perubahan warna yang teramati oleh mata. Sedangkan lingkaran tinta berwarna hitam berfungsi sebagai pembatas hal ini karena tinta yang digunakan bersifat hidrofobik sehingga dapat menahan reagen dan sampel yang bersifat hidrofilik agar tidak meluber saat ditetaskan.

Desain biosensor yang telah dibuat kemudian siap untuk diimobilisasi dengan enzim PPO dan MBTH sehingga didapatkan suatu piranti biosensor polifenol. Imobilisasi enzim PPO dan MBTH akan mengakibatkan *chip* kertas berwarna putih kekuningan dan setelah direaksikan dengan analit akan terjadi perubahan warna menjadi merah yang ditunjukkan pada Gambar 4.1. Pada penelitian ini desain biosensor polifenol ternyata tidak dapat menahan standar asam klorogenat yang ditetaskan dikarenakan standar asam klorogenat dilarutkan dalam metanol yang merupakan pelarut semi polar sehingga pembatas yang bersifat hidrofobik tidak mampu menahan standar asam klorogenat.

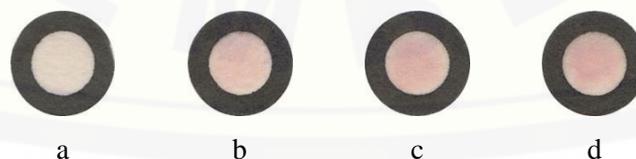


Gambar 4.1 Perubahan warna biosensor polifenol, (a) merupakan *chip* biosensor sebelum ditetesi reagen dan (b) merupakan biosensor setelah bereaksi dengan analit.

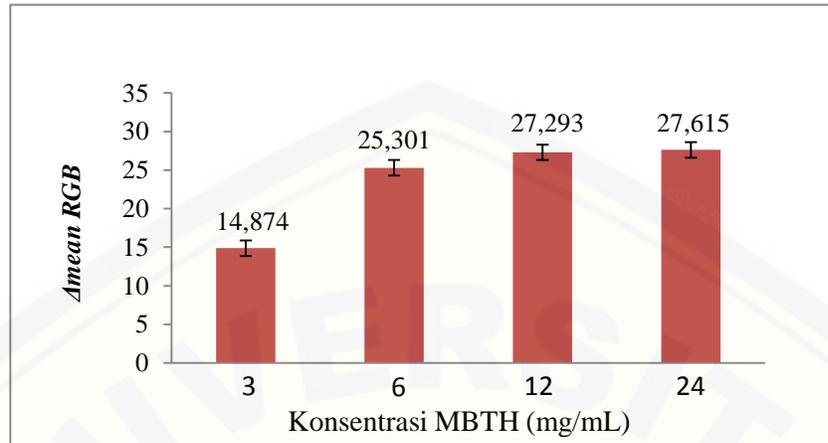
Bahan yang digunakan sebagai pelarut standar asam klorogenat adalah metanol yang bersifat mudah menguap mengakibatkan waktu reaksi tidak berjalan maksimal sehingga perubahan warna yang diharapkan berjalan sangat lambat bahkan sampai tidak terjadi perubahan warna. Pada keadaan ini diperlukan pelarut lain (mediator) yang dapat menjaga biosensor polifenol tetap dalam keadaan basah untuk beberapa saat selama proses reaksi berlangsung. Pemilihan larutan dapar fosfat pH 7 sebagai mediator dikarenakan larutan ini memiliki kapasitas dapar yang akan menjaga stabilitas biosensor meskipun dengan adanya penambahan sampel (Maharani, 2013). Larutan dapar ditetaskan pada biosensor polifenol dan ditunggu sampai biosensor polifenol menjadi setengah kering kemudian baru ditetaskan standar asam klorogenat dan diamati perubahan warna yang terjadi.

4.1.1 Optimasi Konsentrasi MBTH

Optimasi konsentrasi MBTH dilakukan dengan cara mengimobilisasikan reagen ke dalam *chip* kertas yang kemudian direaksikan dengan standar asam klorogenat 150 ppm (Maharani, 2013). Perubahan warna yang terjadi dapat diamati seperti pada Gambar 4.2 sedangkan perubahan intensitas warna yang dinyatakan dalam $\Delta mean RGB$ ditunjukkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.2 Perubahan warna *chip* biosensor yang terjadi pada optimasi konsentrasi MBTH (a) 3,0 (b) 6,0 (c) 12,0 (d) 24,0 mg/mL.



Gambar 4.3 Grafik hasil pengukuran $\Delta mean RGB$ untuk optimasi konsentrasi MBTH.

Secara visual perubahan warna dapat teramati secara jelas pada biosensor polifenol yang diimobilisasi oleh reagen dengan konsentrasi MBTH mulai 6,0 mg/mL; 12,0 mg/mL dan 24,0 mg/mL seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.2. Parameter pemilihan konsentrasi reagen MBTH yang optimum antara lain munculnya perubahan warna yang dapat teramati jelas secara visual, efisiensi bahan, dan tingginya nilai $\Delta mean RGB$. Gambar 4.2 menunjukkan bahwa konsentrasi reagen MBTH sebesar 3,0 mg/mL memberikan perubahan warna yang tidak terlihat jelas dan nilai $\Delta mean RGB$ yang dihasilkan masih rendah. Reagen MBTH dengan konsentrasi 6,0 mg/mL memberikan respon perubahan warna yang sudah mulai terlihat jelas namun nilai $\Delta mean RGB$ masih lebih rendah dari konsentrasi 12,0 mg/mL. Pada reagen dengan konsentrasi 12,0 mg/mL, sangat jelas terlihat perubahan warna merah pada *chip* biosensor dan nilai $\Delta mean RGB$ yang dihasilkan juga tinggi. Ketika dibandingkan dengan reagen MBTH konsentrasi 24,0 mg/mL, reagen konsentrasi ini memberikan respon perubahan warna yang paling besar ditandai dan nilai $\Delta mean RGB$ keduanya tidak berbeda jauh.

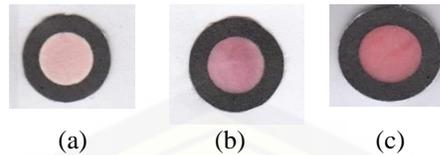
Berdasarkan ketiga parameter yang telah disebutkan, reagen MBTH konsentrasi 3,0 tidak memenuhi syarat intensitas perubahan warna, reagen MBTH konsentrasi 6,0 belum memenuhi syarat $\Delta mean RGB$, dan reagen MBTH konsentrasi 24,0 mg/mL tidak memenuhi syarat efisiensi bahan. Sehingga dipilih reagen MBTH

konsentrasi 12,0 mg/mL karena memenuhi ketiga parameter pemilihan konsentrasi reagen MBTH yang optimum.

4.1.2 Optimasi Volume Reagen

Optimasi volume reagen digunakan untuk menentukan volume reagen yang optimal. Parameter penilaian pada optimasi ini adalah volume reagen yang dapat memenuhi kertas saring dan memberikan perubahan warna yang optimum. Reagen yang dimaksudkan disini adalah campuran MBTH dan enzim PPO dengan perbandingan awal 1:1. Konsentrasi MBTH yang digunakan ialah 12,0 mg/mL sedangkan konsentrasi enzim PPO sebesar 500 unit/mL. Parameter pemilihan volume reagen adalah reagen yang dapat menimbulkan perubahan warna merah dengan jelas secara visual pada *chip* biosensor, memberikan nilai $\Delta mean RGB$ yang tinggi, dapat mengering dengan cepat, dan tidak melebihi area deteksi *chip* biosensor.

Reagen dengan volume 10,0 μL menghasilkan warna merah yang tidak terlalu jelas dengan nilai $\Delta mean RGB$ sebesar 6,755; waktu pengeringan cepat yakni selama 6,16 menit; tetapi volume reagen tidak dapat memenuhi area *chip* biosensor. Reagen dengan volume 14,0 μL menghasilkan warna merah yang terlihat jelas secara visual dengan nilai $\Delta mean RGB$ sebesar 28,539; waktu pengeringan selama 8,20 menit; dan mampu memenuhi area *chip* biosensor secara merata. Reagen dengan volume 16,0 μL memberikan warna merah yang terlihat sangat jelas dengan nilai $\Delta mean RGB$ sebesar 40,245; namun waktu pengeringan biosensor paling lama yakni selama 10,39 menit dan reagen yang diteteskan melebihi area deteksi bahkan sampai tumpah ke luar *chip* biosensor. Sehingga dipilih reagen dengan volume 14,0 μL sebagai volume reagen yang optimal karena mampu memenuhi kriteria dari ketiga parameter untuk pemilihan volume reagen.



Gambar 4.4 Optimasi volume reagen (a) 10 μL , (b) 14 μL , (c) 16 μL .

4.1.3 Optimasi Perbandingan Volume Reagen

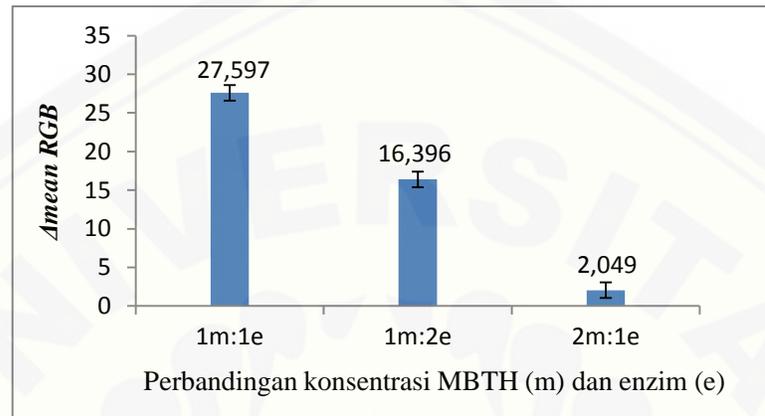
Reagen yang dimaksud dalam hal ini adalah enzim PPO dan MBTH. Optimasi perbandingan volume reagen dilakukan dengan membuat campuran reagen MBTH 12,0 mg/mL dan enzim PPO 500 unit dengan perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1. Optimasi ini dilakukan untuk menentukan perbandingan volume MBTH dan enzim PPO yang mampu memberikan hasil optimal. Hasil yang optimal disini maksudnya adalah dengan penggunaan sejumlah enzim dan reagen MBTH yang seefisien mungkin masih dapat memberikan perubahan warna yang dapat teramati dengan jelas secara visual dan memberikan nilai $\Delta mean RGB$ yang paling besar. Hasil dari optimasi perbandingan volume reagen yang telah direaksikan dengan asam klorogenat 150 ppm ditunjukkan pada Gambar 4.5 dan 4.6.



Gambar 4.5 Perubahan warna *chip* biosensor yang terjadi pada optimasi perbandingan volume reagen MBTH (m) dan enzim PPO (e)

Gambar 4.5 dan 4.6 menunjukkan nilai $\Delta mean RGB$ pada perbandingan volume reagen MBTH dan enzim PPO 1:1, 1:2, dan 2:1 berturut-turut sebesar 27,597; 16,396; dan 2,049. Berdasarkan data pada Gambar 4.6 diketahui bahwa reagen dengan perbandingan 2:1 memberikan nilai $\Delta mean RGB$ paling kecil dengan perubahan warna merah pada *chip* biosensor yang tidak terlihat jelas. Reagen dengan perbandingan 1:2 memberikan nilai $\Delta mean RGB$ sebesar 16,396 dengan intensitas perubahan warna merah pada *chip* biosensor masih belum terlihat jelas, dan tidak

memenuhi parameter efisiensi bahan. Sedangkan reagen dengan perbandingan 1:1 memberikan nilai $\Delta mean RGB$ tertinggi, memberikan warna merah yang terlihat jelas, dan memenuhi karakteristik efisiensi bahan.



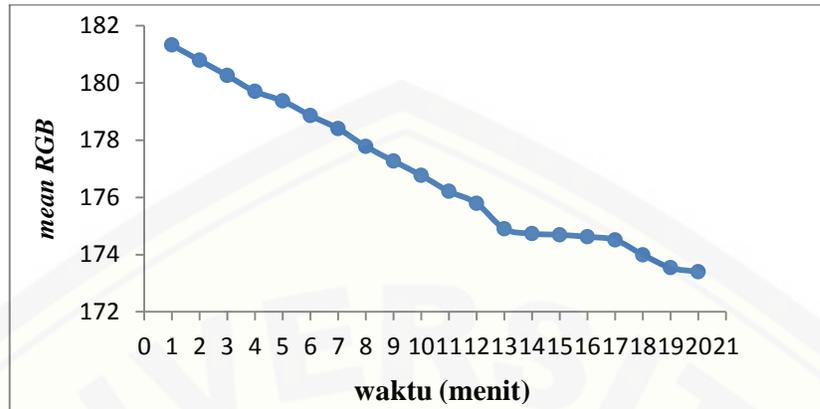
Gambar 4.6 Grafik hasil pengukuran $\Delta mean RGB$ untuk optimasi perbandingan volume reagen MBTH (m) dan enzim PPO (e)

Berdasarkan parameter tingginya nilai $\Delta mean RGB$, intensitas perubahan warna merah pada *chip* biosensor yang dihasilkan, dan efisiensi bahan maka reagen dengan perbandingan 1:1 merupakan reagen dengan perbandingan optimal. Pada perbandingan ini, perubahan warna terjadi dalam waktu ± 10 menit. Perbandingan 1:1 menunjukkan volume MBTH dan enzim PPO yang diimobilisasikan pada *chip* kertas adalah sebanyak 7,0 μL MBTH 12 mg/mL dan 7,0 μL PPO 500 unit/mL.

4.2 Karakteristik Biosensor

4.2.1 Waktu Respon

Pengukuran waktu respon dilakukan menggunakan *stopwatch* setiap menit untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan standar asam klorogenat 150 ppm agar dapat bereaksi dengan biosensor polifenol sampai memberikan respon warna (*mean RGB*) yang relatif konstan. Nilai *mean RGB* yang dihasilkan kemudian dibuat plot kurva antara waktu dan nilai *mean RGB*. Perubahan nilai *mean RGB* terhadap waktu dapat dilihat pada Lampiran A dan ditunjukkan sebagai kurva seperti Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Kurva waktu respon biosensor polifenol

Berdasarkan Gambar 4.7 dapat diketahui bahwa nilai *mean RGB* yang relatif konstan dimulai pada menit ke-13 hingga 17 yang dapat ditunjukkan dengan bentuk kurva yang mendatar. Selain itu, dari nilai standar deviasi (SD) yang ditunjukkan pada Tabel 4.1 diketahui bahwa pada menit ke 13-17 diperoleh nilai SD tidak yang tidak berbeda jauh. Sehingga waktu respon biosensor berada pada rentang 13-17 menit.

Tabel 4.1 Keterangan waktu dan *mean RGB* biosensor untuk karakteristik waktu respon

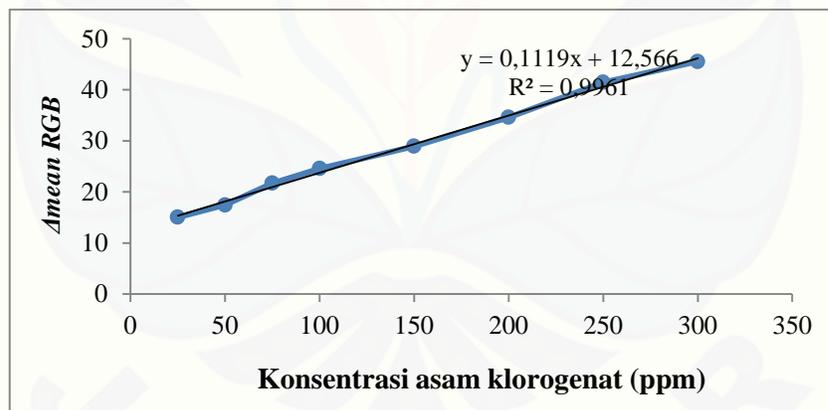
Waktu (menit)	<i>Mean RGB</i>
0	181,798
1	181,320 ± 0,338
2	180,787 ± 0,715
3	180,255 ± 1,091
4	179,700 ± 1,484
5	179,369 ± 1,718
6	178,860 ± 2,077
7	178,401 ± 2,402
8	177,780 ± 2,841
9	177,268 ± 5,518
10	176,769 ± 3,556
11	176,210 ± 3,951
12	175,795 ± 4,245
13	174,766 ± 4,972
14	174,732 ± 4,996
15	174,692 ± 5,025
16	174,621 ± 5,075
17	174,594 ± 5,094
18	173,995 ± 5,518
19	173,542 ± 5,838
20	173,401 ± 5,938

4.2.2 Linieritas

Penentuan karakteristik linieritas biosensor dilakukan dengan membuat seri konsentrasi standar asam klorogenat 25-300 ppm kemudian diteteskan pada biosensor polifenol. Perubahan warna biosensor yang terjadi menjadi indikator bereaksinya biosensor polifenol dengan analit yang kemudian dilakukan pengukuran intensitas perubahan intensitas warna ($\Delta mean RGB$) dari biosensor polifenol seperti terlihat pada Gambar 4.8 dan Tabel 4.2

Tabel 4.2 Data hasil pengukuran Δ mean RGB untuk linieritas (n=3)

Konsentrasi asam klorogenat (ppm)	Mean RGB	Δ Mean RGB (y)	Warna biosensor setelah penambahan analit
blanko	204,131 \pm 1,333	-	
25	189,092 \pm 0,402	15,039 \pm 0,971	
50	186,702 \pm 0,296	17,429 \pm 1,251	
75	182,438 \pm 0,231	21,693 \pm 1,532	
100	179,562 \pm 0,220	24,569 \pm 1,180	
150	175,204 \pm 0,301	28,927 \pm 1,091	
200	169,520 \pm 0,312	34,611 \pm 1,412	
250	162,667 \pm 0,167	41,464 \pm 1,367	
300	158,602 \pm 0,290	45,529 \pm 1,071	



Gambar 4.8 Kurva linieritas biosensor polifenol.

Berdasarkan grafik yang ditunjukkan pada Gambar 4.8 dapat diketahui bahwa pada konsentrasi standar asam klorogenat 25-300 ppm, biosensor polifenol mampu bereaksi dan memberikan respon perubahan warna dari semula biosensor berwarna putih kekuningan menjadi berwarna merah. Semakin tinggi konsentrasi standar asam klorogenat maka intensitas warna merah yang dihasilkan akan semakin

tinggi pula. Sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang proporsional antara konsentrasi analit terhadap respon dari biosensor polifenol berdasarkan linieritas kurva yang terbentuk. Karakteristik linieritas biosensor terberada pada rentang 25-300 ppm dengan persamaan regresi $y = 0,1119x + 12,566$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9961. Berdasarkan hasil tersebut telah diketahui bahwa karakteristik linieritas dari biosensor polifenol telah memenuhi parameter linieritas dengan nilai koefisien korelasi (r) mendekati ± 1 (Harmita, 2004) dan nilai koefisien variasi dari fungsi (Vx_0) kurang dari 5% (Yuwono & Indrayanto, 2005) yaitu sebesar 4,648 %.

4.2.3 Sensitivitas

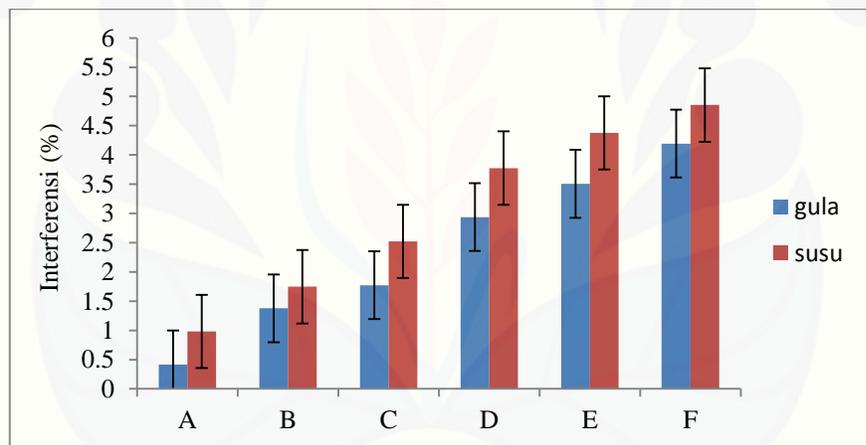
Karakteristik sensitivitas dapat ditentukan dari persamaan regresi kurva linieritas. Sensitivitas merupakan nilai slope (b) persamaan regresi $y = bx + a$. Berdasarkan persamaan regresi, nilai slope yang dihasilkan sebesar 0,1119. Nilai tersebut dapat diartikan bahwa dengan adanya perubahan konsentrasi standar asam klorogenat sebesar 1 ppm akan mengakibatkan perubahan $\Delta mean RGB$ yang ekuivalensi, yakni sebesar 0,1119.

4.2.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi dan batas kuantitasi digunakan untuk mengetahui batas terkecil konsentrasi polifenol dalam sampel yang masih dapat terdeteksi oleh biosensor polifenol. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi menggunakan persamaan 3.4. dari data linieritas pada Tabel 4.2. Simpangan baku residual (Sy) yang didapat dari data linieritas tersebut sebesar 0,753. Perhitungan nilai (Sy) dapat dilihat pada Lampiran B. Sedangkan perhitungan untuk batas deteksi dan batas kuantitasi ditunjukkan pada Lampiran B. Nilai untuk batas deteksi dari biosensor polifenol adalah sebesar 20,217 ppm CAE sedangkan nilai untuk batas kuantitasi biosensor polifenol adalah 67,391 ppm CAE.

4.2.5 Selektivitas

Penentuan selektivitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan metode dalam mengukur keberadaan 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 dan susu. Selain itu, menurut Yusmarini (2011), penambahan susu akan menurunkan ketersediaan asam klorogenat karena terjadinya interaksi antara protein dan asam klorogenat. Penentuan selektivitas menggunakan gula “Gulaku” dan susu “Dancow” dengan beberapa perbandingan yakni [1:1; 1:2; 1:4; 1:6; 1:8; dan 1:10 (^b/_b)] (Puspitaningtyas, 2014). Data % interferensi ditunjukkan pada Tabel 4.3 dan 4.4, sedangkan nilai *mean RGB* ditunjukkan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Grafik *mean RGB* untuk selektivitas biosensor polifenol terhadap pengganggu gula dan susu dalam beberapa perbandingan konsentrasi

Tabel 4.3 Data nilai interferensi biosensor dengan pengganggu gula (n=3)

Perbandingan konsentrasi asam klorogenat dan pengganggu (gula)	<i>Mean RGB</i> rata-rata	Interferensi (%)
Tanpa gula	165,579 ± 0,233	-
1:1	166,269 ± 0,073	0,417
1:2	167,859 ± 0,072	1,377
1:4	168,515 ± 0,190	1,773
1:6	170,439 ± 0,118	2,936
1:8	171,384 ± 0,134	3,506
1:10	172,522 ± 0,193	4,193

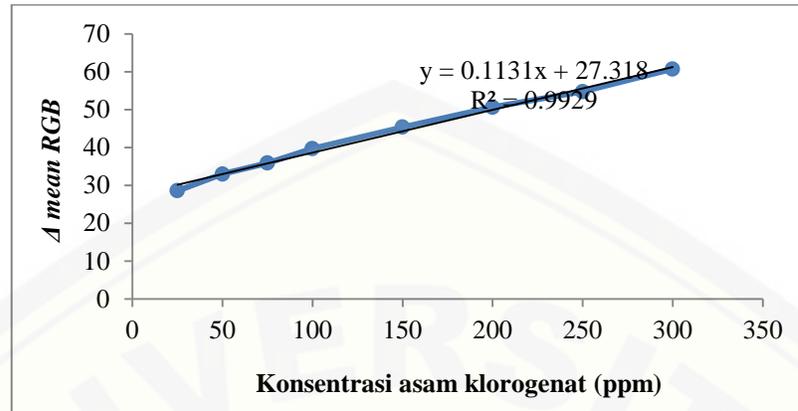
Tabel 4.4 Data nilai interferensi biosensor dengan pengganggu susu (n=3)

Perbandingan konsentrasi asam klorogenat dan pengganggu (susu)	Mean RGB rata-rata	Interferensi (%)
Tanpa susu	165,579 ± 0,233	-
1:1	167,204 ± 0,103	0,982
1:2	168,471 ± 0,215	1,747
1:4	169,755 ± 0,138	2,523
1:6	171,830 ± 0,047	3,775
1:8	172,825 ± 0,215	4,377
1:10	173,615 ± 0,394	4,854

Berdasarkan Gambar 4.9 dapat diketahui bahwa adanya pengganggu baik susu maupun gula tidak memberikan pengaruh yang berarti pada biosensor polifenol. Tabel 4.3 dan 4.4 menunjukkan dengan penambahan gula dan susu sebagai pengganggu pada sampel kopi dengan perbandingan 1:10 (dengan perbandingan yang sama) memberikan nilai interferensi masing-masing sebesar 4,193% dan 4,854%. Nilai tersebut tidak melebihi nilai interferensi yang diperbolehkan yaitu 5% (Yuwono & Indrayanto, 2005). Sehingga dapat disimpulkan bahwa adanya bahan pengganggu gula dan susu pada sampel kopi tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap ketersediaan asam klorogenat dalam kopi.

4.2.6 Presisi

Karakteristik presisi didapatkan dari hasil pengulangan pengukuran yang menunjukkan kedekatan respon biosensor polifenol. Penentuan presisi dilakukan dengan terlebih dahulu membuat kurva kalibrasi standar asam klorogenat selanjutnya dilakukan penentuan presisi dengan meneteskan sampel kopi robusta dan arabika pada biosensor polifenol dan diamati perubahan warna yang terjadi. Presisi dari biosensor polifenol didapatkan dari hasil penghitung nilai standar deviasi relatif (RSD) dari enam kali replikasi.



Gambar 4.10 Kurva kalibrasi karakteristik presisi biosensor polifenol.

Persamaan regresi yang didapat dari pembuatan kurva kalibrasi pada Gambar 4.10 adalah $y = 0,1131x + 27,318$. Persamaan ini yang kemudian digunakan untuk menghitung konsentrasi polifenol CAE dalam sampel kopi robusta sehingga dapat ditentukan nilai RSD. Hasil pengukuran presisi pada sampel kopi robusta dan arabika ditunjukkan oleh Tabel 4.5 dan 4.6.

Tabel 4.5 Data hasil pengukuran presisi pada sampel kopi robusta

Replikasi	Gambar	Mean RGB	Δ Mean RGB	Konsentrasi Polifenol (ppm CAE)	Rata-Rata Konsentrasi Polifenol (ppm CAE)	RSD (%)
Blanko		203,019	-	-		
Rep 1		164,292	38,727	100,875		
Rep 2		164,468	38,551	99,319		
Rep 3		164,150	38,869	102,131	99,103	2,663
Rep 4		164,655	38,364	97,666		
Rep 5		164,396	38,623	99,956		
Rep 6		164,994	38,025	94,668		

Tabel 4.6 Data hasil pengukuran presisi pada sampel kopi arabika

Replikasi	Gambar	Mean RGB	Δ Mean RGB	Konsentrasi Polifenol (ppm CAE)	Rata-Rata Konsentrasi Polifenol (ppm CAE)	RSD (%)
Blanko		202,861	-	-		
Rep 1		158,893	43,968	147,215		
Rep 2		159,325	43,536	143,395		
Rep 3		158,963	43,898	146,596	144,652	1,246
Rep 4		159,386	43,475	142,856		
Rep 5		159,281	43,580	143,784		
Rep 6		159,249	43,612	144,067		

Berdasarkan data tersebut dapat diketahui rata-rata konsentrasi polifenol dalam sampel kopi robusta dan arabika masing-masing sebesar 99,103 ppm dan 144,652 ppm CAE. Nilai RSD yang didapatkan adalah 2,663% untuk sampel kopi robusta dan 1,246% untuk sampel kopi arabika. Menurut Yuwono & Indrayanto (2005), kriteria penerimaan nilai RSD berdasarkan konsentrasi analit yang diperiksa adalah 5,3 % untuk analit dengan konsentrasi sekitar 100 ppm CAE. Seperti yang diketahui, nilai RSD yang dihasilkan oleh biosensor polifenol ini lebih kecil dari 5,3% maka dapat dikatakan bahwa biosensor polifenol memenuhi persyaratan parameter presisi.

4.2.7 Akurasi

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Penentuan akurasi dilakukan dengan metode standar adisi dimana standar asam klorogenat konsentrasi tertentu ditambahkan pada sampel kopi robusta dan arabika. Konsentrasi standar asam klorogenat yang ditambahkan pada sampel yaitu sebesar 30, 45, dan 60 % dari konsentrasi sampel yang diperoleh dari hasil pengukuran presisi, yakni 99,103 ppm dan 144,652 ppm untuk kopi robusta dan arabika. Masing-masing sampel yang telah ditambah dengan standar adisi diukur dengan replikasi sebanyak tiga kali. Perhitungan standar adisi dapat dilihat pada Lampiran E. Data hasil pengukuran % perolehan kembali kedua sampel kopi disajikan pada Tabel 4.7 dan Tabel 4.8.

Tabel 4.7 Data hasil pengukuran akurasi pada sampel kopi robusta

Sampel	Mean <i>RGB</i>	Δ Mean <i>RGB</i>	Pengukuran (μg)	Adisi (CF-CA) (μg)	Teoritis (C*A) (μg)	Perolehan kembali (%)
Blanko	203,241	-	-	-	-	-
C _A Nyata	-	-	99,103	-	-	-
C _F Adisi 30%	169,979	33,262	137,170	38,067	37,5	101,512
Adisi 45%	167,695	35,546	149,808	50,705	50	101,410
Adisi 60%	166,287	36,954	174,508	75,405	75	100,540
Rata-rata perolehan kembali (%)					101,154 \pm 0,534	

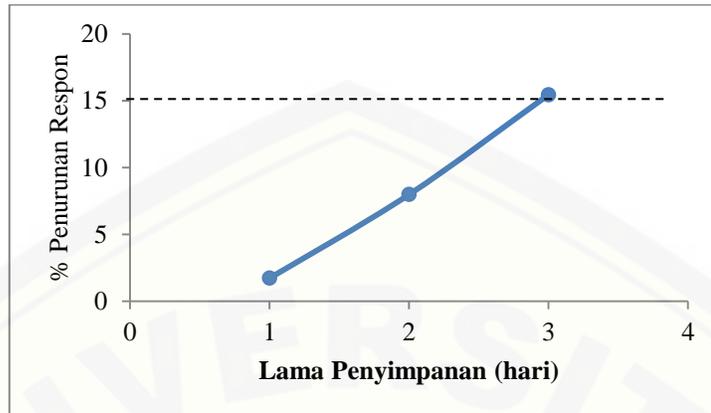
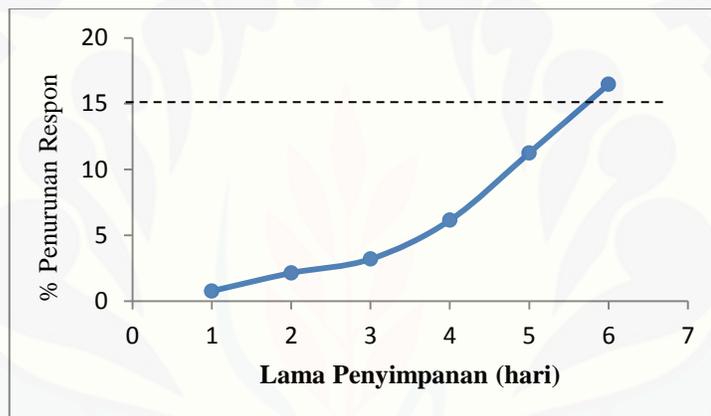
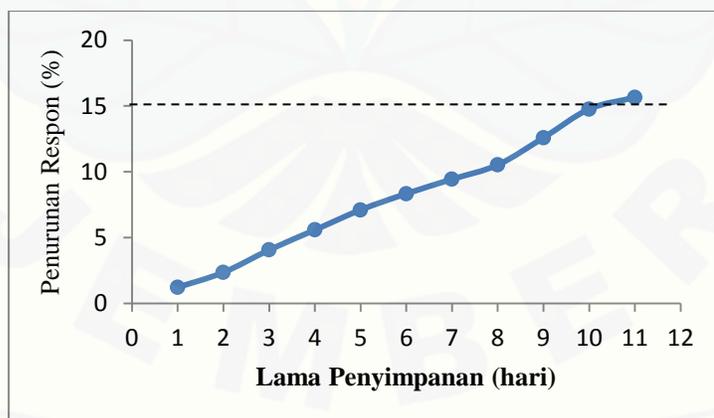
Tabel 4.8 Data hasil pengukuran akurasi pada sampel kopi arabika

Sampel	Mean <i>RGB</i>	Δ Mean <i>RGB</i>	Pengukuran (μg)	Adisi (CF-CA) (μg)	Teoritis (C*A) (μg)	Perolehan kembali (%)
Blanko	202,292	-	-	-	-	-
C _A Nyata	-	-	144,652	-	-	-
C _F Adisi 30%	164,086	38,206	196,474	51,822	50	103,644
Adisi 45%	162,865	39,427	217,874	73,222	75	97,629
Adisi 60%	161,720	41,120	247,596	102,994	100	102,994
Rata-rata perolehan kembali (%)					101,406 \pm 3,289	

Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa nilai perolehan kembali sampel kopi robusta dan arabika masing-masing sebesar 101,154% dan 101,406%. Nilai tersebut memenuhi persyaratan parameter akurasi karena berada pada rentang kriteria penerimaan untuk konsentrasi analit sekitar 100 ppm CAE yaitu 90-107% (Yuwono & Indrayanto, 2005).

4.2.8 Waktu Pakai

Pengujian waktu pakai biosensor polifenol dilakukan untuk mengetahui stabilitas biosensor pada beberapa kondisi suhu. Pengukuran ini menggunakan tiga kondisi suhu, yaitu pada suhu ruang (± 27 °C), suhu *chiller* (2-8 °C) dan suhu *freezer* (-20 – 0 °C) dimana setiap harinya biosensor polifenol direaksikan dengan standar asam klorogenat 150 ppm kemudian diukur perubahan nilai *mean RGB* biosensor untuk mengetahui stabilitas dan besar perubahan responnya. Waktu pakai biosensor dinyatakan sebagai waktu dimana biosensor memberikan reaksi yang sama dan stabil terhadap suatu analit pada konsentrasi yang sama hingga waktu respon biosensor terhadap analit mengalami penurunan (lebih dari 15% dari respon awal). Digunakan 15% sebagai parameter karena setelah selang waktu tertentu terjadi penurunan respon biosensor yang sangat drastis. Sehingga waktu pakai biosensor dikatakan habis jika respon yang dihasilkan mengalami penurunan sebanyak $\geq 15\%$ dari respon awal (Kuswandi, 2010). Data perubahan *mean RGB* pada *chip* biosensor ditunjukkan pada Lampiran F. Berdasarkan hasil ini dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan waktu pakai biosensor polifenol jika disimpan pada kondisi berbeda.

Gambar 4.11 Grafik penurunan respon pada suhu ruang ($\pm 27\text{ }^{\circ}\text{C}$).Gambar 4.12 Grafik penurunan respon biosensor pada suhu *chiller* (2-8 $^{\circ}\text{C}$)Gambar 4.13 Grafik penurunan respon biosensor pada suhu *freezer* (-20 - 0 $^{\circ}\text{C}$)

Penurunan terjadi sangat cepat pada biosensor yang disimpan pada suhu ruang dimana setelah tiga hari penyimpanan langsung terjadi penurunan respon biosensor lebih dari 15%. Penyimpanan pada suhu ruang harus dihindari karena biosensor polifenol tidak stabil pada suhu ruang dan waktu pakai langsung habis dalam dua hari. Berdasarkan Gambar 4.13 dapat diketahui bahwa terjadi penurunan respon biosensor yang lambat jika disimpan pada suhu *freezer* dimana pada hari ke-11 baru terlihat penurunan respon lebih dari 15% sedangkan pada suhu *chiller* terjadi pada hari ke-6. Sehingga penetapan batas waktu pakai pada suhu *freezer* adalah selama 10 hari dan pada suhu *chiller* selama 5 hari.

Biosensor polifenol yang sudah tidak stabil ditandai dengan berubahnya warna biosensor polifenol yang belum ditetesi standar asam klorogenat dari putih kekuningan menjadi semakin berwarna kuning gelap. Selain itu, ketika biosensor polifenol ditetesi dengan standar asam klorogenat membutuhkan waktu yang lama untuk dapat menghasilkan perubahan warna. Menurunnya stabilitas dari biosensor polifenol ini kemungkinan dikarenakan adanya peningkatan suhu. Peningkatan suhu diketahui dapat mengakibatkan enzim PPO terdenaturisasi dan menjadikannya tidak aktif lagi (Murray *et al.*, 1999). Selain itu, stabilitas reagen MBTH akan menurun seiring meningkatnya suhu karena hidrat pada MBTH akan terdisosiasi menjadi MBTH asam bebas yang bersifat tidak stabil (Yu, 2002).

4.3 Aplikasi Sampel pada Biosensor Polifenol

Sampel yang digunakan merupakan kopi instan arabika dan robusta yang berasal dari PTPN X Jember. Preparasi sampel kopi dilakukan dengan menimbang masing-masing 125 mg kopi arabika dan robusta kemudian ditambahkan 15 mL akuades panas dalam gelas beker dan digojog sampai sampel kopi larut. Larutan sampel kemudian dipindah ke labu ukur 25 mL dan ditambahi akuades sampai volume tepat batas labu ukur. Sampel kemudian disaring dengan kertas saring

sehingga didapatkan filtrat dan residu. Filtrat dari sampel siap digunakan untuk analisis penentuan aktivitas antioksidan.

Pengujian dilakukan dengan meneteskan sebanyak 14,0 μL sampel pada biosensor polifenol yang sebelumnya telah ditetesi larutan mediator dan ditunggu selama ± 13 menit sampai terjadi perubahan warna. Perubahan warna pada biosensor ini kemudian diukur dengan perangkat lunak “*ImageJ*” sehingga didapatkan nilai *mean RGB*. Nilai ini yang kemudian digunakan untuk menghitung konsentrasi polifenol dalam sampel dengan memasukkan nilai $\Delta\text{mean RGB}$ (y) ke dalam persamaan garis kurva hubungan antara konsentrasi asam klorogenat dengan $\Delta\text{mean RGB}$ sampel ($y = bx + a$). Dari persamaan tersebut diperoleh konsentrasi polifenol (x) dari masing-masing sampel yang setara dengan ppm *CAE*. Data hasil pengukuran konsentrasi polifenol pada sampel kopi arabika dan robusta menggunakan metode biosensor polifenol disajikan pada Tabel 4.9 dan 4.10.

Warna awal semua larutan sampel kopi yang digunakan adalah coklat kekuningan, kemudian setelah diuji dengan biosensor polifenol dengan waktu respon ± 13 menit, warna dari biosensor polifenol berubah warna merah. Hal tersebut menunjukkan bahwa warna awal sampel tidak mempengaruhi besarnya hasil pengukuran konsentrasi polifenol ppm *CAE*. Sampel yang memiliki kandungan senyawa polifenol akan merubah warna biosensor polifenol yang semula berwarna putih kekuningan menjadi merah. Semakin pekat warna yang dihasilkan menunjukkan semakin besar pula konsentrasi polifenol ppm *CAE* dalam sampel tersebut.

4.4 Perbandingan Metode

Metode penentuan polifenol dalam sampel kopi menggunakan biosensor polifenol dibandingkan dengan metode *Total Phenolic Content* (TPC). Metode TPC ini dilakukan dengan mengukur kapasitas reduksi dari sampel (polifenol) terhadap reagen *Folin-Ciocalteu* menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Hasil dari

pengukuran konsentrasi polifenol menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis disajikan pada Tabel 4.9 dan 4.10.

Tabel 4.9 Data konsentrasi polifenol (ppm CAE) dalam kopi robusta menggunakan metode biosensor polifenol dan Spektrofotometri UV-Vis

Replikasi Sampel	Konsentrasi polifenol (ppm CAE)	
	Biosensor polifenol	Spektrofotometri UV-Vis
Replikasi 1	98,270	98,207
Replikasi 2	97,957	98,416
Replikasi 3	98,035	98,312
	98,087 ± 0,163	98,312 ± 0,105
Signifikansi 0,280		

Tabel 4.10 Data konsentrasi polifenol (ppm CAE) dalam kopi arabika menggunakan metode biosensor polifenol dan Spektrofotometri UV-Vis

Replikasi Sampel	Konsentrasi polifenol (ppm CAE)	
	Biosensor polifenol	Spektrofotometri UV-Vis
Replikasi 1	143,313	143,230
Replikasi 2	143,270	143,543
Replikasi 3	143,339	143,439
Rata-Rata	143,307 ± 0,035	143,404 ± 0,159
Signifikansi 0,447		

Analisis statistika yang digunakan untuk membandingkan metode biosensor dan spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan metode *paired t-test* menggunakan program SPSS 16 dengan tingkat kepercayaan 95% untuk membandingkan selisih rerata antara dua sampel yang berpasangan dengan sebaran data yang terdistribusi normal (Dahlan, 2006). Kedua metode dikatakan memiliki perbedaan yang bermakna apabila $\leq p$ ($p = 0,05$). Berdasarkan Tabel 4.9 dan 4.10 diketahui bahwa nilai signifikansi sampel kopi robusta adalah sebesar 0,280 dan untuk kopi arabika adalah sebesar 0,447. Dari hasil tersebut, berarti nilai $p > 0,05$ yang artinya tidak terdapat perbedaan bermakna antara rerata konsentrasi polifenol dengan metode biosensor dan metode spektrofotometri UV-Vis. Sehingga dapat dinyatakan bahwa metode

biosensor polifenol yang telah dikembangkan ini dapat menjadi metode alternatif untuk mengukur adanya polifenol dalam sampel kopi yang berada di pasaran untuk selanjutnya dapat menjadi alternatif dalam mengontrol kualitas kopi.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Fabrikasi biosensor polifenol dilakukan dengan mengimobilisasi enzim PPO dan reagen MBTH pada kertas saring yang didesain dalam bentuk *chip* kertas berbentuk lingkaran dengan teknik adsorpsi.
2. Kondisi optimal biosensor polifenol berbasis enzim PPO dan MBTH untuk kontrol kualitas kopi meliputi:
 - a. Konsentrasi MBTH optimal adalah 12,0 mg/mL.
 - b. Volume reagen optimal yang terpilih adalah 14,0 μ L.
 - c. Perbandingan volume enzim PPO dan MBTH optimal adalah 1:1
3. Karakterisasi biosensor polifenol berbasis enzim PPO dan MBTH untuk kontrol kualitas kopi meliputi:
 - a. Waktu respon yang dibutuhkan biosensor polifenol untuk bereaksi dengan standar adalah 13-17 menit.
 - b. Linieritas biosensor polifenol terhadap standar asam klorogenat berada pada rentang 25-300 ng/ μ L, dengan nilai koefisien korelasi (r) 0,9961; nilai koefisien variasi dari fungsi ($V \times 0$) sebesar 4,648 % dan persamaan regresi yang diperoleh adalah $y = 0,1119x + 12,566$.
 - c. Sensitivitas ditunjukkan dengan peningkatan $\Delta mean RGB$ sebesar 0,1119 tiap ppm CAE.
 - d. Batas deteksi biosensor polifenol sebesar 20,217 ppm CAE sedangkan batas kuantitasi biosensor polifenol adalah 67,391 ppm CAE.

- e. Biosensor polifenol tidak terganggu oleh adanya komponen tambahan yang biasa ditambahkan pada produk kopi yaitu gula dan susu, dengan % interferensi kurang dari 5%.
 - f. Biosensor polifenol memberikan nilai RSD sebesar 2,663% untuk kopi robusta dan 1,246% untuk kopi arabika yang menunjukkan bahwa biosensor polifenol memenuhi parameter presisi dengan nilai RSD kurang dari 5,3 %.
 - g. Biosensor polifenol memenuhi parameter akurasi dengan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang memenuhi syarat antara 90-107 %. Nilai perolehan kembali rata-rata untuk kopi robusta dan arabika masing-masing adalah sebesar 101,154% dan 101,406%.
 - h. Biosensor polifenol akan stabil dalam penyimpanan pada suhu *freezer* (-20–0 °C) selama 10 hari.
4. Biosensor polifenol dapat diaplikasikan untuk kontrol kualitas pada produk kopi di pasaran karena tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara hasil penentuan kadar polifenol dengan metode biosensor dan metode spektrofotometri UV-Vis.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan peneliti adalah sebagai berikut:

1. Masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai stabilitas (waktu pakai) biosensor polifenol. Pada penelitian ini stabilitas biosensor polifenol dikatakan masih rendah karena hanya tahan selama 10 hari pada penyimpanan dengan suhu *freezer*.
2. Penelitian selanjutnya diharapkan mampu memberikan waktu respon yang lebih cepat karena pada penelitian ini waktu respon biosensor dikatakan masih lama yakni pada menit ke-13 sampai 17 baru didapatkan perubahan warna yang relatif konstan.

DAFTAR PUSTAKA

- Arslan, A. 2006, *Immobilization of Tyrosinase in Polysiloxane/Polypyrrole Copolymer Matrices*. Tesis. Turki: Middle East Technical University.
- Alfian, R. & Susanti, H. 2013. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) dengan Variasi Tempat Tumbuh secara Spektrofotometri. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. 2 (1). p.73-80
- Benzie, I. F. F. & Straint, J. J. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 239, p.70–76.
- Biglari, F., AlKarkhi, A. F. M., & Easa, A. M. 2008. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Various Date Palm (*Phoenix Dactylifera*) Fruits from Iran. *Food Chemistry*. 107 (4). p.1636–1641.
- Blainski, A., Lopes, G., & de Mello, J. 2013. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*. 18 (6). p.6852–6865.
- Butt, M. S. & Sultan, M. T. 2011. Coffee and Its Consumption: Benefits and Risks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51 (4). p.363–373.
- Cagliani, L. R., Pellegrino, G., Giugno, G., & Consonni, R. 2013. Quantification of *Coffea Arabica* and *Coffea Canephora* Var. *Robusta* in Roasted and Ground Coffee Blends. *Talanta*. 106, p.169–73.
- Dahlan, M. S. 2006. *Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: ARKANS.
- Ditjen POM, 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi Keempat. Jakarta: Departemen Kesehatan R.I.
- Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F., & Bekhradnia, A. R. 2008. Iron Chelating Activity, Phenol and Flavonoid Content of Some Medicinal Plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*. 7 (18). p.3188–3192.
- Eggins, B. R. 1996. *Biosensor: An Introduction*. New York: John Wiley and Sons.

- Eggins, B. R. 2008. *Chemical Sensors and Biosensors*. John Wiley and Sons.
- Geleijnse, J. M. 2008. Habitual Coffee Consumption and Blood Pressure: An Epidemiological Perspective. *Vascular Health and Risk Management*. 4 (5). p. 963–970.
- George, S. K., Dipu, M. T., Mehra, U. R., Singh, P., Verma, A. K., & Ramgaokar, J. S. 2006. Improved HPLC Method for the Simultaneous Determination of Allantoin, Uric Acid and Creatinine in Cattle Urine. *Journal of Chromatography*. 832 (1). p.134–137.
- Gomes, S. A. S. S. & Rebelo, M. J. F. 2003. A New Laccase Biosensor for Polyphenols Determination. *MDPI - Sensors*. 3, p.166–175.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jiang, Y. 2003. Antioxidant Activities of Peel, Pulp and Seed Fractions of Common Fruits as Determined by FRAP Assay. *Nutrition Research*. 23 (12). p.1719–1726.
- Hamzah, H. H., Yusof, N. A., Salleh, A. B., & Bakar, F. A. 2011. An Optical Test Strip for the Detection of Benzoic Acid in Food. *Sensors*. 11 (12). p.7302–7313.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. I (3). p.117–135.
- Jaiswal, R., Patras, M. A., Eravuchira, P. J., & Kuhnert, N. 2010. Profile and Characterization of the Chlorogenic Acids in Green Robusta Coffee Beans by LC-MS: Identification of Seven New Classes of Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (15). p.8722–8737.
- Kıralp, S. 2003. Immobilization of Polyphenol Oxidase in Conducting Copolymers and Determination of Phenolic Compounds in Wines with Enzyme Electrodes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 33 (1-3). p.37–41.
- Kumar, N., Bhandari, P., Singh, Bi., Gupta, A. P., & Kaul, V. K. 2008. Reversed Phase-HPLC for Rapid Determination of Polyphenols in Flowers of Rose Species. *Journal of Separation Science*. 31 (2). p.262–267.
- Kuswandi, B. 2010. *Biosensor: Konsep, Desain dan Eksperimentasi*. Jember: Universitas Jember.
- Kuswandi, B., & Ahmad, M. 2014. *Recent Progress in Alcohol Biosensors*. London: Licensee OA Publishing.

- Li, Z., Wang, L., Yang, G., Shi, H., Jiang, C., Liu, W., & Zhang, Y. 2003. Study on the Determination of Polyphenols in Tobacco by HPLC Coupled with ESI-MS After Solid-Phase Extraction. *Journal of Chromatographic Science*. 41.
- Magalhães, L. M., Santos, F., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. 2010. Rapid Microplate High-Throughput Methodology for Assessment of Folin-Ciocalteu Reducing Capacity. *Talanta*. 83 (2). p.441–447.
- Maharani, D. A. 2013. *Pengembangan Biosensor Polifenol Berbasis Polifenol Oksidase (PPO) dan 3-Metil-2-Benzothiazolinon Hidrazon (MBTH) untuk Deteksi Polifenol pada Produk Minuman Teh dalam Kemasan*. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Maksimović, Z., Malenčić, Đ., & Kovačević, N. 2005. Polyphenol Contents and Antioxidant Activity of Maydis Stigma Extracts. *Bioresource Technology*. 96 (8). p.873–877.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. 2004. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition*. 79, p.727–747.
- Marazuela, D. M. & Bondi, M. C. M. 2002. *Fiber-optic biosensor – an overview*. Springer-Verlaag
- Marfil, R., Giménez, R., Martínez, O., Bouzas, P. R., Rufián-Henares, J. A., Mesías, M., & Cabrera-Vique, C. 2011. Determination of Polyphenols, Tocopherols, and Antioxidant Capacity in Virgin Argan Oil (*Argania Spinosa*, Skeels). *European Journal of Lipid Science and Technology*. 113 (7). p.886–893.
- Mazzafera, P. & Robinson, S. P. 2000. Characterization of Polyphenol Oxidase in Coffee. *Pergamon - Phytochemistry*. 55, p.285–296.
- Mello, L. D., Sotomayor, M. P. T., & Kubota, L. T. 2003. HRP-Based Amperometric Biosensor for the Polyphenols Determination in Vegetables Extract. *Elsevier*. 96, p.636–645.
- Murray, Granner, Mayes, dan Rodwell. *Biokimia Harper*. Alih Bahasa oleh Andry Hartono. 1999. Jakarta: ECG Press
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., & Saccini, C. 2002. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (20). p.5735–5741.

- Niu, Y., Ma, M., Gong, Y., Wang, Y., & Gong, B. 2014. "Synthesis of Chlorogenic Acid Imprinted Chromatographic Packing by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization and Its Application." *Chemical Research in Chinese Universities*. 30 (5). p.855–862.
- Nokthai, P., Lee, V. S., & Shank, L. 2010. Molecular Modeling of Peroxidase and Polyphenol Oxidase: Substrate Specificity and Active Site Comparison. *International Journal of Molecular Sciences*. 11 (9). p.3266–3276.
- Oktem, H. A., Senyurt, O., Eyidogan, F. I., Bayrac, C., & Yilmaz, R. 2012. Development of a Laccase Based Paper Biosensor for the Detection of Phenolic Compounds. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 10 (2). p.1030–1034.
- Panggabean, Edy. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: AgroMedia Pustaka.
- Photinon, K., Chalermchart, Y., Khanongnuch, C., Wang, S., & Liu, C. 2010. A Thick-Film Sensor as a Novel Device for Determination of Polyphenols and Their Antioxidant Capacity in White Wine. *Sensors*. 10 (3). p.1670–1678.
- Plantamore. 2012. *Kopi*. <http://www.plantamor.com/index.php?album=256>. [10 Maret 2015].
- Podsedek, A., Wilska-Jeszka, J., Anders, B., & Markowski, J. 2000. Compositional Characterisation of Some Apple Varieties. *Eur Food Res Technol*. 210, p.268–272.
- Puspitaningtyas, N. 2014. *Pengembangan Sensor Polifenol Berbasis Natrium Meta Periodat dan 3-Metil-2-Benzothiazolinon Hidrazon untuk Kontrol Kualitas Kopi*. Skripsi. Jember: Universitas Jember.
- Radulescu, F. S., Voicu, V. A., Miron, D. S., Mircioiu, C., & Draghici, C. 2011. The Role of Molecular Descriptors as Screening Tools for the Pyridinealoxime Methiodide Derivatives Biopharmaceutical Profile. *Rev. Chim. (Bucharest)*. 62 (6). p.601–605.
- Raymond, Tice. 1998. *Chlorogenic Acid and Caffeic Acid: Review Toxicological Literature*. North Carolina: Integrated Laboratory System.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Elsevier Science Inc*. 26 (9). p.1231–1237.

- Sääksjärvi, K., Knekt, P., Rissanen, H., Laaksonen, M. A., Reunanen, A., & Männistö, S. 2008. Prospective Study of Coffee Consumption and Risk of Parkinson's Disease. *European Journal of Clinical Nutrition*. 62 (7). p.908–915.
- Sigma-aldrich. 2013. *Product Specification: 3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrzone Hydrochloride Hydrate*. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/129739?lang=en®ion=ID>. [11 Maret 2015].
- Tsao, R. 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2 (12). p.1231–1246.
- Uyanto, Stanislaus S. 2006. *Pedoman Analisis Data dengan SPSS*. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Van Dieren, S., Uiterwaal, C. S. P. M., Van der Schouw, Y. T., Van der Aur, D. L., Boer, J. M. A., Spijkerman, A., Grobbee, D. E., & Beulens, J. W. J. 2009. Coffee and Tea Consumption and Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetologia*. 52 (12). p.2561–2569.
- Vermerris, W. & Nicholson, R. 2007. *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., & Benassi, M.T. 2011. Antioxidant Activity, Polyphenols, Caffeine and Melanoidins in Soluble Coffee: The Influence of Processing Conditions and Raw Material. *Food Chemistry*. 124 (3). p.863–868.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. 2007. Radical Scavenging Ability of Polyphenolic Compounds towards DPPH Free Radical. *Talanta*. 71 (1). p.230–235.
- Wootton-Beard, P. C., Moran, A., & Ryan, L. 2011. Stability of the Total Antioxidant Capacity and Total Polyphenol Content of 23 Commercially Available Vegetable Juices before and after in Vitro Digestion Measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu Methods. *Food Research International*. 44 (1). p.217–224.
- Xue, H. & Shen, Z. 2002. A Highly Stable Biosensor for Phenols Prepared by Immobilizing Polyphenol Oxidase into Polyaniline–polyacrylonitrile Composite Matrix. *Talanta*. 57, p.289–295.

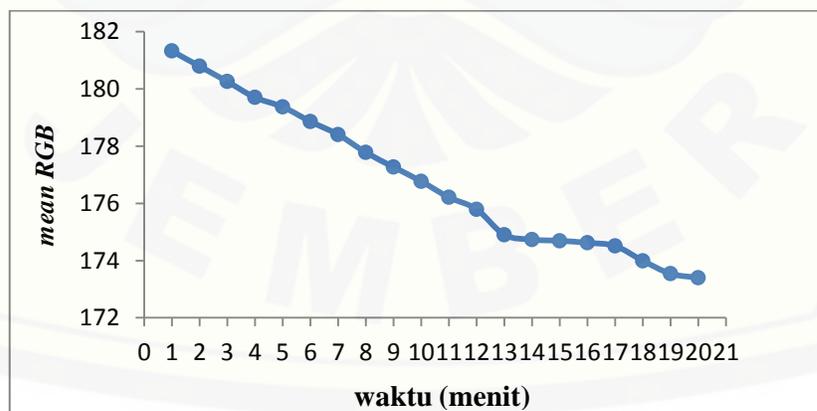
- Yassin, M. & Hanisah, N. 2008. *Determination of caffeine, chlorogenic acid and nicotinic acid in coffee beans by using HPLC*. Disertasi. Universitas Teknologi MARA.
- Yoruk, R. & Marshall, M. R. 2003. Physicochemical Properties And Function Of Plant Polyphenol Oxidase: A Review. *Journal of Food Biochemistry*. 27 (5). p.361–422.
- Yu, Y. S. 2002. *Highly Stable Oxidative Coupling Dye for Spectrophotometric Determination of Analytes*. EP 0 781 350 B1. <http://www.google.com/patents/EP0781350B1?cl=en> [22 Juli 2015].
- Yusmarini. 2011. Senyawa Polifenol pada Kopi: Pengaruh Pengolahan, Metabolisme, dan Hubungannya dengan Kesehatan. Mini Review. *SAGU*. 10 (2). p.22-30
- Yuwono, M. & Indrayanto, G. 2005. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. In Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, *Elsevier*. 32, p.243–259.

LAMPIRAN A

Waktu Respon Biosensor

Tabel 4.1 Keterangan waktu dan *mean RGB* biosensor untuk karakteristik waktu respon

Waktu (menit)	<i>Mean RGB</i>
0	181,798
1	181,320 ± 0,338
2	180,787 ± 0,715
3	180,255 ± 1,091
4	179,700 ± 1,484
5	179,369 ± 1,718
6	178,860 ± 2,077
7	178,401 ± 2,402
8	177,780 ± 2,841
9	177,268 ± 5,518
10	176,769 ± 3,556
11	176,210 ± 3,951
12	175,795 ± 4,245
13	174,766 ± 4,972
14	174,732 ± 4,996
15	174,692 ± 5,025
16	174,621 ± 5,075
17	174,594 ± 5,094
18	173,995 ± 5,518
19	173,542 ± 5,838
20	173,401 ± 5,938

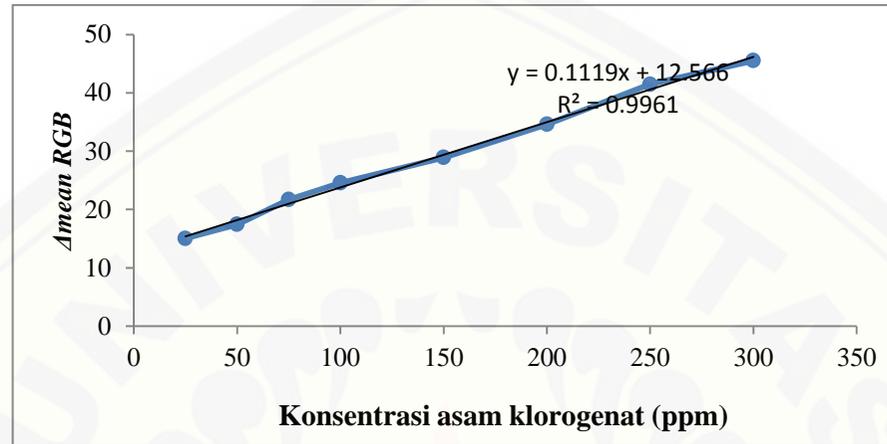


Gambar 4.7 Kurva waktu respon biosensor polifeno

LAMPIRAN B

a. Linieritas Biosensor

Konsentrasi asam klorogenat (ppm)	<i>Mean RGB</i>			Rata-rata <i>Mean RGB</i>	Δ <i>Mean RGB</i>			Rata-rata Δ <i>Mean RGB</i> (y)	Warna biosensor setelah penambahan analit
	Rep 1	Rep 2	Rep 3		Rep 1	Rep 2	Rep 3		
blanko	203,241	203,489	205,663	204,131 ± 1,333	-	-	-	-	
25	188,702	189,069	189,505	189,092 ± 0,402	14,539	14,420	16,158	15,039 ± 0,971	
50	186,370	186,936	186,801	186,702 ± 0,296	16,871	16,553	18,862	17,429 ± 1,251	
75	182,452	182,662	182,201	182,438 ± 0,231	20,789	20,827	23,462	21,693 ± 1,532	
100	179,593	179,328	179,764	179,562 ± 0,220	23,648	24,161	25,899	24,569 ± 1,180	
150	175,188	174,911	175,513	175,204 ± 0,301	28,053	28,578	30,150	28,927 ± 1,091	
200	169,841	169,217	169,501	169,520 ± 0,312	33,400	34,272	36,162	34,611 ± 1,412	
250	162,527	162,852	162,621	162,667 ± 0,167	40,714	40,637	43,042	41,464 ± 1,367	
300	158,529	158,355	158,921	158,602 ± 0,290	44,712	45,134	46,742	45,529 ± 1,071	



Gambar 4.8 Kurva linieritas biosensor polifenol.

Konsentrasi Asam Klorogenat (ppm)	Mean RGB	ΔMean RGB (y)	yi	y-yi	(y-yi) ²
blanko	204,131 ± 1,333	-			
25	189,092 ± 0,402	15,039 ± 0,971	15,364	-0,324	0,105
50	186,702 ± 0,296	17,429 ± 1,251	18,161	-0,732	0,536
75	182,438 ± 0,231	21,693 ± 1,532	20,959	0,734	0,539
100	179,562 ± 0,220	24,569 ± 1,180	23,756	0,813	0,662
150	175,204 ± 0,301	28,927 ± 1,091	29,351	-0,424	0,180
200	169,520 ± 0,312	34,611 ± 1,412	34,946	-0,335	0,112
250	162,667 ± 0,167	41,464 ± 1,367	40,541	0,923	0,853
300	158,602 ± 0,290	45,529 ± 1,071	46,136	-0,607	0,368
			Jumlah	0,049	3,354

$$S(y)^2 = \frac{(y-y_i)^2}{n-2} = \frac{3,354}{6} = 0,559$$

$$S(y) = \sqrt{0,559} = 0,748$$

$$Sx_0 = \frac{S(y)}{b}$$

$$= \frac{0,748}{0,1119}$$

$$= 6,682$$

$$Vx_0 = \frac{Sx_0}{x} \times 100\%$$

$$= \frac{6,682}{143,75} \times 100\%$$

$$= 4,648\%$$

b. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Persamaan regresi : $y = 0,1119x + 15,304$ ($r = 0,9952$)

$$\text{Batas Deteksi (BD)} = \frac{3 \times S(y)}{b} = \frac{3 \times 0,748}{0,1119} = 20,046$$

$$\text{Batas Kuantitasi (BK)} = \frac{3 \times S(y)}{B} = \frac{3 \times 0,748}{0,1119} = 66,820$$

LAMPIRAN C

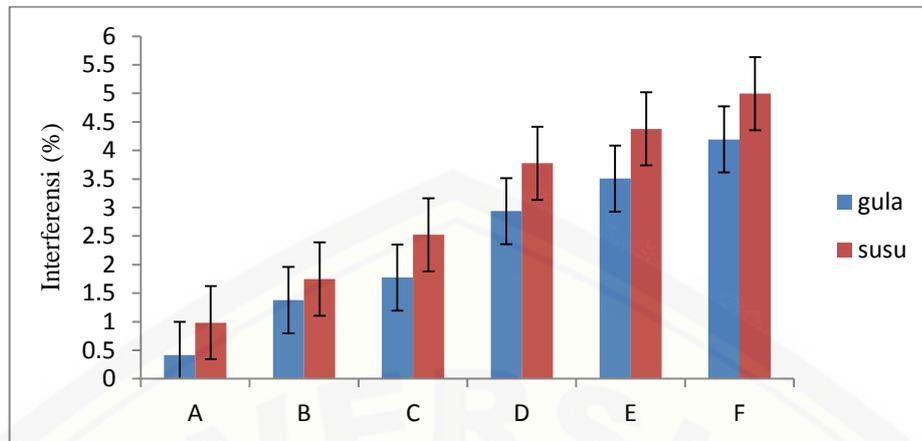
Selektivitas

a. Interferensi Gula

Bahan	Kode	Mean RGB			Selisih			% Interferensi			Rata-Rata interferensi (%)
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
Kopi robusta		165,839	165,509	165,388	-	-	-	-	-	-	-
Kopi robusta : gula (1:1)	A	166,187	166,326	166,293	0,348	0,817	0,905	0,209	0,494	0,547	0,417
Kopi robusta : gula (1:2)	B	167,934	167,851	167,791	2,095	2,342	2,403	1,263	1,415	1,453	1,377
Kopi robusta : gula (1:4)	C	168,573	168,302	168,669	2,734	2,793	3,281	1,649	1,688	1,984	1,773
Kopi robusta : gula (1:6)	D	170,391	170,353	170,574	4,552	4,844	5,186	2,745	2,927	3,136	2,936
Kopi robusta : gula (1:8)	E	171,469	171,453	171,229	5,630	5,944	5,841	3,395	3,591	3,532	3,506
Kopi robusta : gula (1:10)	F	172,598	172,302	172,665	6,759	6,793	7,277	4,076	4,104	4,399	4,193

b. Interferensi Susu

Bahan	Kode	Mean RGB			Selisih			% Interferensi			Rata-rata interferensi (%)
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
Kopi robusta		165,839	165,509	165,388							
Kopi robusta : susu (1:1)	A	167,296	167,223	167,093	1,457	1,714	1,705	0,879	1,036	1,031	0,982
Kopi robusta : susu (1:2)	B	168,406	168,711	168,296	2,567	3,202	2,908	1,548	1,935	1,758	1,747
Kopi robusta : susu (1:4)	C	169,619	169,894	169,753	3,780	4,385	4,365	2,279	2,649	2,639	2,523
Kopi robusta : susu (1:6)	D	171,882	171,815	171,792	6,043	6,306	6,404	3,644	3,810	3,872	3,775
Kopi robusta : susu (1:8)	E	172,905	172,582	172,989	7,066	7,073	7,601	4,261	4,273	4,596	4,377
Kopi robusta : susu (1:10)	F	173,192	173,681	173,972	7,353	8,172	8,584	4,434	4,937	5,190	4,854

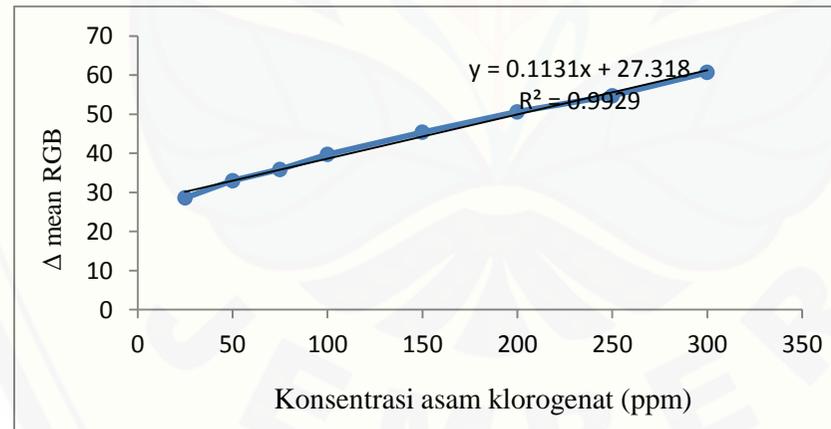


Gambar 4.9 Grafik *mean RGB* untuk selektivitas biosensor polifenol terhadap pengganggu gula dan susu dalam beberapa perbandingan konsentrasi.

LAMPIRAN D

Presisi

Konsentrasi standar asam klorogenat (ppm)	Mean RGB			Mean RGB rata-rata	Δ Mean RGB			Δ Mean RGB rata-rata
	Rep 1	Rep 2	Rep 3		Rep 1	Rep 2	Rep 3	
Blanko	203,769	203,589	203,263	203,540	-	-	-	-
25	174,938	174,836	175,098	174,957	28,831	28,753	28,165	28,583
50	170,594	170,625	170,429	170,549	33,175	32,964	32,834	32,991
75	167,662	167,586	167,721	167,656	36,107	36,003	35,542	35,884
100	163,983	163,797	163,696	163,825	39,786	39,792	39,567	39,715
150	158,285	158,196	158,037	158,173	45,484	45,393	45,226	45,368
200	152,827	152,913	153,025	152,922	50,942	50,676	50,238	50,619
250	148,795	148,662	148,952	148,803	54,974	54,927	54,311	54,737
300	142,934	142,806	142,772	142,837	60,835	60,783	60,491	60,703



Tabel 4.5 Data hasil pengukuran presisi pada sampel kopi robusta

Replikasi	Gambar	Mean <i>RGB</i>	Δ Mean <i>RGB</i>	Kadar Polifenol (ppm CAE)	Rata-Rata Kadar Polifenol (ppm CAE)	RSD (%)
Blanko		203,019	-	-		
Rep 1		164,292	38,727	100,875		
Rep 2		164,468	38,551	99,319		
Rep 3		164,150	38,869	102,131	99,103	2,663
Rep 4		164,655	38,364	97,666		
Rep 5		164,396	38,623	99,956		
Rep 6		164,994	38,025	94,668		

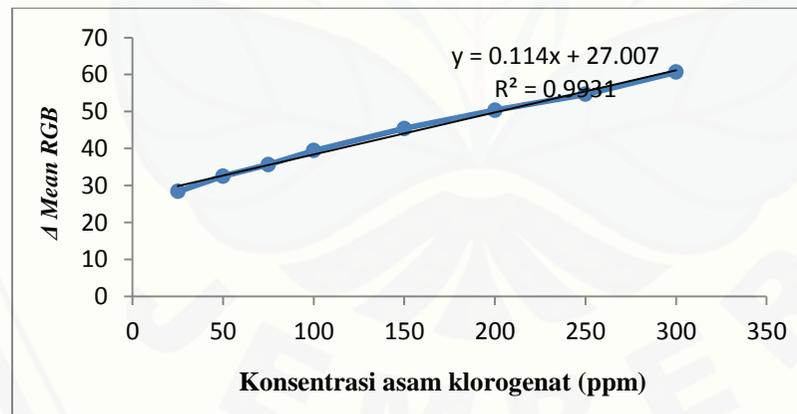
Tabel 4.6 Data hasil pengukuran presisi pada sampel kopi arabika

Replikasi	Gambar	Mean <i>RGB</i>	Δ Mean <i>RGB</i>	Kadar Polifenol (ppm CAE)	Rata-Rata Kadar Polifenol (ppm CAE)	RSD (%)
Blanko		202,861	-	-		
Rep 1		158,893	43,968	147,215		
Rep 2		159,325	43,536	143,395		
Rep 3		158,963	43,898	146,596	144,652	1,246
Rep 4		159,386	43,475	142,856		
Rep 5		159,281	43,580	143,784		
Rep 6		159,249	43,612	144,067		

LAMPIRAN E

Akurasi

Konsentrasi standar asam klorogenat (ppm)	<i>Mean RGB</i>			Rata-rata <i>Mean RGB</i>	Δ <i>Mean RGB</i>			Ratarata Δ <i>Mean RGB</i>
	Rep 1	Rep 2	Rep 3		Rep 1	Rep 2	Rep 3	
Blanko	202,269	203,489	203,663	203,140	-	-	-	-
25	174,412	175,163	174,614	174,730	27,857	28,326	29,049	28,411
50	170,737	170,662	170,392	170,597	31,532	32,827	33,271	32,543
75	167,651	167,294	167,498	167,481	34,618	36,195	36,165	35,659
100	163,395	163,693	163,971	163,686	38,874	39,796	39,692	39,454
150	157,968	157,776	157,492	157,745	44,301	45,713	46,171	45,395
200	152,782	152,602	152,914	152,766	49,487	50,887	50,749	50,374
250	148,275	148,452	148,697	148,475	53,994	55,037	54,966	54,666
300	142,299	142,601	142,512	142,471	59,970	60,888	61,151	60,670



Akurasi sampel kopi arabika ($y = 0,114x + 27,007$)

Sampel	Mean RGB	Δ Mean RGB	Pengukuran (μg)	Adisi ($C_F - C_A$) (μg)	Teoritis (C^*_A) (μg)	Perolehan kembali (%)
Blanko	202,292					
C_A Nyata			144,652			
C_F Adisi 30%	164,086	38,206	196,474	51,822	50	103,644
Adisi 45%	162,865	39,427	217,874	73,222	75	97,629
Adisi 60 %	161,72	41,120	247,596	102,994	100	102,994
Rata-rata perolehan kembali (%)						101,406 \pm 3,289

a. Konsentrasi sampel berdasarkan hasil perhitungan presisi = 144,652 ppm = 144,652 $\mu\text{g/mL}$

b. Dari konsentrasi 144,652 $\mu\text{g/mL}$ diambil 1 mL = 144,652 $\mu\text{g/mL}$ x 1 mL = 144,652 μg

c. Perhitungan standar adisi

Adisi 30% = 30% x 144,652 = 43,396 ~ 50 μg

Cara penambahan = larutan standar 50 $\mu\text{g/mL}$ diambil 1 mL

Adisi 45% = 45% x 144,652 = 65,093 ~ 75 μg

Cara penambahan = larutan standar 75 $\mu\text{g/mL}$ diambil 1 mL

Adisi 60% = 60% x 144,652 = 86,791 ~ 100 μg

Cara penambahan = larutan standar 100 $\mu\text{g/mL}$ diambil 1 mL

d. Kadar sampel uji

Adisi 30%

$$y = 0,114x + 27,007$$

$$38,206 = 0,114x + 27,007$$

$$x = 98,237 \mu\text{g/mL} \rightarrow \text{dalam } 2 \text{ mL} = 98,237 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL} = 196,474 \mu\text{g}$$

Adisi 45%

$$y = 0,114x + 27,007$$

$$39,427 = 0,114x + 27,007$$

$$x = 108,937 \mu\text{g/mL} \rightarrow \text{dalam } 2 \text{ mL} = 108,937 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL} = 217,874 \mu\text{g}$$

Adisi 60%

$$y = 0,114x + 27,007$$

$$41,120 = 0,114x + 27,007$$

$$x = 123,798 \mu\text{g/mL} \rightarrow \text{dalam } 2 \text{ mL} = 123,798 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL} = 247,596 \mu\text{g}$$

e. % Perolehan kembali

$$\begin{aligned} \text{Adisi 30\%} &= \frac{(C_F - C_A)}{C_A^*} \times 100\% \\ &= \frac{(196,474 - 144,652) \mu\text{g}}{50 \mu\text{g}} \times 100\% \\ &= 103,644 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Adisi 45\%} &= \frac{(C_F - C_A)}{C_A^*} \times 100\% \\ &= \frac{(217,874 - 144,652) \mu\text{g}}{75 \mu\text{g}} \times 100\% \\ &= 97,629 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Adisi 60\%} &= \frac{(C_F - C_A)}{C_A^*} \times 100\% \\ &= \frac{(247,596 - 144,652) \mu\text{g}}{100 \mu\text{g}} \times 100\% \\ &= 102,994 \% \end{aligned}$$

Akurasi sampel kopi robusta

	Sampel	Mean RGB	Δ Mean RGB	Pengukuran (μg)	Adisi ($C_F - C_A$) (μg)	Teoritis (C^*_A) (μg)	Perolehan kembali (%)
	Blanko	203,241					
C_A	Nyata			99,103			
C_F	Adisi 30%	169,979	33,262	137,170	38,067	37,5	101,512
	Adisi 45%	167,695	35,546	149,808	50,705	50	101,410
	Adisi 60 %	166,287	36,954	174,508	75,405	75	100,540
Rata-rata perolehan kembali (%)							101,154 \pm 0,534

a. Konsentrasi sampel berdasarkan hasil perhitungan presisi = 99,103 ppm = 99,103 $\mu\text{g}/\text{mL}$

b. Dari konsentrasi 99,103 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diambil 1 mL = 99,103 $\mu\text{g}/\text{mL}$ x 1 mL = 99,103 μg

c. Perhitungan standar adisi

Adisi 30% = 30% x 99,103 = 29,731 ~ 37,5 μg

Cara penambahan = larutan standar 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diambil 1,5 mL

Adisi 45% = 45% x 99,103 = 44.596 ~ 50 μg

Cara penambahan = larutan standar 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diambil 1 mL

Adisi 60% = 60% x 99,103 = 59,462 ~ 75 μg

Cara penambahan = larutan standar 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diambil 1 mL

d. Kadar sampel uji

Adisi 30%

$$y = 0,114x + 27,007$$

$$33,262 = 0,114x + 27,007$$

$$x = 54,868 \mu\text{g/mL} \rightarrow \text{dalam } 2,5 \text{ mL} = 54,868 \mu\text{g/mL} \times 2,5 \text{ mL} = 137,170 \mu\text{g}$$

Adisi 45%

$$y = 0,114x + 27,007$$

$$35,546 = 0,114x + 27,007$$

$$x = 74,904 \mu\text{g/mL} \rightarrow \text{dalam } 2 \text{ mL} = 74,904 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL} = 149,808 \mu\text{g}$$

Adisi 60%

$$y = 0,114x + 27,007$$

$$36,954 = 0,114x + 27,007$$

$$x = 87,254 \mu\text{g/mL} \rightarrow \text{dalam } 2 \text{ mL} = 87,254 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL} = 174,508 \mu\text{g}$$

e. % Perolehan kembali

$$\text{Adisi 30\%} = \frac{(C_F - C_A)}{C_A^*} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} &= \frac{(137,170 - 99,103) \mu\text{g}}{37,5 \mu\text{g}} \times 100\% \\ &= 101,512\% \end{aligned}$$

$$\text{Adisi 45\%} = \frac{(C_F - C_A)}{C_A^*} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} &= \frac{(149,808 - 99,103) \mu\text{g}}{50 \mu\text{g}} \times 100\% \\ &= 101,410\% \end{aligned}$$

$$\text{Adisi 60\%} = \frac{(C_F - C_A)}{C_A^*} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} &= \frac{(174,508 - 99,103) \mu\text{g}}{75 \mu\text{g}} \times 100\% \\ &= 100,540\% \end{aligned}$$

LAMPIRAN F

Waktu Pakai Biosensor

a. Suhu ruang (27 °C)

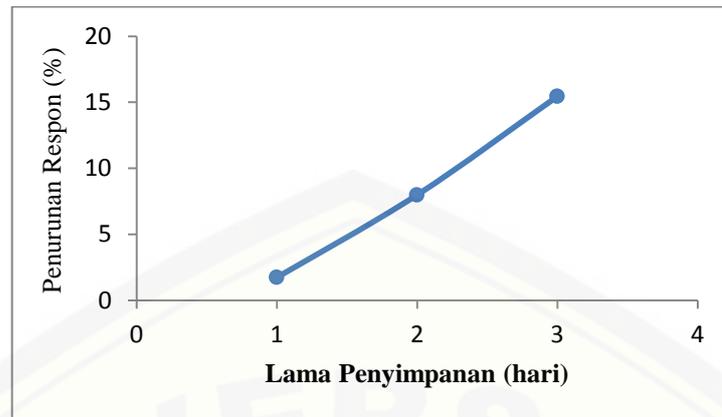
Lama Penyimpanan (hari)	Mean RGB	Penurunan respon dibanding hari ke-0 (%)
0	154,897	
1	157,584	1,735
2	167,265	7,985
3	178,825	15,448

b. Suhu *chiller* (2–8 °C)

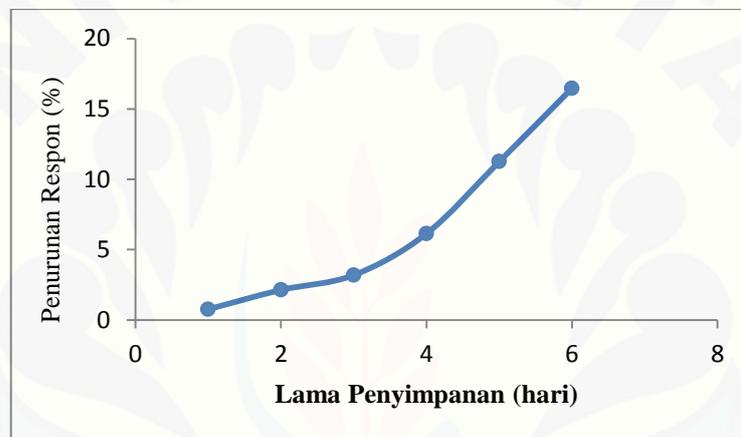
Lama Penyimpanan (hari)	Mean RGB	Penurunan respon dibanding hari ke-0 (%)
0	155,286	
1	156,462	0,757
2	158,597	2,132
3	160,235	3,187
4	164,813	6,135
5	172,759	11,252
6	180,862	16,470

c. Suhu *freezer* [(-20) – 0 °C]

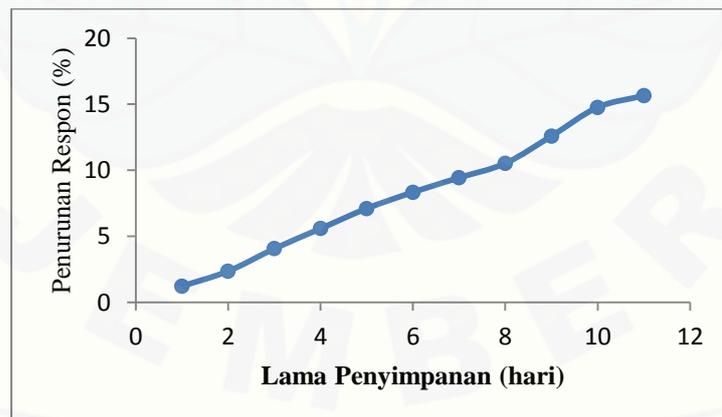
Lama Penyimpanan (hari)	Mean RGB	Penurunan respon dibanding hari ke-0 (%)
0	155,320	
1	157,218	1,221
2	158,968	2,349
3	161,620	4,056
4	163,981	5,576
5	166,346	7,099
6	168,260	8,331
7	169,971	9,433
8	171,662	10,522
9	174,868	12,586
10	178,249	14,762
11	179,624	15,648



Gambar 4.11 Grafik % penurunan respon biosensor pada suhu ruang (± 27 °C).



Gambar 4.12 Grafik % penurunan respon pada suhu *chiller* (2-8 °C)



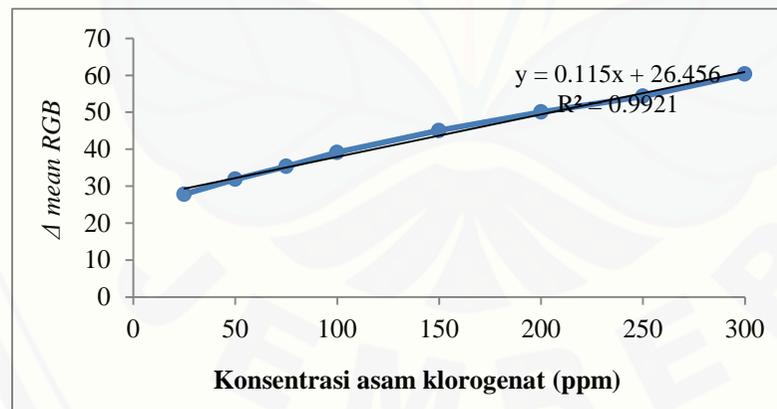
Gambar 4.13 Grafik % penurunan respon pada suhu *freezer* [(-20)-(0) °C].

LAMPIRAN G

Aplikasi Sampel

Persamaan regresi : $y = 0,115x + 26,456$ ($r = 0,9921$)

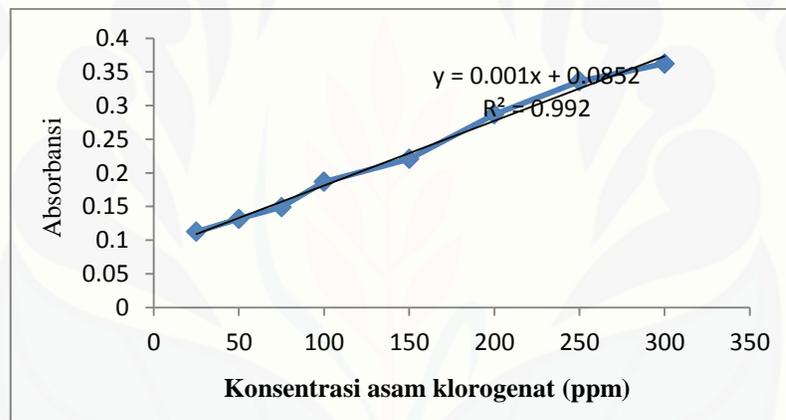
Konsentrasi standar asam klorogenat (ppm)	Mean RGB			Δ Mean RGB			Rata-Rata
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Δ Mean RGB
Blanko	203,269	202,489	202,663	-	-	-	-
25	175,013	175,163	174,841	28,256	27,326	27,822	27,801 \pm 0,465
50	170,637	170,926	171,293	32,632	31,563	31,370	31,855 \pm 0,679
75	167,651	167,294	167,498	35,618	35,195	35,165	35,326 \pm 0,253
100	163,395	163,693	163,971	39,874	38,796	38,692	39,121 \pm 0,655
150	157,968	157,776	157,492	45,301	44,713	45,171	45,062 \pm 0,309
200	152,782	152,602	152,914	50,487	49,887	49,749	50,041 \pm 0,392
250	148,275	148,452	148,697	54,994	54,037	53,966	54,332 \pm 0,574
300	142,299	142,601	142,512	60,970	59,888	60,151	60,336 \pm 0,564



LAMPIRAN H.

Metode *Total Phenolic Content* (TPC) dengan spektrofotometri UV-Vis

Konsentrasi Asam Klorogenat (ppm)	Absorbansi
25	0,112
50	0,132
75	0,149
100	0,187
150	0,221
200	0,287
250	0,336
300	0,362

Persamaan regresi : $y = 9,6062 \cdot 10^{-4}x + 0,08516$ ($r = 0,992$)

LAMPIRAN I.

Hasil Perbandingan metode biosensor polifenol dan spektrofotometri UV-Vis

a. Aplikasi sampel kopi arabika

Replikasi	Blanko	Mean RGB blanko	Sampel	Mean RGB sampel	Δ Mean RGB	Konsentrasi polifenol (ppm) CAE dengan metode biosensor	Konsentrasi Polifenol (ppm) CAE dengan Spektrofotometri UV-Vis	Signifikansi
Rep 1		202,628		159,691	42,937	143,313	143,230	0,447
Rep 2		203,104		160,172	42,932	143,270	143,543	
Rep 3		202,523		159,583	42,940	143,339	143,439	
Rata-rata						143,307 ± 0,035	143,404 ± 0,159	

Paired t-test

Tests of Normality

metode uji konsentrasi polifenol		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
konsentrasi polifenol	biosensor polifenol	.233	3	.	.979	3	.724
	spektrofotometri UV-Vis	.254	3	.	.964	3	.635

a. Lilliefors Significance Correction

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	konsentrasi polifenol metode biosensor	143.30717	3	.035115	.020274
	konsentasi polifenol metode spektrofotometri UV-Vis	143.40377	3	.159234	.091934

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 konsentrasi polifenol metode biosensor - konsentasi polifenol metode spektrofotometri UV-Vis	-.096600	.178119	.102837	-.539072	.345872	-.939	2	.447

b. Aplikasi sampel kopi robusta

Replikasi	Blanko	Mean RGB blanko	Sampel	Mean RGB sampel	Δ Mean RGB	Konsentrasi polifenol (ppm) CAE dengan metode biosensor	Konsentrasi Polifenol (ppm) CAE dengan Spektrofotometri UV-Vis	Signifikansi
Rep 1		203,717		165,960	37,757	98.270	98,207	0,280
Rep 2		203,692		165,971	37,721	97,957	98,416	
Rep 3		203,628		165,898	37,730	98,035	98,312	
Rata-Rata						$98,087 \pm 0,163$	$98,312 \pm 0,105$	

Paired t-test

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
konsentrasi polifenol sampel	metode uji konsentrasi polifenol biosensor	.292	3	.	.924	3	.465
	metode uji konsentrasi polifenol spektrofotometri UV-Vis	.175	3	.	1.000	3	1.000

a. Lilliefors Significance Correction

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	konsentrasi polifenol metode biosensor	98.08690	3	.162898	.094049
	konsentrasi polifenol metode spektrofotometri UV-Vis	98.31137	3	.104300	.060218

Paired Samples Test

	Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
				Lower	Upper			
Pair 1 konsentrasi polifenol metode biosensor - konsentrasi polifenol metode spektrofotometri UV-Vis	-.224467	.264709	.152830	-.882040	.433106	-1.469	2	.280

LAMPIRAN J
Kemasan Biosensor



LAMPIRAN K

Brosur

Magic Coffee merupakan *chip* yang digunakan untuk mendeteksi adanya polifenol dalam sampel (kopi).

Cara penggunaan :

1. Basahi **Magic Coffee** dengan 1 tetes larutan media yang telah disediakan.
2. Segera tambahkan 1 tetes sampel menggunakan pipet yang telah disediakan.
3. Tunggu selama 13-17 menit.
4. Cocokkan perubahan warna yang dihasilkan dengan marker **Magic Coffee**

Peringatan dan Perhatian :

- Simpan **Magic Coffee** dalam *freezer* (-20) – 0 °C.
- Jangan digunakan setelah tanggal kadaluarsa.
- Hindari dari sinar matahari langsung.

Marker **Magic Coffee**



0 25 50 75 100 150 200 250 300

Konsentrasi polifenol

Keterangan:

- Semakin tinggi konsentrasi polifenol maka *chip* akan berwarna semakin merah.
- Angka dibagian bawah marker menunjukkan nilai konsentrasi polifenol dalam sampel.
- Konsentrasi dinyatakan setara dengan ppm ekuivalen asam klorogenat.
- Konsumsi polifenol yang direkomendasikan adalah 200-300 mg/hari.

**Diproduksi oleh:
CBG FARMA UNEJ**

LAMPIRAN L

Alat dan bahan

