



**PERBANDINGAN KADAR FENOL TOTAL DAN AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL DAUN KOPI ROBUSTA (*Coffea
canephora*) DAN ARABIKA (*Coffea arabica*)**

SKRIPSI

Oleh

**Yeni Nur Cahyani
NIM 112210101033**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**PERBANDINGAN KADAR FENOL TOTAL DAN AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL DAUN KOPI ROBUSTA (*Coffea
canephora*) DAN ARABIKA (*Coffea arabica*)**

SKRIPSI

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

Oleh

**Yeni Nur Cahyani
NIM 112210101033**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ibu Sulastri dan Bapak Suji Cahyono, untuk doa, jerih payah, kasih sayang, semangat, motivasi, pengorbanan, dan kepercayaan yang selalu mengiringi perjalanan hidup penulis;
2. Adik Widia Astriani, adik Dina Ayu Maharani, Paman Jemikan S.Si., Apt., Andianto Kurniawan yang selalu menjadi penyemangat dan motivasi penulis;
3. Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang senantiasa sabar membimbing penulis;
4. Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. dan Ibu Yuni Retnaningtyas, S.Si., Apt., M.Si. selaku Dosen Penguji yang dengan penuh kesabaran memberikan masukan kepada penulis;
5. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

Bekerjalah seperti yang telah ditentukan, sebab berbuat lebih baik daripada tidak berbuat, dan bahkan tubuhpun tak akan berhasil terpelihara tanpa berkarya.

(terjemahan Bhagawad Gita Bab III Sloka 8)*)

Keyakinan merupakan suatu pengetahuan di dalam hati, jauh tak terjangkau oleh bukti.

(Kahlil Gibran) **)

*) Ma, G.P.1999. *Bhagawad Gita (Pancama Veda)*. Surabaya : Paramita

**) Tuakala, J. F. 2010. *Sepiring Motivasi untuk Sarapan Pagi*. Yogyakarta : Jogja Bangkit Publisher

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Yeni Nur Cahyani

NIM : 112210101033

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Perbandingan Kadar Fenol Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dan Arabika (*Coffea arabica*)” adalah hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, serta 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, 03 Juni 2015

Yang menyatakan

(Yeni Nur Cahyani)

NIM 112210101033

SKRIPSI

**PERBANDINGAN KADAR FENOL TOTAL DAN AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL DAUN KOPI ROBUSTA (*Coffea
canephora*) DAN ARABIKA (*Coffea arabica*)**

Oleh

Yeni Nur Cahyani
NIM 112210101033

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm.

Dosen Pembimbing Anggota : Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Perbandingan Kadar Fenol Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dan Arabika (*Coffea arabica*)” telah diuji dan disahkan pada :

Hari, tanggal : Rabu, 03 Juni 2015

Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

(Nia Kristiningrum., S.Farm., Apt., M.Farm.)

(Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.)

NIP 198204062006042001

NIP 197604142002122001

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

(Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D.)

(Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt.)

NIP 196902011994031002

NIP 197806092005012004

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

(Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.)

NIP 197604142002122001

ABSTRACT

Phenolic compounds are plant constituents exhibiting many biological effects, including antioxidant activity. Coffee beans were known to contain phenolic compounds. In this study, we carried out the determination of total phenolic content and antioxidant activity in coffee leaves. The aim of this study was to determine total phenolic content and antioxidant activity in methanolic extracts of robusta and arabica coffee leaves (old and young leaves). Total phenolic content and antioxidant activity have been determined using the 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and the Folin-Ciocalteu colorimetric method. Methanolic extracts of old robusta coffee leaves showed the highest total phenolic content and antioxidant activity among all methanolic extracts of coffee leaves, followed by methanolic extracts of old arabica, young robusta and young arabica were 399.40 ± 0.559 ; 354.307 ± 1.204 ; 244.232 ± 1.761 and 190.916 ± 1.715 mg CAE/g extract weight for total phenolic content and 7.519 ± 0.029 ; 8.317 ± 0.050 ; 13.678 ± 0.053 and 15.535 ± 0.089 $\mu\text{g/ml}$ for antioxidant activity (IC_{50} value), respectively. Positive control (vitamin C) showed higher antioxidant activity than that of all methanolic extracts of coffee leaves. IC_{50} value of vitamin C was 3.658 ± 0.032 $\mu\text{g/ml}$. Based on that IC_{50} value, vitamin C and methanolic extract of coffee leaves were potent antioxidant. The antioxidant activity methanolic extracts of robusta and arabica coffee leaves demonstrated a linear correlation ($r = 0.9865$) with their total phenolic content. Thus, it was concluded that phenolic compounds were the predominant antioxidant component in the methanolic extracts coffee leaves. Total phenolic content methanolic extracts of old robusta coffee leaves, old arabica, young robusta and young arabica were significantly different ($p < 0.05$). Antioxidant activity methanolic extract of old robusta coffee leaves, old arabica, young robusta, young arabica and positive control (vitamin C) also were significantly different ($p < 0.05$).

Keywords: *Antioxidant activity, total phenolic content, DPPH method, Folin-Ciocalteu colorimetric method, old and young coffee leaves, Coffea canephora, Coffea arabica*

RINGKASAN

Perbandingan Kadar Fenol Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dan Arabika (*Coffea arabica*); Yeni Nur Cahyani, 112210101033; 2015: 54 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kopi merupakan salah satu komoditi perkebunan Indonesia. Kementerian Perindustrian Republik Indonesia menyatakan bahwa Indonesia merupakan negara penghasil kopi terbesar ketiga di dunia setelah Brasil dan Vietnam. Pemeliharaan tanaman kopi perlu diperhatikan agar produksi kopi terus meningkat. Salah satu bentuk pemeliharaan tanaman kopi yaitu dengan melakukan pemangkasan. Daun kopi hasil pemangkasan banyak yang terbuang sehingga perlu dilakukan proses pemanfaatan lebih lanjut.

Kopi yang banyak dijumpai di pasaran diproduksi dari dua spesies tanaman yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora*). Biji kopi dari kedua spesies ini memiliki banyak senyawa aktif, salah satunya adalah senyawa golongan fenol. Senyawa fenol yang ada pada biji kopi kemungkinan juga banyak dijumpai pada daunnya. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa daun kopi arabika mengandung senyawa fenol. Senyawa fenol ini memiliki beberapa aktivitas salah satunya sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas. Penelitian mengenai perbandingan kadar fenol total dan aktivitas antioksidan perlu dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna kadar fenol total dan aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, dan arabika tua.

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah ekstraksi, penetapan kadar fenol total, pengukuran aktivitas antioksidan dan uji statistik. Ekstraksi menggunakan metode remaserasi dengan pelarut metanol 70%, penetapan kadar fenol total menggunakan metode pewarnaan reagen Folin-Ciocalteu, pengukuran aktivitas

antioksidan menggunakan metode DPPH dengan kontrol positif vitamin C dan uji statistik menggunakan one way anova yang dilanjutkan dengan uji *post hoc* (LSD).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen yang diperoleh dari ekstraksi 250 g serbuk daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta muda, dan arabika muda berturut-turut sebesar 17,130; 18,717; 15,084 dan 16,062 %. Kadar fenol total ekstrak dari yang terbesar yaitu ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta muda, dan arabika muda dengan kadar fenol total berturut-turut yaitu $399,403 \pm 0,559$; $354,307 \pm 1,204$; $244,232 \pm 1,761$ dan $190,916 \pm 1,715$ mg CAE/g ekstrak. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa keempat ekstrak memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kecil dibandingkan vitamin C. Nilai IC_{50} dari vitamin C yaitu $3,650 \pm 0,032$ $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak metanol daun kopi dengan aktivitas antioksidan terbesar yaitu ekstrak metanol daun kopi robusta tua dengan nilai IC_{50} sebesar $7,519 \pm 0,029$, disusul oleh ekstrak metanol daun kopi arabika tua, robusta muda, dan arabika muda dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar; $8,317 \pm 0,050$; $13,678 \pm 0,053$ dan $15,535 \pm 0,089$ $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} tersebut menunjukkan bahwa keempat ekstrak metanol daun kopi dan vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang sangat aktif karena nilai $IC_{50} < 50$ $\mu\text{g/ml}$. Kadar fenol total dan aktivitas antioksidan menunjukkan korelasi linier yang menandakan bahwa senyawa fenol merupakan komponen utama yang memberikan aktivitas antioksidan.

Analisis anova dan uji LSD menunjukkan bahwa kadar fenol total dari ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta muda, dan arabika muda berbeda bermakna. Selain itu, nilai IC_{50} dari keempat ekstrak dan vitamin C juga berbeda bermakna karena nilai p (*p value*) $< 0,05$ dengan tingkat kepercayaan sebesar 95%. Dengan demikian dapat diketahui bahwa umur dan spesies daun kopi mempengaruhi kadar fenol total dan aktivitas antioksidan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai landasan untuk penelitian lebih lanjut.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Perbandingan Kadar Fenol Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dan Arabika (*Coffea arabica*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan dan penyelesaian skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Si. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., Apt., M.Farm. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian serta dengan penuh kesabaran membimbing penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
3. Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Penguji Utama dan Ibu Yuni Retnaningtyas, S.Si., Apt., M.Si. selaku Dosen Penguji Anggota yang dengan sabar memberikan saran dalam penulisan skripsi ini.
4. Ibu Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
5. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi banyak ilmu, berbagi pengalaman dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan; staff dan karyawan atas segala bantuan yang telah diberikan selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Ibu Wayan dan Mbak Hani selaku teknisi Laboratorium Kimia Farmasi serta Ibu Widi dan Mbak Anggra selaku teknisi Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Jember yang telah membantu dan membimbing penulis selama penelitian;

7. Orang tua tercinta Ibu Sulastri dan Bapak Suji Cahyono yang senantiasa memberi doa, kasih sayang, semangat dan motivasi untuk mengiringi perjalanan hidup penulis; adik Widia Astriani, Dina Ayu Maharani; nenek Misiyem, paman Jemikan, S.Si., Apt. dan seluruh keluarga besar penulis yang selalu menjadi penyemangat penulis;
8. Andianto Kurniawan yang dengan sabar memberi semangat dan motivasi untuk penulis;
9. Rekan kerja sekaligus sahabatku Ni Putu Pertiwi, terimakasih atas kerjasamanya saat penelitian dan kebersamaannya selama masa perkuliahan; teman-teman penelitian di bagian Kimia Farmasi (Awalia, Puspita, Eka, Meyladia, Nur, Orin, Alan, Mia, Nurul, Ani, Dewi, mbak Indra dan mbak Inge) terima kasih untuk kebersamaannya saat penelitian;
10. Mbak Inno, Mbak Sherly, Mbak Wiji, Mbak Ida, Mbak Lulu, Mbak Uchi, Helen, Anita, Wina, Novan, Luki, Siska dan Kokoh atas segala inspirasi, semangat dan bantuan yang diberikan kepada penulis selama berada di Jember;
11. Teman-teman seperjuangan Angkatan 2011 Fakultas Farmasi Universitas Jember (ASMEF) yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, aku sayang kalian;
12. Anak-anak kos Mastrip I No.57B (Tiwi, Zul, Catur, Berta, Elisa, Willi, Orin, Fitria, Mbak Frinda dan Mbak Ken) yang selalu bersama selama beberapa tahun terakhir ini dalam suka maupun duka;
13. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari-Nya. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
ABSTRAK	viii
RINGKASAN	x
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR RUMUS	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xx
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Batasan Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Umum Kopi	5
2.1.1 Sejarah	5
2.1.2 Klasifikasi	6
2.1.3 Morfologi	6

2.1.4 Tanaman Kopi Arabika.....	9
2.1.5 Tanaman Kopi Robusta.....	9
2.1.6 Fitokimia.....	9
2.2 Tinjauan Umum Senyawa Fenol.....	10
2.3 Tinjauan Umum Radikal Bebas.....	12
2.4 Tinjauan Umum Antioksidan.....	13
2.5 Tinjauan Umum Vitamin C.....	15
2.6 Tinjauan Umum Metode Folin Ciocalteu.....	16
2.7 Tinjauan Tinjauan Umum Metode Pengukuran Aktivitas Antioksidan.....	17
2.7.1 Metode DPPH.....	17
2.7.2 Metode FRAP.....	19
2.7.3 Metode ABTS.....	20
2.7.4 Kapasitas Serapan Radikal Oksigen (ORAC).....	20
2.7.5 Metode Aktivitas Penghambatan Radikal Hidroksil.....	21
2.7.6 Aktivitas Penghambatan Radikal Superoksida.....	21
2.7.7 Metode Kekuatan Pereduksi.....	21
2.7.8 Lipid Peroksidasi Mikrosomal.....	22
2.7.9 Metode Xantin Oksidase.....	22
2.7.10 Aktivitas Penghambatan Nitrat Oksida Radikal.....	22
2.8 Tinjauan Umum Spektrofotometri UV-Vis.....	23
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	27
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	27
3.2 Jenis Penelitian.....	27
3.3 Variabel Penelitian.....	27
3.3.1 Variabel Bebas.....	27
3.3.2 Variabel Terikat.....	27
3.3.3 Variabel Terkendali.....	27

3.4 Definisi Operasional	28
3.5 Rancangan Penelitian	28
3.5.1 Rancangan Percobaan.....	28
3.5.2 Alur Penelitian.....	29
3.6 Bahan dan Alat	29
3.5.1 Bahan.....	29
3.5.2 Alat.....	30
3.7 Ekstraksi Bahan	30
3.8 Penetapan Kadar Fenol Total	31
3.7.1 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak.....	31
3.8.2 Pembuatan Larutan Baku Asam Klorogenat.....	31
3.8.3 Penetapan Kadar.....	31
3.8.4 Perhitungan.....	31
3.9 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	32
3.9.1 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak.....	32
3.9.2 Pembuatan Larutan Vitamin C.....	32
3.9.3 Pembuatan Larutan DPPH.....	32
3.9.4 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	33
3.9.5 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Larutan Uji Ekstrak dan Vitamin C.....	33
3.9.6 Perhitungan.....	33
3.10 Analisis Data	34
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Ekstraksi Bahan	35
4.2 Penetapan Kadar Fenol Total	36
4.2.1 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum.....	36
4.2.2 Penentuan Waktu Inkubasi.....	37
4.2.3 Penetapan Kadar.....	39

4.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	41
4.3.1 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum.....	41
4.3.2 Penentuan Waktu Inkubasi.....	43
4.3.3 Pengukuran Aktivitas Antioksidan.....	44
BAB 5. PENUTUP.....	49
1.1 Kesimpulan.....	49
1.2 Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

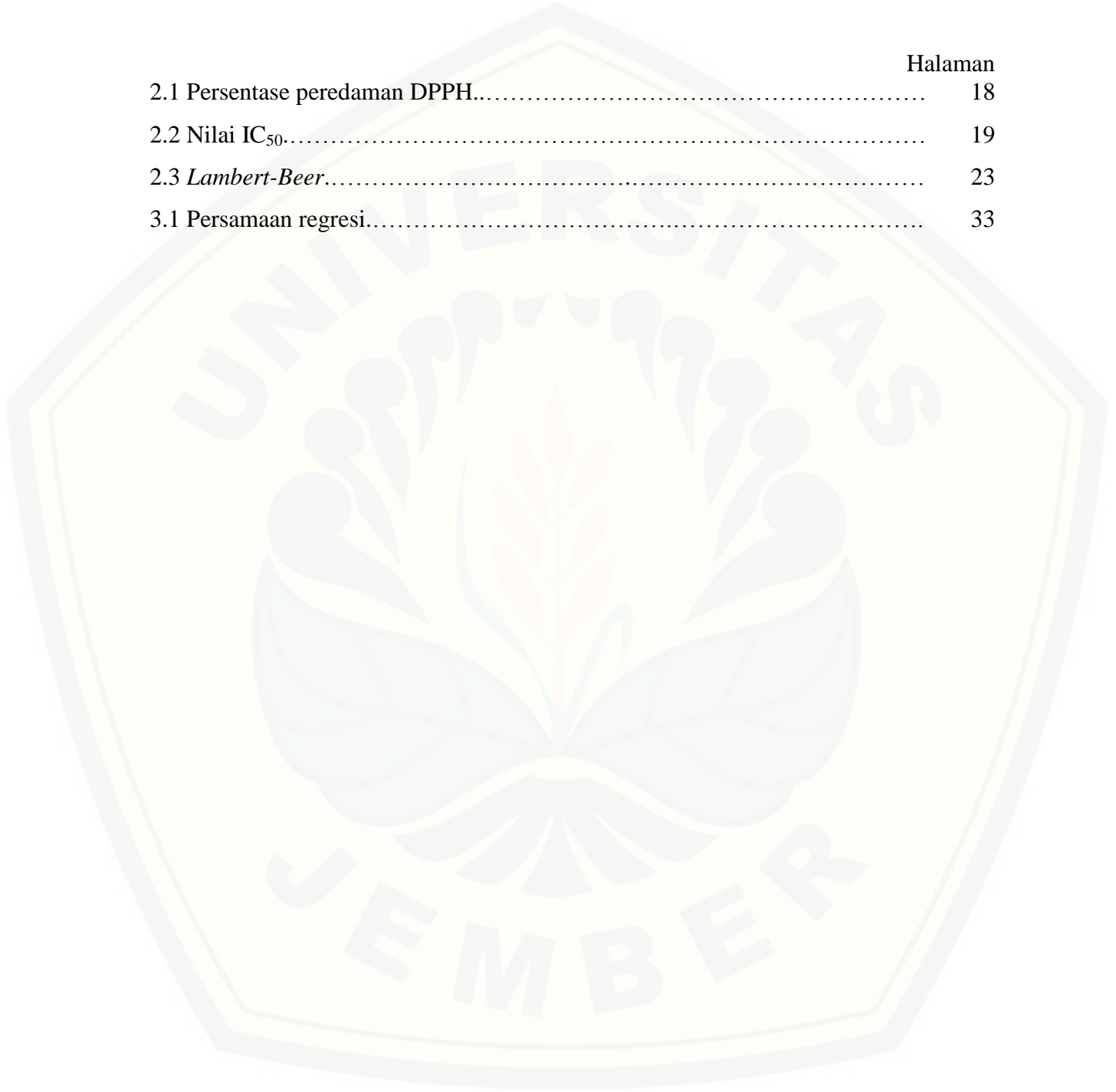
	Halaman
3.1 Klasifikasi senyawa fenol berdasarkan jumlah atom karbon	11
3.2 Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH.....	19
4.1 Hasil ekstraksi daun kopi.....	36
4.2 Hasil penetapan kadar fenol total ekstrak metanol daun kopi.....	40
4.3 Nilai IC ₅₀ vitamin C dan ekstrak metanol daun kopi.....	45

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1a Tanaman kopi arabika.....	9
2.1b Tanaman kopi robusta.....	9
2.2a Daun kopi arabika.....	9
2.2b Daun kopi robusta.....	9
2.3 Struktur kimia fenol.....	10
2.4 Struktur kimia asam klorogenat.....	12
2.5 Struktur kimia vitamin C.....	16
2.6 Reaksi reagen folin ciocalteau dengan fenol.....	17
2.7 Reduksi DPPH dari senyawa peredam radikal bebas.....	18
2.8 Proses eksitasi.....	24
3.1 Alur penelitian.....	29
4.1 Spektra panjang gelombang penetapan kadar fenol total.....	37
4.2 Hubungan waktu dan absorbansi penetapan kadar fenol total.....	38
4.3 Kurva standar asam klorogenat.....	39
4.4 Spektra panjang gelombang pengaruh pemberian larutan uji dan pembanding.....	42
4.5 Hubungan waktu terhadap persen peredaman DPPH.....	43
4.6 Hubungan konsentrasi dengan persen peredaman DPPH.....	44
4.7 Hubungan persen peredaman DPPH dengan IC ₅₀	45
4.8 Hubungan kadar fenol total dengan IC ₅₀ ekstrak metanol daun kopi.....	47

DAFTAR RUMUS

	Halaman
2.1 Persentase peredaman DPPH.....	18
2.2 Nilai IC_{50}	19
2.3 <i>Lambert-Beer</i>	23
3.1 Persamaan regresi.....	33



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Gambar Ekstrak Metanol Daun Kopi.....	55
B. Perhitungan % Rendemen.....	55
C. Gambar Pengukuran Aktivitas Antioksidan.....	55
D. Data Absorbansi.....	56
D.1 Larutan DPPH 32 µg/mL.....	56
D.2 Larutan Uji yang Direaksikan dengan DPPH pada Menit ke 5 sampai 100.....	57
D.3 Larutan Vitamin C.....	58
D.4 Larutan Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Muda.....	58
D.5 Larutan Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Tua.....	58
D.6 Larutan Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda.....	58
D.7 Larutan Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Tua.....	59
E. Perhitungan Bahan Pengukuran Aktivitas Antioksidan.....	59
E.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM.....	59
E.2 Pembuatan Larutan Pembanding (Vitamin C).....	59
E.3 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metanol Robusta Tua.....	60
E.4 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metanol Arabika Tua.....	61
E.5 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metanol Robusta Muda.....	62
E.6 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metanol Arabika Muda.....	63
F. Pengujian Peredaman Radikal Bebas.....	64
F.1 Larutan Uji Pembanding (Vitamin C).....	64
F.2 Larutan Uji Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Tua.....	65
F.3 Larutan Uji Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Tua.....	65
F.4 Larutan Uji Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Muda.....	66
F.5 Larutan Uji Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda.....	67

G. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Waktu Inkubasi.....	67
G.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	67
G.2 Penentuan Waktu Inkubasi DPPH.....	68
H. Perhitungan % Peredaman dan IC_{50}	69
H.1 Vitamin C.....	70
H.2 Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Tua.....	74
H.3 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Tua.....	78
H.4 Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Muda.....	82
H.5 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda.....	86
I. Gambar Penetapan Kadar Fenol Total.....	90
J. Data Absorbansi Penetapan Kadar Fenol.....	91
J.1 Asam Klorogenat 10 $\mu\text{g/mL}$	91
J.2 Standar Asam Klorogenat.....	93
J.3 Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Tua.....	93
J.4 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Tua.....	93
J.5 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda.....	94
J.6 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda.....	94
K. Pembuatan Larutan pada Penetapan Kadar Fenol Total.....	94
K.1 Larutan Asam Klorogenat.....	94
K.2 Larutan Uji Ekstrak Metanol Robusta Tua.....	95
K.3 Larutan Uji Eksrak Metanol Arabika Tua.....	95
K.4 Larutan Uji Eksrak Metanol Robusta Muda.....	95
K.5 Larutan Uji Eksrak Metanol Arabika Muda.....	95
L. Pembuatan Larutan Na_2CO_3 20 %.....	95
M. Hasil Spektra Optimasi Panjang Gelombang Maksimum Fenol.....	96
N. Hasil Optimasi Waktu Inkubasi.....	96
O. Perhitungan Hasil Penetapan Kadar Fenol Total.....	97
O.1 Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Tua.....	98

O.2 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Tua.....	99
O.3 Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Muda.....	101
O.4 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda.....	102
P. Hubungan Kadar Fenol Total dengan IC ₅₀ Ekstrak Metanol Daun Kopi.....	103
Q. Hasil Uji Anova dan <i>Post Hoc</i> (LSD)	104
Q.1 Kadar Fenol Total.....	104
Q.2 Aktivitas Antioksidan (Nilai IC ₅₀).....	106
R. CoA Vitamin C.....	108

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi merupakan salah satu komoditi perkebunan Indonesia (Rahardjo, 2012). Kementerian Perindustrian Republik Indonesia menyatakan bahwa Indonesia merupakan negara penghasil kopi terbesar ketiga di dunia setelah Brasil dan Vietnam. Indonesia memproduksi sedikitnya 748 ribu ton atau 6,6 % dari produksi kopi dunia pada tahun 2012. Agar produksi kopi terus meningkat, selain dengan menambah lahan perkebunan kopi, pemeliharaan tanaman kopi perlu diperhatikan. Salah satu pemeliharaan tanaman kopi yaitu dengan melakukan pemangkasan. Pemangkasan bertujuan agar pohon tetap rendah sehingga mudah perawatannya, membentuk cabang-cabang produksi baru, mempermudah masuknya cahaya, mempermudah pengendalian hama, dan penyakit sehingga akan banyak menghasilkan buah (Prastowo *et al.*, 2010). Daun kopi hasil pemangkasan banyak yang terbuang sehingga perlu dilakukan proses pemanfaatan lebih lanjut.

Kopi yang banyak dijumpai di pasaran diproduksi dari dua spesies tanaman kopi yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora*). Biji kopi dari kedua spesies ini memiliki banyak senyawa aktif, salah satunya adalah senyawa golongan fenol. Beberapa senyawa fenol itu adalah asam kafeat, asam klorogenat, asam kumarat, asam ferulat, dan asam sinapat (Hecimovic *et al.*, 2011). Kandungan fenol yang ada pada biji kopi kemungkinan juga banyak dijumpai pada daunnya. Menurut salgado *et al.* (2008) daun kopi arabika mengandung senyawa fenol.

Senyawa fenol adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang menempel pada cincin aromatik. Turunan senyawa fenol merupakan metabolit sekunder terbesar yang diproduksi oleh tanaman (Vermerris & Nicholson, 2006).

Senyawa fenol ini memiliki aktivitas antioksidan, antitumor, antiviral, dan antibiotik (Apak *et al.*, 2007). Senyawa fenol merupakan antioksidan yang paling banyak dijumpai dalam asupan makanan sehari-hari. Dalam kategori minuman, salah satu sumber antioksidan dari fenol terbesar adalah minuman dari bahan kopi (Pellegrini *et al.*, 2003 ; Carlsen *et al.*, 2010).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas. Radikal bebas adalah setiap molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas ini sangat reaktif dan menghasilkan ikatan silang pada DNA, protein, lipida, atau kerusakan oksidatif pada gugus fungsional yang penting pada biomolekul. Radikal bebas ini berperan pula pada patologi berbagai penyakit degeneratif antara lain kanker, aterosklerosis, jantung koroner, rematik, katarak, dan penyakit degeneratif saraf seperti parkinson (Silalahi, 2006).

Antioksidan dihasilkan oleh tubuh (antioksidan endogen) dan dari luar tubuh (antioksidan eksogen) (Nursalam & Kurniawati, 2007). Antioksidan endogen tidak cukup untuk melawan radikal bebas di dalam tubuh. Oleh karena itu, dibutuhkan tambahan asupan antioksidan dari luar tubuh sehingga mengurangi kapasitas radikal bebas untuk menimbulkan kerusakan (Soltani & Baharara, 2014). Antioksidan dari luar dapat diperoleh dengan mengkonsumsi makanan maupun minuman yang kaya antioksidan, baik yang alami maupun sintesis. Antioksidan alami biasanya berasal dari senyawa fenolik. Sedangkan antioksidan sintetis contohnya adalah *butil hidroksi anisol* (BHA) dan *butil hidroksi toluen* (BHT). Antioksidan sintetis efektif, namun kemungkinan menyebabkan efek samping dan bersifat toksik. Oleh karena itu, antioksidan alami lebih dipilih untuk menambah asupan antioksidan tubuh karena sifatnya yang relatif aman (Kikuzaki & Nakatani, 1993).

Penetapan kadar fenol total dan aktivitas antioksidan penting untuk dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kadar fenol total dan aktivitas antioksidan pada ekstrak daun kopi. Daun kopi yang diteliti terdiri atas daun tua dan daun muda karena hasil pemangkas ranting dan cabang berupa daun tua dan muda. Penetapan kadar

fenol total menggunakan metode pewarnaan folin ciocalteau karena merupakan metode termudah untuk mengukur kadar fenol total dari produk alami (Agbor *et al.*, 2005). Sedangkan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH karena cepat, simpel, akurat, tidak relatif mahal, dan mampu mengukur berbagai komponen yang bertindak sebagai radikal bebas atau donor hidrogen (Prakash, 2001). Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi menggunakan metanol 70% karena metanol merupakan pelarut yang paling baik dalam mengekstrak senyawa fenol dan menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi (Przybylski *et al.*, 2001). Hasil penetapan kadar fenol total dan aktivitas antioksidan kemudian dibandingkan dan diuji secara statistik untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna kadar fenol total dan aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, dan arabika tua.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah dijelaskan, maka dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut.

- 1.2.1 Berapakah kadar fenol total ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, dan arabika tua dengan pengukuran menggunakan pewarnaan reagen Folin-Ciocalteau?
- 1.2.2 Berapakah aktivitas antioksidan (IC_{50}) ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, arabika tua, dan vitamin C dengan pengukuran menggunakan metode DPPH?
- 1.2.3 Apakah ada perbedaan bermakna kadar fenol total ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, dan arabika tua?
- 1.2.4 Apakah ada perbedaan bermakna aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, arabika tua, dan vitamin C?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjawab beberapa rumusan masalah yaitu sebagai berikut.

- 1.3.1 Mengetahui kadar fenol total ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, dan arabika tua dengan pengukuran menggunakan pewarnaan reagen folin ciocalteau.
- 1.3.2 Mengetahui aktivitas antioksidan (IC_{50}) ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, arabika tua, dan vitamin C dengan pengukuran menggunakan metode DPPH.
- 1.3.3 Menentukan apakah ada perbedaan bermakna kadar fenol total ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, dan arabika tua.
- 1.3.4 Menentukan apakah ada perbedaan bermakna aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, arabika tua, dan vitamin C.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang didapatkan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut.

- 1.4.1 Memberikan informasi perbandingan kadar fenol total dan aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kopi arabika dan robusta.
- 1.4.2 Memberikan sumbangan yang bermakna pada ilmu pengetahuan mengenai pembuatan sediaan baru pada jalur antioksidan dan sebagai landasan untuk penelitian lebih lanjut.

1.5 Batasan Penelitian

Adapun batasan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut.

- 1.5.1 Daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dan kopi arabika (*Coffea arabica*) yang digunakan berasal dari perkebunan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.
- 1.5.2 Daun yang digunakan adalah daun tua dan muda.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Tanaman Kopi

2.1.1 Sejarah

Tanaman kopi bukan merupakan tanaman asli Indonesia melainkan jenis tanaman yang berasal dari Afrika. Penyebaran tanaman kopi bermula pada 800 sebelum masehi di benua Afrika. Saat itu, tanaman kopi banyak dijumpai tumbuh liar di hutan-hutan dataran tinggi Ethiopia. Seiring dengan popularitas minuman kopi yang mendunia, penyebaran tanaman kopi meluas ke negara-negara Arab, Eropa, Asia dan Amerika. Di Indonesia, bibit kopi arabika pertama kali ditanam pada zaman kolonial Belanda, sekitar tahun 1600-an. Pada tahun 1711, melalui perusahaan dagang Belanda / VOC (*Vereenigde Oostindische Compagnie*), ekspor kopi pertama dikirim dari Pulau Jawa ke Benua Eropa. Sejak itu, Indonesia dikenal sebagai negara yang membudidayakan tanaman kopi secara luas, di luar Arab dan Ethiopia. Perdagangan kopi sempat dimonopoli oleh VOC sekitar tahun 1725 sampai 1780. Pada tahun 1920, penanaman kopi mulai dilakukan oleh perusahaan-perusahaan kecil di Indonesia. Perkembangan areal perkebunan kopi semakin pesat setelah Indonesia merdeka, yakni mencakup area luar Jawa, seperti Aceh, Lampung, Sumatera Selatan, Sumatera Barat, Sumatera Utara, dan daerah lainnya (Anggara & Marini, 2011).

Awalnya kopi yang ditanam adalah kopi arabika dimana menghasilkan keuntungan yang melimpah. Namun belum sampai puncaknya, tiba-tiba terjadi serangan penyakit daun yang sangat ganas yang menimbulkan banyak kerugian. Serangan yang sangat parah adalah perkebunan di dataran rendah, sedang yang terdapat di dataran tinggi dengan ketinggian 1.000-1.700 meter dari permukaan laut sampai sekarang masih bisa bertahan. Sehingga disimpulkan jenis arabika ini tidak cocok apabila ditanam di dataran rendah. Tahun 1900, Linden mengirimkan kopi

canephora ke jawa yang dalam dunia perdagangan dikenal dengan nama kopi robusta dari Brussel. Ternyata kopi robusta ini tumbuh baik serta lebih tahan terhadap serangan penyakit daun *Hemileia vastatrix*, walaupun tidak 100%. Sejak awal abad ke XX, Indonesia menghasilkan kopi arabika yang termashyur di pasaran dunia dengan sebutan *Java Coffea*, akhirnya beralih pula kepada kopi robusta. Sejak itu apabila orang berbicara tentang kopi Indonesia, maka yang dimaksud pada umumnya adalah kopi Robusta (AAK, 1988).

2.1.2 Klasifikasi

Sistematika tanaman kopi menurut *Integrated Taxonomic Information System* (2011) adalah sebagai berikut:

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Tracheophyta
- Subdivisi : Spermatophyta
- Infradivisi : Angiospermae
- Kelas : Magnoliopsida
- Ordo : Gentianales
- Famili : Rubiaceae
- Genus : Coffea
- Spesies :
 - Kopi Robusta : *Coffea canephora* **Peirre ex Froehner**
 - Kopi Arabika : *Coffea arabica* **L.**

2.1.3 Morfologi

Tanaman kopi tumbuh tegak, bercabang, dan bila dibiarkan tumbuh dapat mencapai tinggi 12 meter. Secara alami, tanaman kopi memiliki akar tunggang sehingga tidak mudah rebah. Namun, akar tunggang tersebut hanya dimiliki oleh tanaman kopi yang bibitnya berupa bibit semaian atau bibit sambungan yang batang

bawahnya merupakan semaian (Najiyati & Danarti, 2001). Morfologi tanaman kopi dapat dilihat pada gambar 2.1.

Tanaman kopi umumnya akan mulai berbunga setelah berumur ± 2 tahun. Bunga kopi berukuran kecil, mahkotanya berwarna putih dan berbau harum semerbak. Kelopak bunga berwarna hijau, pangkalnya menutupi bakal buah yang mengandung dua bakal biji. Benang sarinya terdiri dari 5-7 tangkai yang berukuran pendek (Najiyati & Danarti, 2001). Buah terdiri dari daging buah dan biji. Daging buah terdiri atas 3 bagian yaitu lapisan kulit luar (eksokarp), lapisan daging (mesokarp), dan lapisan kulit tanduk (endokarp) yang tipis tetapi keras. Buah kopi umumnya mengandung dua butir biji tetapi kadang-kadang hanya mengandung 1 butir biji atau bahkan tidak berbiji sama sekali (Najiyati & Danarti, 2001).

Daun arabika kurus, memanjang, lebih tebal, mengkilap dan berwarna gelap hijau atau kecoklatan. Warna dan ketebalan daun arabika bervariasi dengan usia dan status gizi. Daun robusta lebih besar daripada arabika. Daun robusta bergelombang di bagian sisinya, berwarna hijau agak terang dan meruncing di bagian ujungnya. Bagian bawah daun kopi memiliki bukaan mikroskopis kecil yang disebut stomata yang digunakan untuk pertukaran gas. Melalui lubang ini tanaman dapat mengambil CO_2 dan mengeluarkan O_2 dan uap air. Sisi atas daun juga memiliki stomata, tetapi relatif sedikit dibandingkan bagian bawah. Daun tumbuh dan tersusun secara berdampingan di ketiak batang, cabang dan ranting. Sepasang daun terletak di bidang yang sama di cabang dan ranting yang tumbuh mendatar (Kuit *et al.*, 2004 ; Panggabean, 2011). Morfologi daun kopi arabika dan robusta dapat dilihat pada gambar 2.2.

Daun kopi berdasarkan umurnya diketahui terdiri dari daun muda dan daun tua. Daun muda merupakan daun yang masih memiliki penampilan mengkilap yang berumur sekitar 10-30 hari. Daun tua merupakan daun yang dibentuk pada musim tanam sebelumnya, umurnya bervariasi sekitar 6 sampai 12 bulan (Kushalappa & Eskes, 1989). Menurut Salgado *et al.* (2008), daun muda adalah daun yang berwarna hijau terang dan teksturnya lembut yang tumbuh pada cabang *plagiotrop* yang

terletak di bagian tengah pohon kopi. Daun muda terletak pada pasangan pertama daun kopi. Daun tua adalah daun yang berwarna hijau tua dan teksturnya kasar yang tumbuh pada cabang *plagiotrop* yang terletak di bagian tengah pohon kopi.



(a)

(b)

(a) Tanaman kopi arabika ; (b) Tanaman kopi robusta

Gambar 2.1 Morfologi tanaman kopi arabika dan robusta (Kuit *et al.*, 2004)



(a)

(b)

(a) Daun kopi arabika ; (b) Daun kopi robusta

Gambar 2.2 Morfologi daun kopi arabika dan robusta (Panggabean, 2011)

2.1.4 Tanaman Kopi Arabika

Tanaman kopi arabika dapat tumbuh di daerah dengan ketinggian 700-1.700 meter dari permukaan laut, suhu 16-20°C dan beriklim kering tiga bulan secara berturut-turut. Kopi arabika menguasai sekitar 70 % pasar kopi dunia dan telah dibudidayakan di berbagai negara, terutama di negara beriklim tropis atau subtropis. Tanaman kopi arabika memiliki tinggi antara 7-12 meter. Kelemahan kopi yaitu rentan terhadap penyakit karat daun/*Hemelia Vastatrix* (Anggara & Marini, 2011).

Tanaman kopi arabika tidak tahan dingin dan suhu minimum harus di atas 4 - 5°C. Suhu optimum untuk budidaya tumbuhan kopi arabika adalah kisaran 18-25°C. Perbungaan dimulai setelah hujan pertama dan pematangan buah memerlukan periode kering yang bisa sampai 5 bulan. Rentang pH optimum adalah 5,4 - 6,0 (Kuit *et al.*, 2004).

2.1.5 Tanaman Kopi Robusta

Tanaman kopi robusta pertama kali ditemukan di Kongo pada 1898 dan mulai masuk ke Indonesia pada tahun 1900. Walaupun kualitas buahnya lebih rendah daripada kopi arabika, produksinya bisa lebih tinggi dari kopi arabika jika dikelola secara intensif. Keunggulan lain dari tanaman kopi robusta diantaranya lebih resisten terhadap serangan hama dan penyakit (khususnya penyakit *Hemelia Vastatrix*) dan mampu tumbuh dengan baik pada ketinggian 400 - 700 meter dari permukaan laut (Anggara & Martini, 2011).

2.1.6 Fitokimia

Kopi arabika memiliki banyak kandungan kimia pada bijinya seperti tanin, alkaloid, flavonoid, kumarin, kuinon, fenol, dan minyak atsiri (Gunalan *et al.*, 2012). Sedangkan kopi robusta mengandung karbohidrat, senyawa nitrogen (protein, asam amino bebas, kafein, lemak (minyak kopi, diterpen), mineral, asam, dan ester

(asam klorogenat, asam kuinat) (Farah, 2012). Dari penelitian Salgado *et al.* (2008) menunjukkan bahwa kandungan fenol banyak ditemukan pada daun kopi arabika.

2.2 Tinjauan Umum Senyawa Fenol

Senyawa fenol adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang menempel pada cincin aromatik. Senyawa polifenol merupakan senyawa yang memiliki lebih dari satu gugus fenol. Struktur kimia dari fenol dapat dilihat pada Gambar 2.3. Turunan senyawa fenol merupakan metabolit sekunder terbesar yang diproduksi oleh tanaman. Senyawa ini diproduksi dalam tanaman melalui jalur sikimat dan metabolisme fenil propanoid (Vermerris & Nicholson, 2006).



Gambar 2.3 Struktur kimia fenol (Vermerris & Nicholson, 2006)

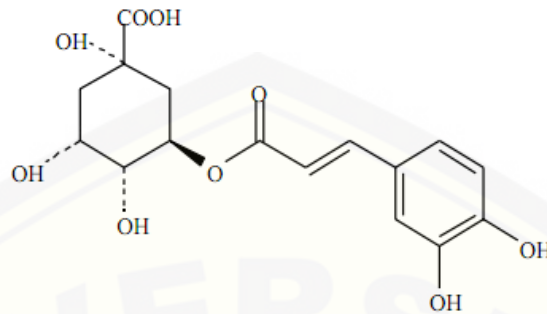
Fenol dan polifenol yang terkandung pada tanaman memainkan peran penting dalam kesehatan jangka panjang dan mengurangi risiko penyakit kronis dan degeneratif. Pengakuan manfaat yang dibawa oleh produk-produk alami untuk kesehatan manusia telah mendorong dimasukkannya dalam diet sehari-hari antara lain minyak zaitun, minyak nabati, jus jeruk dan buah lainnya, cokelat, teh, kopi, dan anggur. Senyawa fenol dapat memiliki aktivitas antioksidan, antitumor, antiviral, dan antibiotik (Apak *et al.*, 2007). Senyawa kimia yang tergolong senyawa fenolik banyak macamnya. Salah satu metode klasifikasi adalah berdasarkan jumlah karbon pada molekul. Rincian klasifikasi tersebut disajikan pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Klasifikasi senyawa fenolik berdasarkan jumlah atom karbon

Struktur	Kelas
C6	Fenolik sederhana
C6-C1	Asam fenolat dan senyawa yang berhubungan lainnya
C6-C2	Asetofenon dan asam fenilasetat
C6-C3	Asam sinamat, sinamil aldehid, dan sinamil alkohol
C6-C3	Koumarin, isokoumarin, dan kromon
C15	Flavan
C15	Flavon
C15	Flavanon
C15	Flavanonol
C15	Antosianidin
C15	Antosianin
C30	Biflavonil
C6-C1-C6-C6-C2-C6	Benzofenon, xanton, stilben
C6, C10, C14	Kuinon
C18	Betasianin
Lignan, neolignan	Dimer atau oligomer
Lignin	Polimer
Tanin	Oligomer atau polimer
Phlobaphene	Polimer

Sumber : Vermerris & Nicholson (2006)

Salah satu senyawa fenol yang ada pada kopi adalah asam klorogenat. Asam klorogenat merupakan metabolit sekunder terbesar pada biji kopi, yang merupakan senyawa ester dari trans-asam sinamat dan asam quinat yang mempunyai gugus hidroksil pada posisi aksial pada karbon 1 dan 3 dan hidroksil equatorial pada karbon 4 dan 5. Struktur kimia asam klorogenat dapat dilihat pada gambar 2.4. Secara umum asam klorogenat dibentuk dari asam kafeat, memiliki aktivitas antioksidan yang kuat secara *in vitro*. Kopi merupakan minuman harian yang paling banyak menyumbang asam klorogenat. Telah diteliti bahwa dalam 200 ml kopi arabika mengandung 70-200 mg asam klorogenat, sedangkan kopi robusta mengandung 70 - 350 mg asam klorogenat. Biji kopi yang tidak disangrai (*green coffee bean*) mengandung asam klorogenat sebesar 6-12 % (Clifford, 1999).



Gambar 2.4 Struktur kimia asam klorogenat (Tice, 1998)

2.3 Tinjauan Umum Radikal Bebas

Oksigen merupakan atom yang sangat reaktif sehingga mampu menjadi bagian dari molekul yang berpotensi menyebabkan kerusakan yang biasa disebut radikal bebas. Radikal bebas dapat menyerang sel-sel tubuh yang sehat, akibatnya sel-sel tersebut kehilangan struktur dan fungsinya (Percival, 1998). Radikal bebas adalah molekul dengan elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas sangat tidak stabil dan bereaksi cepat dengan senyawa lain serta berusaha menangkap elektron untuk memperoleh stabilitas (Sarma *et al.*, 2010). Secara teoritis, radikal bebas dapat terbentuk bila terjadi pemisahan ikatan kovalen. Radikal bebas dianggap berbahaya karena sangat reaktif dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya dan dapat terbentuk radikal bebas baru dari atom atau molekul yang elektronnya terambil untuk berpasangan dengan radikal bebas sebelumnya. Oleh karena sifatnya yang sangat reaktif dan gerakannya yang tidak beraturan, maka apabila terjadi di dalam tubuh makhluk hidup akan menimbulkan kerusakan di berbagai bagian sel (Muhilal, 1991).

Oksigen yang sangat reaktif dan oksidasi dari protein, lemak, dan unsur lain dalam tubuh akan menghasilkan radikal bebas ini. Selain itu, radikal bebas juga disebabkan oleh pengaruh lingkungan seperti produk samping dari industri plastik, ozon atmosfer, asap knalpot kendaraan, dan asap rokok. Kerusakan sel akibat radikal bebas tampaknya menjadi kontributor utama terjadi penuaan dan berbagai penyakit

degeneratif seperti kanker, penyakit jantung, katarak, penurunan sistem kekebalan tubuh, dan disfungsi otak (Percival, 1998 ; Tambayong, 2000).

Pembentukan radikal bebas dikendalikan secara alami oleh berbagai senyawa bermanfaat yang dikenal sebagai antioksidan. Apabila ketersediaan antioksidan terbatas, maka kerusakan ini dapat menjadi akumulatif dan melemahkan fungsi sel-sel tubuh. Pada serangan awal, radikal bebas dapat dinetralkan tetapi radikal bebas lain yang terbentuk dalam proses dapat menyebabkan terjadinya reaksi berantai (Percival, 1998).

2.4 Tinjauan Umum Antioksidan

Dalam pengertian kimia, senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donors*). Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa dihambat. Secara umum, antioksidan dikelompokkan menjadi dua, yaitu antioksidan enzimatis dan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis misalnya enzim *superoksida dismutase* (SOD), katalase, dan *glutathion peroksidase* (Winarsi, 2007 ; Percival, 1998). Menurut Winarsi (2007), antioksidan non-enzimatis masih dibagi dalam 2 kelompok yaitu :

- a. Antioksidan larut lemak, antara lain : tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, dan bilirubin.
- b. Antioksidan larut air, antara lain : asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme.

Antioksidan enzimatis dan non-enzimatis tersebut bekerja sama memerangi aktivitas senyawa oksidan dalam tubuh. Terjadinya stres oksidatif dapat dihambat oleh kerja enzim-enzim antioksidan dalam tubuh dan antioksidan non-enzimatis. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi 3 kelompok yaitu antioksidan primer, sekunder, dan tersier.

a. Antioksidan Primer (Antioksidan Endogenus)

Antioksidan primer meliputi enzim *superoksida dismutase* (SOD), katalase, dan *glutation peroksidase* (GSH-Px). Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatis. Suatu senyawa dikatakan antioksidan primer apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil.

Antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif. Sebagai antioksidan, enzim-enzim tersebut menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai kemudian mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil (Winarsi, 2007).

b. Antioksidan Sekunder (Antioksidan Eksogenus)

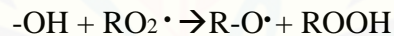
Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau non-enzimatis. Antioksidan dalam kelompok ini juga disebut pertahanan preventif. Dalam sistem pertahanan ini, terbentuknya senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkelatan metal atau dirusak pembentukannya. Pengkelatan metal terjadi dalam cairan ekstraseluler. Antioksidan non-enzimatis dapat berupa komponen non-nutrisi dan komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan. Kerja sistem antioksidan non-enzimatis yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya. Akibatnya radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Antioksidan sekunder berasal dari senyawa fenolik, seperti asam fenolik (asam kafeat dan asam galat), diterpen fenolik (asam karnosik dan asam karnosol), golongan flavonoid (flavonol, flavon dan flavanon) dan minyak volatil (eugenol dan thymol) (Brewer, 2011 ; Winarsi, 2007).

c. Antioksidan tersier

Kelompok antioksidan tersier meliputi sistem enzim *DNA-repair* dan *metionin sulfoksida reduktase*. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas (Winarsi, 2007)

Antioksidan yang berasal dari tubuh (endogen) tidak cukup untuk melawan radikal bebas di dalam tubuh. Oleh karena itu, setiap manusia membutuhkan tambahan asupan antioksidan dari luar tubuh sehingga mengurangi kapasitas radikal bebas untuk menimbulkan kerusakan (Soltani & Baharara, 2014).

Pada umumnya senyawa yang memiliki bioaktivitas sebagai antioksidan adalah senyawa golongan fenol yang memiliki gugus hidroksil yang tersubstitusi pada cincin benzena. Senyawa fenol menghambat radikal bebas dengan cara mendonorkan proton (atom hidrogen) ketika bereaksi dengan senyawa radikal sehingga proses oksidasi dihambat dan terbentuk radikal yang stabil. Terbentuknya radikal stabil ini dikarenakan elektron bebas yang terdapat pada radikal distabilkan oleh delokalisasi elektron dengan adanya resonansi pada cincin aromatik (Tursiman *et al.*, 2012). Salah satu radikal bebas yang distabilkan oleh fenol yaitu radikal peroksil. Gugus -OH akan menangkap radikal peroksil ($RO_2\cdot$) dan membentuk radikal fenoksil. Radikal fenoksil ($R-O\cdot$) cenderung kurang reaktif karena elektron terlokalisasi di dalam cincin aromatik (Halliwell, 2002). Reaksinya dapat dilihat sebagai berikut.



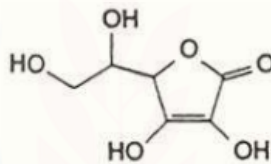
2.5 Tinjauan Umum Vitamin C

Vitamin C sangat penting bagi manusia karena memiliki fungsi penting sebagai kofaktor enzim dan antioksidan. Vitamin C membantu mempertahankan DNA, protein, lipid, enzim dan lainnya dalam keadaan normal. Hal ini dilakukan dengan mengikat oksigen dan nitrogen radikal dan mengurangi ion logam. Vitamin C bekerja sama dengan antioksidan lainnya seperti glutathion, asam lipoat, koenzim Q10, dan vitamin E untuk menjaga terus-menerus pasokan antioksidan yang dapat melindungi sel terhadap radikal bebas (Ge *et al.*, 2008).

Sebagai antioksidan, vitamin C bekerja sebagai donor elektron dengan cara memindahkan satu elektron ke senyawa logam Cu. Selain itu, vitamin C juga dapat menyumbangkan elektron ke dalam reaksi biokimia intraseluler dan ekstraseluler.

Vitamin C mampu menghilangkan senyawa oksigen reaktif di dalam sel netrofil, monosit, protein lensa, dan retina. Vitamin ini juga dapat berinteraksi dengan Fe-ferritin. Di luar sel vitamin C mampu menghilangkan senyawa oksigen reaktif, mencegah terjadinya LDL teroksidasi dan mengabsorpsi logam dalam saluran pencernaan (Winarsi, 2007).

Antioksidan vitamin C mampu bereaksi dengan radikal bebas, kemudian mengubahnya menjadi radikal askorbil. Senyawa radikal terakhir ini akan segera berubah menjadi askorbat dan dehidroaskorbat. Asam askorbat dapat bereaksi dengan oksigen teraktivasi seperti anion superoksida dan radikal hidroksil. Pada konsentrasi rendah, vitamin C dapat bereaksi dengan radikal hidroksil menjadi askorbil yang sedikit reaktif (Winarsi, 2007). Struktur dari vitamin C dapat dilihat pada gambar 2.5.

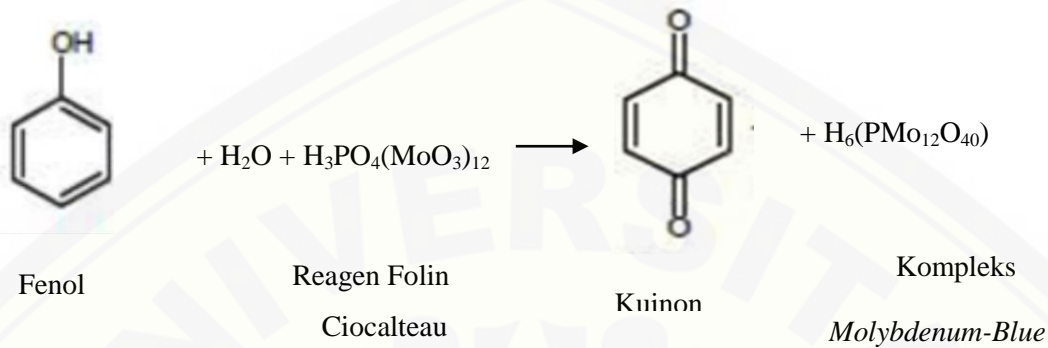


Gambar 2.5 Struktur kimia vitamin C (Hacisevki, 2009)

2.6 Tinjauan Umum Metode Folin Ciocalteu

Reaksi yang terjadi pada penetapan kadar fenol total adalah reaksi reduksi-oksidasi. Senyawa fenolik mereduksi fosfomolibdat-fosfotungstat dalam folin ciocalteu membentuk molibdenum yang berwarna biru (Tursiman *et al.*, 2012). Reaksi reagen folin ciocalteu dengan fenol dapat dilihat pada Gambar 2.6. Menurut Singleton & Rosi (1965) warna biru yang teramati berbanding lurus dengan konsentrasi ion fenolat yang terbentuk, semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang terbentuk sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat. Nely (2007) menyatakan bahwa penambahan Na_2CO_3 pada uji fenolik bertujuan untuk membentuk suasana basa agar terjadi reaksi reduksi Folin

oleh gugus hidroksil dari fenolik di dalam sampel. Metode ini mempunyai kelebihan diantaranya penampakan warna lebih baik (Rita, 2006).



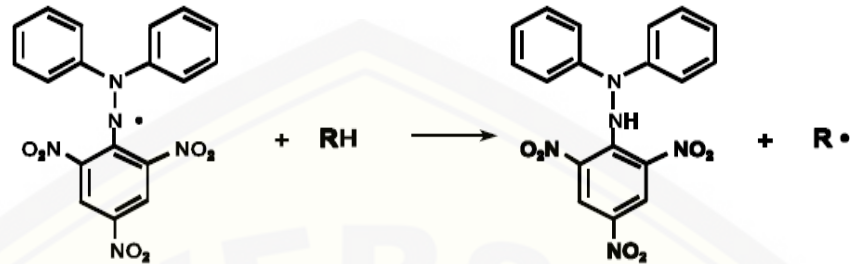
Gambar 2.6 Reaksi reagen folin ciocalteu dengan fenol (Tursiman, 2012)

2.7 Tinjauan Umum Metode Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara *in vivo*, *in vitro*, maupun *in silico*. Metode uji aktivitas antioksidan secara *in-vitro* ada beberapa macam diantaranya metode DPPH, metode ABTS, metode kapasitas serapan radikal oksigen (ORAC), metode FRAP, metode kekuatan pereduksi, metode xantin oksidase, metode aktivitas penghambatan radikal superoksida, metode aktivitas penghambat radikal hidroksil, metode aktivitas penghambatan nitrat oksida radikal, dan metode lipid peroksidasi mikrosomal.

2.7.1 Metode DPPH

Pada uji aktivitas penangkap radikal hidroksil *in vitro*, digunakan DPPH sebagai penghasil radikal hidroksil (Kim, 2002). DPPH dalam metode ini berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji, dimana DPPH akan ditangkap oleh antioksidan melalui donasi atom hidrogen dari antioksidan sehingga membentuk DPPH-H tereduksi (Molyneux, 2004). Reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.7 Reduksi DPPH dari senyawa peredam radikal bebas (Prakash *et al.*, 2001)

Reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan menimbulkan perubahan warna yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515-520 nm pada pelarut organik (metanol atau etanol) (Molyneux, 2004). Penambahan antioksidan dengan berbagai konsentrasi akan menghilangkan warna ungu secara bertahap menjadi kuning sesuai besarnya konsentrasi zat antioksidan. Persen penghambatan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi dari ekstrak (Dehpour *et al.*, 2009). Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Molyneux (2004), besarnya persentase peredaman DPPH ditentukan berdasarkan persamaan :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs X} - \text{Abs Y}}{\text{Abs X}} \times 100\% \dots\dots\dots (2.1)$$

Keterangan :

Abs X = Absorban serapan radikal DPPH kontrol pada panjang gelombang dengan absorbansi maksimum.

Abs Y = Absorban serapan sampel dalam radikal DPPH pada panjang gelombang dengan absorbansi maksimum.

Nilai % IC (*Inhibitor Concentration*) menunjukkan persen penangkapan DPPH oleh sampel uji. Aktivitas dihitung dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan penurunan konsentrasi larutan DPPH. Penurunan serapan tersebut dikarenakan oleh bereaksinya molekul *difenil pikrilhidrazil* (DPPH) dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh satu molekul

komponen bahan uji, sehingga terbentuk senyawa *difenil pikrihidrazin* yang berwarna kuning dan bersifat stabil (Molyneux, 2004).

IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50 %. IC₅₀ ini menunjukkan kekuatan antioksidan. Semakin kecil IC₅₀ maka semakin besar kekuatan antioksidan. Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH dapat dilihat pada tabel 2.2. IC₅₀ dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan persen penghambatan sebagai sumbu y dari persamaan $y = bx + a$, dapat dihitung nilai IC₅₀ dengan menggunakan rumus :

$$\text{Nilai IC}_{50} = (50 - A) : B \dots \dots \dots (2.2)$$

Tabel 2.2 Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH

Intensitas	Nilai IC ₅₀
Sangat aktif	< 50 ppm
Aktif	50-100 ppm
Sedang	101-150 ppm
Lemah	151-200 ppm

Sumber : Zuhra *et al.* (2008)

Kelebihan dari metode DPPH adalah secara teknis simpel, dapat dikerjakan dengan cepat dan hanya membutuhkan spektrofotometer UV-Vis (Karadag *et al.*, 2009). Menurut Prakash (2001), metode DPPH ini mudah digunakan, cepat, cukup teliti, dan baik digunakan dalam pelarut organik, khususnya alkohol. Kontrol positif yang sering digunakan yaitu asam askorbat (vitamin C) dan α -tokoferol (Molyneux, 2004).

2.7.2 Metode FRAP

FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) merupakan salah satu uji tercepat dan sangat berguna untuk analisis rutin. Aktivitas antioksidan diukur dengan mengukur peningkatan serapan yang disebabkan oleh pembentukan ion Fe²⁺ dari

pereaksi FRAP yang berisi TPTZ (2,4,6-tri-(2-pyridyl-s-triazine) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) serapannya diukur pada 595 nm (Shivaprasad *et al.*, 2005).

2.7.3 Metode ABTS

Metode peredaman radikal kation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ merupakan metode uji untuk mengukur kapasitas antioksidan yang secara langsung bereaksi atau meredam radikal kation ABTS yang dihasilkan dari reaksi kimia. $\text{ABTS}^{\bullet+}$ merupakan radikal dengan pusat nitrogen dengan karakteristik warna biru kehijauan yang ketika tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk nonradikal yang tidak berwarna. Metode ini berdasarkan penghambatan pembentukan kation radikal ABTS dengan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 734 nm dengan spektrofotometer (Antolovich *et al.*, 2001 ; Shivaprasad *et al.*, 2005).

2.7.4 Kapasitas Serapan Radikal Oksigen (ORAC)

ORAC merupakan metode analisis yang baru yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan makanan dan senyawa kimia lainnya. Metode ini mengukur kemampuan makanan, vitamin, suplemen nutrisi, atau bahan kimia lainnya untuk melindunginya terhadap radikal bebas, atau bertindak sebagai antioksidan. Uji ini dilakukan dengan menggunakan trolox (analog vitamin E) sebagai standar untuk menentukan trolox ekuivalen (TE). Nilai ORAC kemudian dihitung dari TE dan dinyatakan sebagai satuan atau nilai ORAC. Semakin tinggi nilai ORAC, semakin besar kekuatan nilai antioksidannya. Pengukuran ini berdasarkan pembentukan radikal bebas menggunakan AAPH (2,2-azobis-2-amido propane dihydrochloride) dan pengukuran penurunan dari fluoresensi dengan adanya penghambat radikal (Shivaprasad *et al.*, 2005).

2.7.5 Metode Aktivitas Penghambatan Radikal Hidroksil

Metode kapasitas penghambatan radikal hidroksil suatu ekstrak berhubungan langsung dengan aktivitas antioksidannya. Metode ini melibatkan pembentukan radikal hidroksil secara *in vitro* menggunakan Fe^{3+} /askorbat/EDTA/ H_2O_2 dengan menggunakan reaksi Fenton. Penghambatan radikal hidroksil dengan adanya antioksidan diukur. Pada salah satu metode radikal hidroksil yang dibentuk secara oksidasi dibuat untuk bereaksi dengan DMSO (dimethyl sulphoxyde), untuk menghasilkan formaldehida. Formaldehida yang terbentuk memberikan warna kuning intensif dengan pereaksi Nash (ammonium asetat 2 M dengan asam asetat 0,02 M dan asetil aseton 0,02 M dalam aquadest). Intensitas warna kuning yang terbentuk diukur secara spektroskopi pada panjang gelombang 412 nm, dibandingkan dengan blanko negatif. Aktivitas ini dinyatakan dengan penghambatan radikal hidroksil (Shivaprasad *et al.*, 2005).

2.7.6 Aktivitas Penghambatan Radikal Superoksida

Aktivitas peredaman radikal superoksida secara *in vitro* diukur dengan reduksi dari riboflavin/cahaya/NBT (Nitro biru tetrazolium) reduksi. Metode ini didasarkan pada pembentukan radikal superoksida secara auto-oksidasi dari riboflavin dengan adanya cahaya. Radikal superoksida mereduksi NBT menjadi formazon berwarna biru yang dapat diukur pada 560 nm. Kapasitas ekstrak untuk menghambat warna sampai 50% diukur sebagai EC_{50} (Shivaprasad *et al.*, 2005).

2.7.7 Metode Kekuatan Pereduksi

Prinsip metode ini yaitu peningkatan serapan dari reaksi pencampuran. Peningkatan serapan menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan. Pada metode ini campuran antioksidan membentuk kompleks berwarna dengan kalium ferisianida, trikloroasetat dan besi (III) klorida, yang diukur pada panjang gelombang 700 nm.

Peningkatan serapan dari reaksi menunjukkan penurunan kekuatan dari sampel (Shivaprasad *et al.*, 2005).

2.7.8 Lipid Peroksidasi Mikrosomal atau Uji Asam Tobarbiturat

Uji TBA salah satu uji yang sering dilakukan untuk mengukur peroksidasi lipid. Metode ini melibatkan isolasi mikrosom dari hati itkus dan induksi lipid peroksidasi dengan ion Fe^{3+} , menyebabkan produksi sejumlah kecil malonaldehida (MDA). TBA bereaksi dengan MDA membentuk kromagen merah muda, yang dapat dideteksi secara spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm (Shivaprasad *et al.*, 2005).

2.7.9 Metode Xantin Oksidase

Metode ini merupakan salah satu metode untuk mengukur aktivitas antioksidan. Adanya antioksidan diukur dari persentase inhibisi aktivitas xantin oksidase. Enzim xantin oksidase memproduksi asam urat dengan adanya radikal superoksida dari xantin dan jumlah dari asam urat diukur pada 292 nm (Shivaprasad *et al.*, 2005).

2.7.10 Aktivitas Penghambatan Nitrat Oksida Radikal

Nitrat oksida memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga diklasifikasikan sebagai radikal bebas dan menunjukkan reaktivitas yang penting dengan jenis tertentu dari protein dan radikal bebas lainnya. Penghambatan secara *in-vitro* dari radikal oksida nitrat juga diukur sebagai aktivitas antioksidan. Metode ini didasarkan pada inhibisi dari pembentukan radikal oksida nitrat yang dihasilkan dari natrium nitroprusid dalam dapar garam dan diukur dengan pereaksi Griess. Dengan adanya penghambatan, absorbansi dari kromofor diukur pada 546nm. Aktivitas ini menunjukkan sebagai % reduksi dari oksida nitrat (Shivaprasad *et al.*, 2005).

2.8 Tinjauan Umum Spektrofotometri UV-Vis

Metode pengukuran menggunakan prinsip spektrofotometri adalah berdasarkan absorpsi cahaya pada panjang gelombang tertentu melalui suatu larutan yang akan ditentukan konsentrasinya. Jika panjang gelombang yang digunakan adalah gelombang cahaya tampak maka disebut sebagai kolorimetri karena memberikan warna. Selain gelombang cahaya tampak, spektrofotometri juga menggunakan panjang gelombang pada gelombang ultraviolet dan inframerah. Prinsip kerja dari metode ini adalah jumlah cahaya yang diabsorpsi oleh larutan sebanding dengan konsentrasi kontaminan dalam pelarut (Lestari, 2009). Prinsip ini dijabarkan dalam Hukum *Lambert-Beer* yang menghubungkan antara absorbansi cahaya dengan konsentrasi pada suatu bahan yang mengabsorpsi, berdasarkan persamaan berikut:

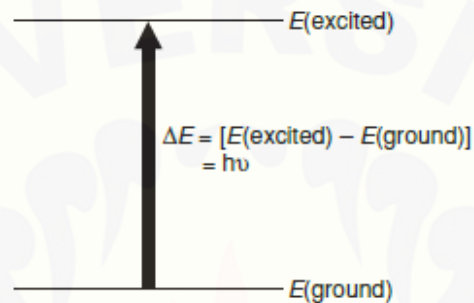
$$A = \log (I_{in}/I_{out}) = (1/T) = a.b.c.....(2.3)$$

Dimana :

- A = absorbansi
- I_{in} = intensitas cahaya yang masuk
- I_{out} = intensitas cahaya yang keluar
- T = transmittan
- a = tetapan absorpsivitas molar
- b = ketebalan sel
- c = konsentrasi pada suatu bahan yang mengabsorpsi

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190 - 380) dan sinar tampak (380 - 780) dengan memakai instrumen spektrofotometer (Mulja dan Suharman, 1995). Semua molekul dapat mengabsorpsi radiasi dalam daerah UV-tampak karena mereka mengandung elektron, baik sekutu ataupun menyendiri, yang dapat dieksitasikan ke tingkat energi yang lebih tinggi. Panjang gelombang di mana absorpsi itu terjadi, bergantung pada berapa kuat elektron itu terikat dalam molekul itu. Elektron dalam suatu ikatan kovalen tunggal terikat dengan kuat dan diperlukan

radiasi berenergi tinggi atau panjang gelombang pendek, untuk eksitasinya (Day & Underwood, 2002). Ketika sampel menyerap energi, atom atau molekul pada keadaan dasar (energi yang lebih rendah / *ground state*) akan menuju daerah dengan energi yang lebih tinggi (daerah tereksitasi / *excited state*). Gambar 2.7 menggambarkan proses eksitasi. Radiasi yang diserap memiliki nilai yang sama dengan perbedaan energi antara daerah tereksitasi dan daerah dasar (Pavia *et al.*, 2001).



Gambar 2.8. Proses Eksitasi (Pavia *et al.*, 2001)

Pelarut yang digunakan pada spektrofotometri UV-Vis tidak boleh menyerap radiasi ultraviolet pada daerah yang sama dengan spektrum substansi yang sedang ditentukan. Selain itu, senyawa yang dapat dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis harus memiliki gugus kromofor. Gugus kromofor terdiri dari gugus tidak jenuh kovalen atau memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Gugus kromofor mengabsorpsi sinar ultraviolet dan sinar tampak. Contoh dari kromofor adalah benzena. Substituen yang meningkatkan intensitas absorpsi disebut auksokrom. Substituen ini tidak mengalami penyerapan radiasi ultraviolet tetapi kehadirannya memodifikasi absorpsi kromofor. Auksokrom meliputi -OH, -OR, -X, atau -NH₂ (Pavia *et al.*, 2001).

Pengukuran absorbansi atau transmitansi dalam spektroskopi ultraviolet dan daerah tampak digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif spesies kimia (Khopkar, 2010). Analisis kuantitatif dilakukan dengan pembuatan kurva kalibrasi atau dengan menggunakan rumus *Lambert-Beer*. Jika absorbansi di plot terhadap konsentrasi, maka diperoleh garis lurus. Grafik ini dapat digunakan untuk

menentukan konsentrasi senyawa dalam sampel. Perubahan intensitas warna sebanding dengan konsentrasi (Lestari, 2009).

Alat yang digunakan untuk analisis spektrofotometri adalah spektrofotometer. Spektrofotometer sesuai dengan namanya adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Pada spektrofotometer, panjang gelombang yang benar-benar terseleksi dapat diperoleh dengan bantuan alat pengurai cahaya seperti prisma. Suatu spektrofotometer tersusun dari sumber spektrum tampak yang kontinu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blanko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blanko atau pembandingan (Khopkar, 2010).

a. Sumber Radiasi

Sumber yang biasa digunakan pada spektroskopi absorpsi adalah lampu wolfram. Arus cahaya tergantung pada tegangan lampu. Lampu hidrogen atau lampu deuterium digunakan untuk sumber pada daerah UV. Keباikan lampu wolfram adalah energi radiasi yang dibebaskan tidak bervariasi pada berbagai panjang gelombang. Untuk memperoleh tegangan yang stabil dapat digunakan transformator. Jika potensial tidak stabil akan didapatkan energi yang bervariasi (Khopkar, 2010).

b. Monokromator

Digunakan untuk sumber sinar yang monokromatis. Alatnya dapat berupa prisma atau grating. Untuk mengarahkan sinar monokromatis yang diinginkan dari hasil penguraian ini dapat digunakan celah. Jika celah posisinya tetap, maka prisma atau gratingnya yang dirotasikan untuk mendapatkan λ yang diinginkan. Ada dua tipe prisma yaitu susunan cornu dan susunan littrow (Khopkar, 2010).

c. Sel absorpsi

Pada pengukuran di daerah tampak, kuvet kaca atau kuvet kaca corex dapat digunakan, tetapi untuk pengukuran pada daerah UV harus menggunakan sel kuarsa karena gelas tidak tembus cahaya pada daerah ini. Umumnya tebal kuvet adalah 10 mm, tetapi yang lebih kecil atau lebih besar dapat digunakan. Sel yang biasa digunakan berbentuk persegi tetapi bentuk silinder dapat juga digunakan (Khopkar, 2010).

d. Detektor

Peranan detektor adalah memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang. Macam-macam deteksi yang telah digunakan paling meluas didasarkan pada perubahan fotokimia (terutama fotografi), efek fotolistrik, dan efek termolistrik. Secara umum detektor fotolistrik digunakan dalam daerah tampak dan ultraviolet (Khopkar, 2010 ; Day & Underwood, 2002).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Laboratorium Kimia, Fakultas Farmasi, Universitas Jember mulai dari ekstraksi hingga analisis sampel. Waktu pelaksanaannya mulai Agustus 2014 sampai dengan April 2015.

3.2 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *True Experimental Laboratories*.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah spesies dan umur daun kopi yang digunakan.

3.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar fenol total dan aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kopi.

3.3.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah cara ekstraksi, cara penetapan kadar fenol total, dan cara pengujian aktivitas antioksidan.

3.4 Definisi Operasional

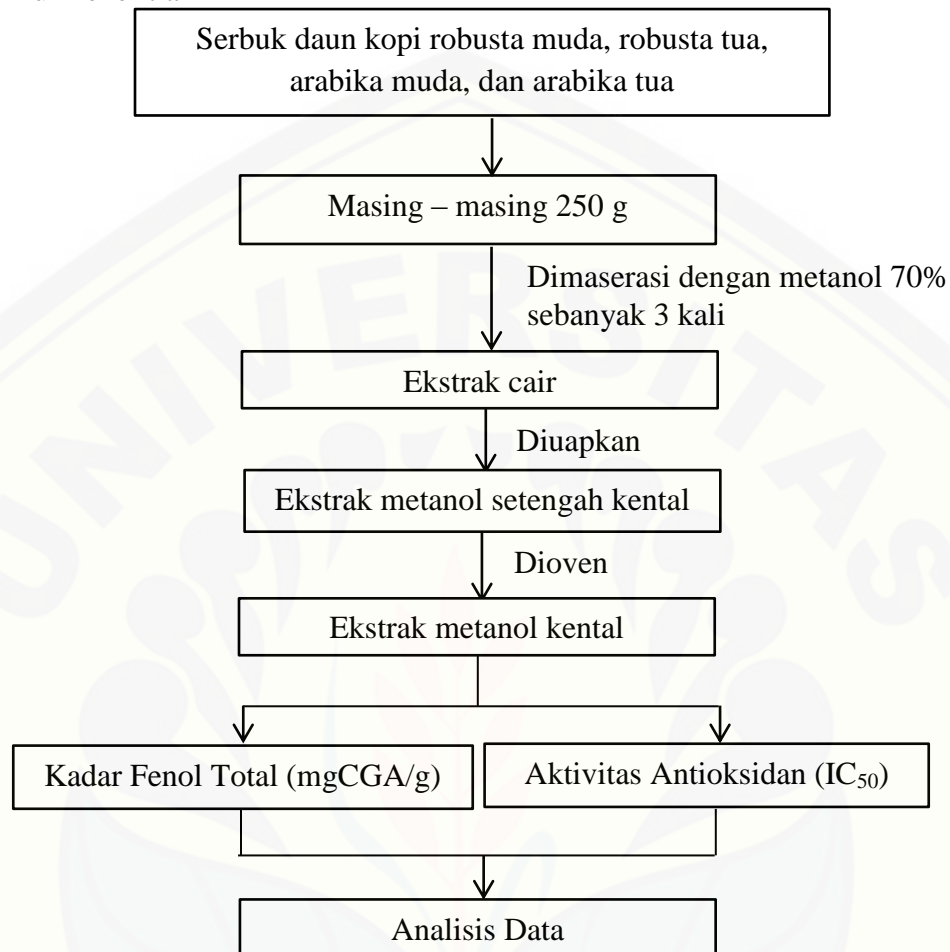
- a. Ekstrak metanol adalah ekstrak yang diperoleh dari simplisia yang diserbuk kemudian diekstraksi secara remaserasi dengan metanol 70%.
- b. Aktivitas antioksidan adalah kemampuan suatu senyawa untuk meredam DPPH yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} .
- c. Daun muda adalah daun yang berwarna hijau terang dan teksturnya lembut yang tumbuh pada cabang *plagiotrop* yang terletak di bagian tengah pohon kopi.
- d. Daun muda terletak pada pasangan pertama daun kopi. Daun tua adalah daun yang berwarna hijau tua dan teksturnya kasar yang tumbuh pada cabang *plagiotrop* yang terletak di bagian tengah pohon kopi.

3.5 Rancangan Penelitian

3.5.1 Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini dilakukan penetapan dan perbandingan kadar fenol total dan aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, dan arabika tua. Tahap pertama dilakukan ekstraksi sampel untuk memperoleh ekstrak kental. Selanjutnya dilakukan penetapan kadar fenol total dari ekstrak kental yang didapat dari masing-masing daun. Setelah penetapan fenol total, dilakukan penetapan aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, arabika tua, dan vitamin C. Hasil kadar fenol total dibandingkan antara ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, dan arabika tua. Selain itu, hasil aktivitas antioksidan juga dibandingkan antara keempat ekstrak dan vitamin C. Selanjutnya dilakukan uji statistik dengan one way anova dan dilanjutkan dengan *post hoc* (LSD).

3.5.2 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.6 Bahan dan Alat

3.6.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kopi arabika dan robusta masing masing daun tua dan daun muda yang berasal dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, metanol 70%, metanol p.a (Sigma-Aldrich), standar asam klorogenat (sigma-aldrich), vitamin C *pharmaceutical grade* (99,8 %), DPPH (sigma-aldrich), larutan folin ciocalteau (merck), Na₂CO₃ 20% (teknis), alumunium foil, dan akuades.

3.6.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain spektrofotometer Hitachi U-1800, *rotary evaporator*, gunting, penghalus serbuk, ayakan B-40, oven, cawan penguap, maserator, gelas ekstrak, botol timbang, corong gelas, botol ekstrak cair, timbangan analitik sartorius, *freezer*, kulkas, spatula, kuvet plastik, *ultrasonic cleaner*, labu ukur (10 ml, 25 ml, dan 50 ml), *beaker glass* (50 ml dan 100 ml), mikropipet, gelas ukur, *ball filler*, pipet tetes, pipet volume (0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, dan 15 ml), vial, dan *stopwatch*.

3.7 Ekstraksi Bahan

Daun kopi arabika dan robusta segar ditimbang masing-masing sebanyak 1 kg. Daun segar dicuci dengan air mengalir, disortasi, dipotong kecil-kecil, dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam ruangan, tidak terkena sinar matahari langsung selama 3 hari. Daun yang telah diangin-anginkan dimasukkan ke dalam oven suhu 40°C-46°C untuk pengeringan akhir. Simplisia dihaluskan dengan cara digiling menggunakan penghalus serbuk dan diayak menggunakan ayakan B-40.

Sebanyak 250 gram serbuk masing-masing daun kopi dalam keadaan kering dimaserasi dalam maserator dengan 1,75 liter metanol 70 % selama 24 jam. Selama 6 jam pertama, campuran diaduk dengan batang pengaduk. Ekstrak cair disaring dengan kertas saring. Maserasi dan penyaringan diulang 3 kali dengan cara yang sama. Hasil maserasi diuapkan dengan *rotary evaporator* suhu 50°C dan hasilnya dipekatan dalam oven untuk memperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang untuk perhitungan rendemen. Ekstrak ini disimpan dalam lemari pendingin untuk analisis selanjutnya.

3.8 Penetapan Kadar Fenol Total

3.8.1 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak

Ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, dan arabika tua ditimbang masing-masing sebanyak 25 mg. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan metanol p.a sampai batas volume sehingga konsentrasi larutan uji ekstrak 1000 µg/ml.

3.8.2 Pembuatan Larutan Baku Asam Klorogenat

Standar asam klorogenat ditimbang sebanyak 25 mg, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan metanol p.a sampai batas volume sehingga konsentrasi larutan induk standar asam klorogenat yaitu 1000 µg/ml. Selanjutnya dilakukan pengenceran larutan induk asam klorogenat dengan memipet sejumlah tertentu larutan induk, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambahkan metanol p.a sejumlah tertentu sehingga konsentrasi larutan standar asam klorogenat akhir yaitu 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml, 250 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, dan 600 µg/ml.

3.8.3 Penetapan Kadar

Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan cara 100 µl dari masing-masing larutan uji ekstrak dan larutan standar ditambah dengan 1,2 ml akuades. Selanjutnya ditambah dengan 100 µl reagen Folin-Ciocalteu dan didiamkan selama 5 menit. Setelah 5 menit, ditambahkan 300 µl Na₂CO₃ 20% dan 300 µl akuades. Campuran ini didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 743 nm.

3.8.4 Perhitungan

Nilai absorbansi yang diperoleh dari masing-masing konsentrasi larutan ekstrak dimasukkan ke dalam persamaan regresi larutan standar asam klorogenat sehingga

diperoleh kadar fenol total yang ditunjukkan dengan miligram asam klorogenat ekuivalen per gram ekstrak (mg CAE/g ekstrak).

3.9 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

3.9.1 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak

Ekstrak metanol daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, dan arabika tua ditimbang sebanyak 25 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan metanol p.a sampai batas volume sehingga konsentrasi larutan uji ekstrak 1000 $\mu\text{g/ml}$. Larutan dipipet, dimasukkan labu ukur dan ditambahkan metanol p.a sejumlah tertentu sehingga konsentrasi larutan uji ekstrak akhir untuk ekstrak metanol daun kopi robusta dan arabika tua yaitu 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, dan 60 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan konsentrasi akhir untuk ekstrak metanol daun kopi robusta dan arabika muda yaitu 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, dan 120 $\mu\text{g/ml}$.

3.9.2 Pembuatan Larutan Vitamin C

Sesuai sertifikat analisis, vitamin C yang digunakan memiliki kemurnian 99,8%. Sertifikat analisis dapat dilihat di Lampiran R. Vitamin C ditimbang sebanyak 25 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml dan dilarutkan dengan metanol p.a sampai batas volume sehingga konsentrasi vitamin C sebesar 998 $\mu\text{g/ml}$. Larutan dipipet, dimasukkan labu ukur ditambahkan metanol p.a sejumlah tertentu sehingga konsentrasi larutan vitamin C akhir yaitu 4,99 $\mu\text{g/ml}$; 9,98 $\mu\text{g/ml}$; 14,97 $\mu\text{g/ml}$; 19,96 $\mu\text{g/ml}$; 24,95 $\mu\text{g/ml}$; dan 29,94 $\mu\text{g/ml}$.

3.9.3 Pembuatan Larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 10 mg, dilarutkan dalam 10 ml metanol sehingga didapatkan larutan induk DPPH dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya diencerkan dengan memipet 2 ml larutan induk dan ditambahkan metanol

p.a ad 50 ml sehingga diperoleh konsentrasi 0,1 mM. Larutan ini kemudian disimpan dalam botol gelap dan untuk setiap pengujian dibuat baru.

3.9.4 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Sebelum pengujian aktivitas antioksidan dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum yaitu dengan mengambil 1,2 ml larutan DPPH 0,1 mM. Kemudian menambahkan 0,3 ml metanol p.a. Campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit pada tempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 400 – 600 nm.

3.9.5 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Larutan Uji Ekstrak dan Vitamin C

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara 0,3 ml dari masing-masing larutan uji ekstrak dan larutan vitamin C, ditambahkan 1,2 ml DPPH 0,1 mM. Campuran dikocok sampai homogen kemudian larutan uji dan larutan vitamin C diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya, diukur serapannya pada panjang gelombang 515 nm.

3.9.6 Perhitungan

Nilai IC_{50} dihitung berdasarkan persentase peredaman terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel mengikuti persamaan 2.1 yang telah dijelaskan sebelumnya. Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier menggunakan persamaan:

$$y = a + bx \dots\dots\dots(3.1)$$

Keterangan:

x = konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)

y = persentase peredaman (%)

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% atau IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50.

3.10 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penetapan kadar fenol total dibandingkan antara daun kopi robusta muda, robusta tua, arabika muda, dan arabika tua. Selain itu, data yang diperoleh dari penetapan aktivitas antioksidan juga dibandingkan antara keempat ekstrak dan vitamin C. Selanjutnya dilakukan uji statistik kadar fenol total dan aktivitas antioksidan menggunakan one way anova dan dilanjutkan dengan *post hoc* (LSD). Perbedaan dianggap bermakna apabila $p\text{-value} \leq 0,05$ dengan tingkat kepercayaan sebesar 95%.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Bahan

Tahap pertama dalam proses ekstraksi daun kopi yaitu dengan melakukan sortasi basah masing-masing daun kopi. Sortasi basah dilakukan untuk menghilangkan daun yang tidak sesuai. Selanjutnya dilakukan pencucian daun kopi. Pencucian bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun. Setelah dicuci, dilakukan perajangan, pengeringan, dan penghalusan masing-masing daun kopi. Proses pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air di dalam simplisia sehingga akan mudah untuk dilakukan proses penghalusan serbuk. Pengeringan ini tidak dilakukan di bawah matahari langsung. Hal ini bertujuan agar kandungan kimia yang terdapat pada simplisia tidak rusak akibat pemanasan. Setelah kering, dilakukan penghalusan. Proses ini bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel sehingga akan mempercepat kelarutan senyawa ke dalam pelarut.

Ekstraksi dilakukan dengan cara remaserasi yaitu dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah penyaringan maserat pertama dan seterusnya (Depkes RI, 2000). Remaserasi dapat menarik senyawa aktif yang lebih banyak karena senyawa aktif yang tertinggal dari penyaringan maserat akan diekstraksi kembali oleh pelarut yang baru. Oleh sebab itu, metode remaserasi dipilih untuk ekstraksi bahan. Ekstraksi didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harbone, 1987). Masing-masing serbuk daun kopi ditimbang kurang lebih sebanyak 250 gram. Selanjutnya, serbuk dimaserasi sebanyak 3 kali menggunakan metanol 70 % dengan perbandingan ekstrak dan jumlah metanol yang digunakan adalah 1 : 7. Pelarut metanol 70 % memiliki sifat polar berguna untuk menarik senyawa-senyawa polar seperti senyawa golongan fenol (Przybylski *et al.*,

2001). Rendemen ekstrak yang didapat dihitung. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran B. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (Depkes RI, 2000). Persen rendemen ekstrak hasil ekstraksi yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4.1. Hasil ekstraksi daun kopi

Sampel	Bobot Serbuk	Bobot Ekstrak	% Rendemen
Ekstrak metanol daun kopi robusta muda	251,32 gram	37,91 gram	15,084 %
Ekstrak metanol daun kopi robusta tua	250,96 gram	42,99 gram	17,130%
Ekstrak metanol daun kopi arabika muda	250,96 gram	40,31 gram	16,062%
Ekstrak metanol daun kopi arabika tua	250,57 gram	46,90 gram	18,717%

% Rendemen merupakan perbandingan berat ekstrak/berat simplisia serbuk x100%

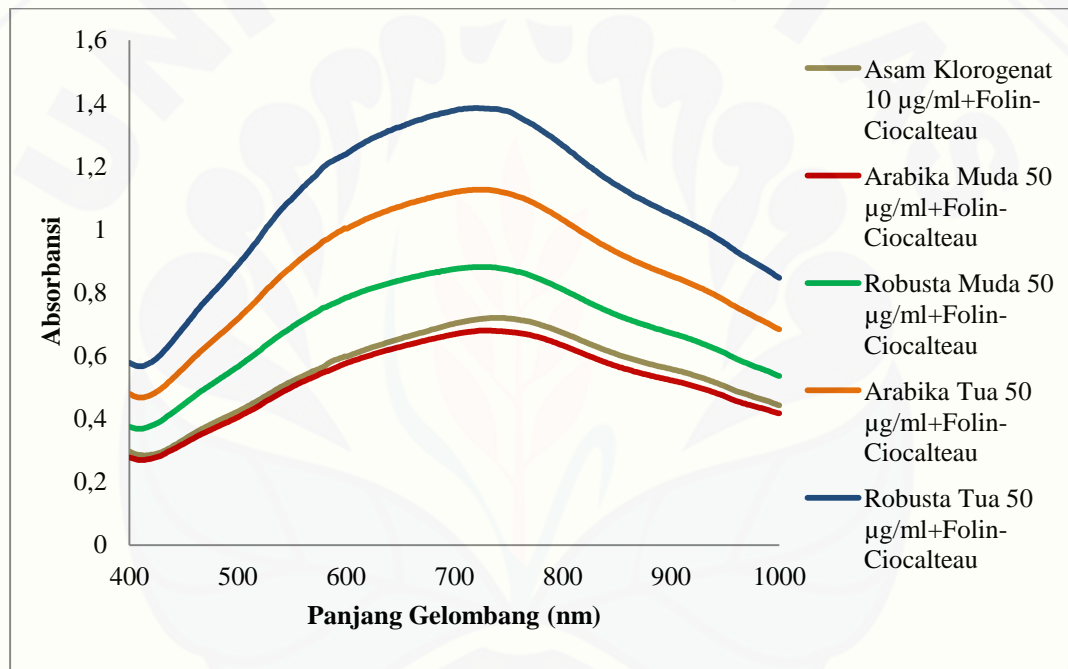
Hasil ekstraksi tersebut menyatakan bahwa persen rendemen yang paling besar yaitu ekstrak metanol daun kopi arabika tua, dilanjutkan dengan ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika muda, dan robusta muda. Perbedaan persen rendemen dari keempat ekstrak daun kopi terjadi karena perbedaan umur dan spesies daun yang diekstraksi. Perbedaan umur dan spesies daun ini diduga menyebabkan perbedaan jumlah kandungan senyawa yang terdapat di dalam ekstrak sehingga jumlah rendemen ekstrak yang dihasilkan juga berbeda.

4.2 Penetapan Kadar Fenol Total

4.2.1 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

Sebelum dilakukan penetapan kadar fenol total, dilakukan scanning panjang gelombang maksimum. Pengukuran panjang gelombang maksimum ini dilakukan dengan mengukur absorbansi sampel dan standar setelah direaksikan dengan Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3 20 %, dan akuades. Asam klorogenat yang digunakan pada pengukuran memiliki konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$ karena pada konsentrasi tersebut

menghasilkan absorbansi yang tidak terlalu tinggi maupun terlalu rendah. Konsentrasi ekstrak yang digunakan masing-masing 50 $\mu\text{g/ml}$ karena konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi yang digunakan untuk penetapan kadar fenol total. Panjang gelombang maksimum terpilih dari hasil scanning adalah 743 nm karena pada panjang gelombang tersebut menghasilkan absorbansi yang maksimum. Hasil scanning panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Lampiran J.1 dan Gambar 4.1. Panjang gelombang terpilih ini digunakan untuk pengukuran kadar fenol total.

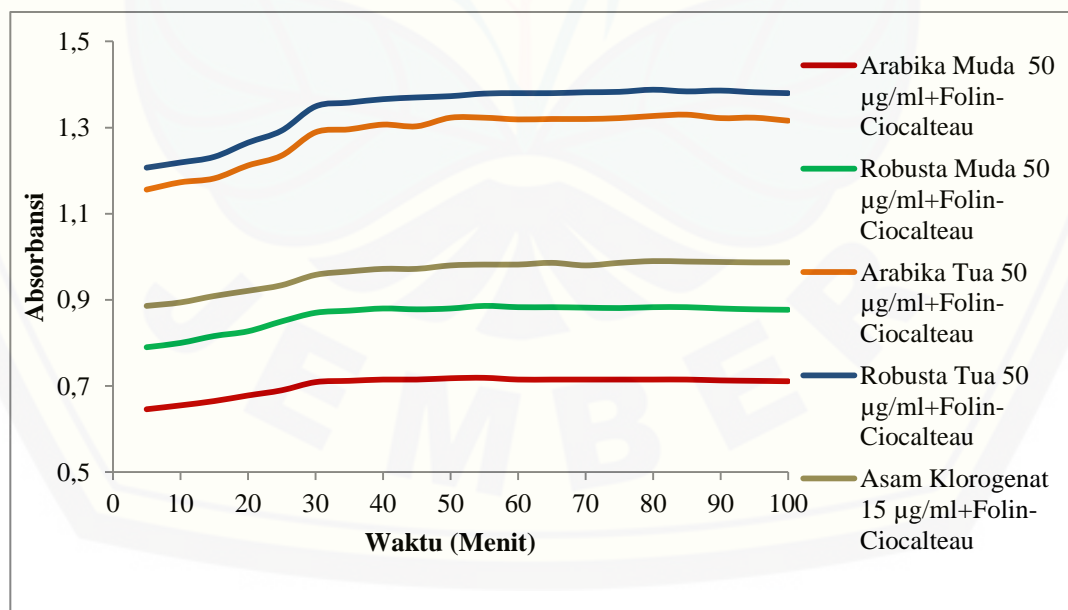


Gambar 4.1 Spektra panjang gelombang penetapan kadar fenol total

4.2.2 Penentuan Waktu Inkubasi

Tujuan penentuan waktu inkubasi ini yaitu memilih waktu inkubasi optimum untuk sampel bereaksi dengan Folin-Ciocalteu secara sempurna. Larutan uji ekstrak dan standar asam klorogenat direaksikan dengan Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3 20 %, dan akuades. Selanjutnya diamati absorbansinya pada panjang gelombang 743 nm mulai

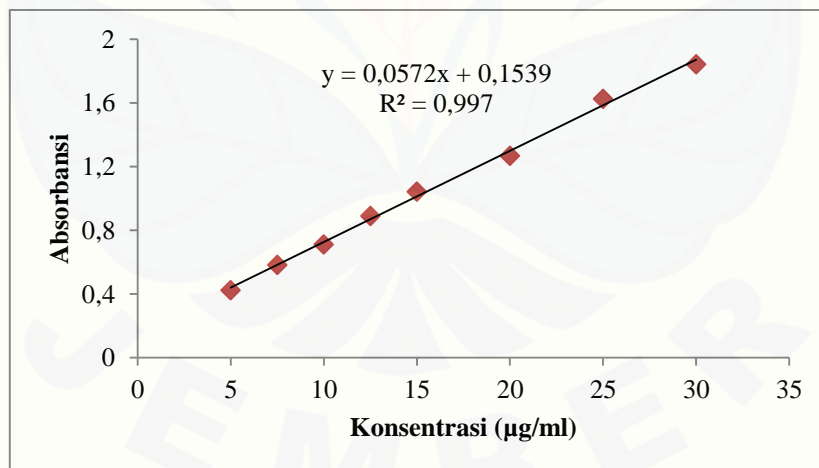
menit ke-0 sampai menit ke-100 dengan selang waktu 5 menit. Asam klorogenat yang digunakan memiliki konsentrasi 15 $\mu\text{g/ml}$ karena pada konsentrasi tersebut absorbansi yang dihasilkan berada di tengah dari absorbansi keempat ekstrak metanol. Konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk penentuan waktu inkubasi masing-masing 50 $\mu\text{g/ml}$ karena konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi yang digunakan untuk penetapan kadar fenol total. Waktu reaksi dikatakan optimum jika tidak ada peningkatan absorbansi yang signifikan dari sampel maupun pembanding setelah direaksikan yang menandakan bahwa reaksi telah berhenti. Dari hasil penentuan waktu inkubasi, diketahui bahwa pada menit ke-30 reaksi telah optimal yang ditandai dengan absorbansi yang dihasilkan tidak berubah secara signifikan. Waktu 30 menit tersebut merupakan waktu inkubasi minimum yang dapat digunakan. Namun, pada penetapan kadar fenol total selanjutnya digunakan waktu inkubasi 60 menit. Waktu inkubasi 60 menit digunakan dengan tujuan untuk memastikan bahwa reaksi benar-benar telah berhenti dan mempermudah dalam pengerjaannya. Tabel waktu (menit) dan absorbansi yang dihasilkan dapat dilihat pada Lampiran N. Hubungan waktu inkubasi dan absorbansi dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hubungan waktu dan absorbansi penetapan kadar fenol total

4.2.3 Penetapan Kadar

Penetapan kadar dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan kerja asam klorogenat yang telah direaksikan pada panjang gelombang 743 nm. Nilai absorbansi yang didapatkan diplotkan dengan konsentrasi sehingga didapatkan kurva kalibrasi standar asam klorogenat $y = 0,0572x + 0,1539$, dengan y merupakan nilai absorbansi dan x merupakan konsentrasi asam klorogenat. Konsentrasi asam klorogenat dan absorbansi yang dihasilkan dapat dilihat pada Lampiran J.2. Kurva standar asam klorogenat yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 4.3. Asam klorogenat dipilih sebagai standar dalam penetapan kadar fenol total karena senyawa ini banyak ditemukan pada tumbuhan kopi terutama bijinya yang kemungkinan besar senyawa ini juga ditemukan pada bagian daunnya. Selain itu, pemilihan asam klorogenat ini juga mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Perez-Hernandez (2012) yaitu penetapan kadar fenol total pada biji kopi arabika dan robusta dengan menggunakan standar asam klorogenat.



Gambar 4.3 Kurva standar asam klorogenat

Penetapan kadar fenol total ekstrak metanol daun kopi dilakukan dengan mengukur absorbansi larutan uji ekstrak metanol daun kopi keempat ekstrak yang

telah direaksikan seperti standar asam klorogenat. Selanjutnya, nilai absorbansi yang diperoleh dimasukkan ke dalam kurva kalibrasi standar asam klorogenat $y = 0,0572x + 0,1539$. Kadar fenol total dalam sampel ditunjukkan dengan miligram ekuivalen asam klorogenat per gram ekstrak (mg CAE/g ekstrak). Perhitungan kadar fenol total dapat dilihat pada lampiran O. Hasil pengukuran kadar fenol total dari yang terbesar hingga terkecil dapat dilihat pada Tabel 4.2

Tabel 4.2. Hasil penetapan kadar fenol total ekstrak metanol daun kopi

Sampel	Kadar Fenol Total (mg CGA/g ekstrak, n=3)
Ekstrak metanol daun kopi robusta tua	399,403±0,559 ^a
Ekstrak metanol daun kopi arabika tua	354,307±1,204 ^b
Ekstrak metanol daun kopi robusta muda	244,232±1,761 ^c
Ekstrak metanol daun kopi arabika muda	190,916±1,715 ^d

Keterangan : Data disajikan dalam rata-rata ± SD, notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna antar sampel ($p < 0,05$).

Tabel tersebut menunjukkan bahwa urutan kadar fenol total dari yang terbesar yaitu ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta muda, dan arabika muda. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa berdasarkan umurnya, kadar fenol total lebih banyak pada ekstrak metanol daun kopi tua dibandingkan daun muda pada kedua spesies daun kopi. Hasil ini sesuai dengan penelitian Achakzai *et al.*, (2009) yang meneliti kandungan senyawa fenol pada daun tua dan muda dari 8 spesies tanaman yang berbeda. Hasil penelitian yaitu rata-rata kandungan senyawa fenol pada daun tua lebih besar dibandingkan daun muda. Hal ini dikarenakan pada daun tua membutuhkan pertahanan hidup yang lebih besar dari pengaruh lingkungan sehingga membutuhkan banyak metabolit sekunder. Sedangkan pada daun muda membutuhkan banyak nutrisi untuk tumbuh dan melangsungkan berbagai proses metabolik penting sehingga lebih banyak metabolit primer.

Persen rendemen yang besar tidak diikuti kadar fenol total yang semakin besar pula. Ekstrak metanol daun kopi arabika memiliki persen rendemen yang lebih besar, namun kadar fenol totalnya lebih rendah dibandingkan arabika. Hal ini terjadi karena diduga banyak senyawa lain yang ada di dalam ekstrak metanol daun kopi arabika selain senyawa fenol.

Berdasarkan spesiesnya, ekstrak metanol daun kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki kadar fenol total yang lebih besar dibandingkan ekstrak metanol daun kopi arabika (*Coffea arabica*) pada daun tua maupun daun muda. Perez-Hernandes *et al.*, (2012) meneliti kadar fenol total pada biji kopi robusta dan arabika. Hasil penelitian tersebut diketahui bahwa biji kopi robusta (*Coffea canephora*) mengandung kadar fenol total yang lebih tinggi daripada biji kopi arabika (*Coffea Arabica*). Kadar fenol total yang tinggi pada bijinya ternyata juga terjadi pada daunnya. Hal ini diduga karena daun dan biji yang terletak pada spesies yang sama memiliki kandungan senyawa yang sama.

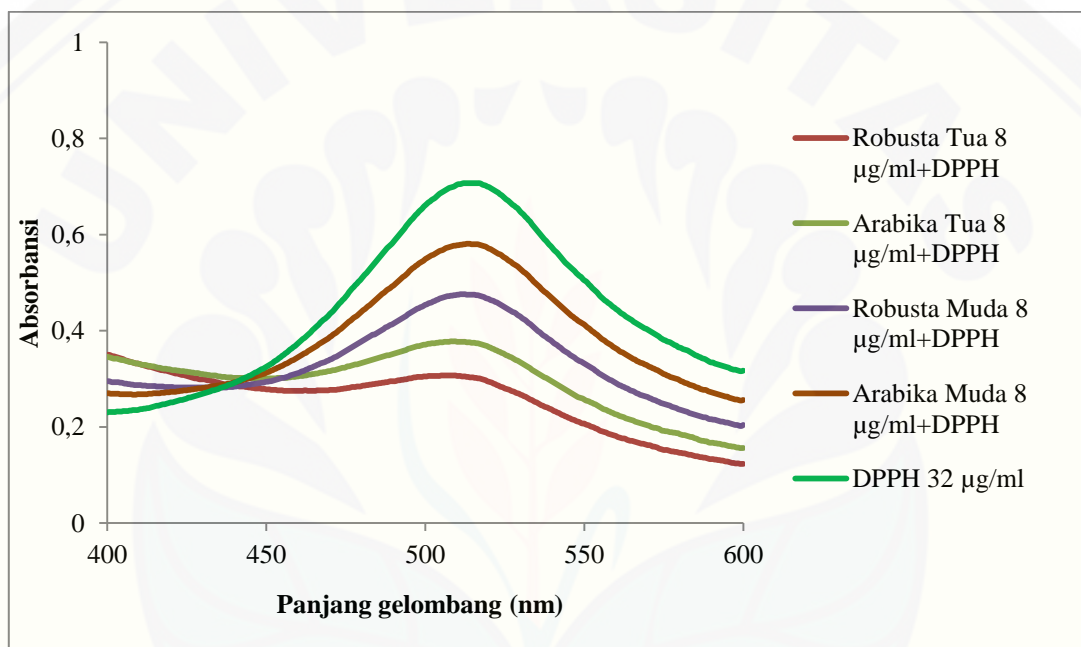
Hasil uji anova untuk kadar fenol total menunjukkan bahwa signifikansi atau nilai p (*p-value*) adalah 0,000. Nilai p yang diperoleh $< 0,05$ sehingga dapat dikatakan bahwa terdapat perbedaan bermakna kadar fenol total ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta muda, dan arabika muda. Selanjutnya dilakukan uji LSD (*Least Significanse Different*) untuk melihat sampel mana yang memiliki perbedaan yang bermakna. Signifikansi atau nilai p pada uji LSD $< 0,05$ pada setiap sampel yang menunjukkan bahwa kadar fenol total dari setiap sampel berbeda secara bermakna. Hasil uji anova dan *post hoc* (LSD) kadar fenol total dapat dilihat pada Lampiran Q.1.

4.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

4.3.1 Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

Adanya aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan penurunan absorbansi larutan DPPH karena adanya perubahan warna dari ungu menjadi kuning. DPPH

berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari bahan uji. DPPH akan ditangkap oleh antioksidan melalui donasi atom hidrogen dari antioksidan sehingga membentuk DPPH-H tereduksi. Panjang gelombang maksimum terpilih DPPH adalah 515 nm karena menghasilkan absorbansi yang maksimum. Menurut Molyneux (2004) panjang gelombang penetapan aktivitas antioksidan metode DPPH yaitu 515-520 nm. Hasil penetapan panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Lampiran D.1 dan Gambar 4.4.

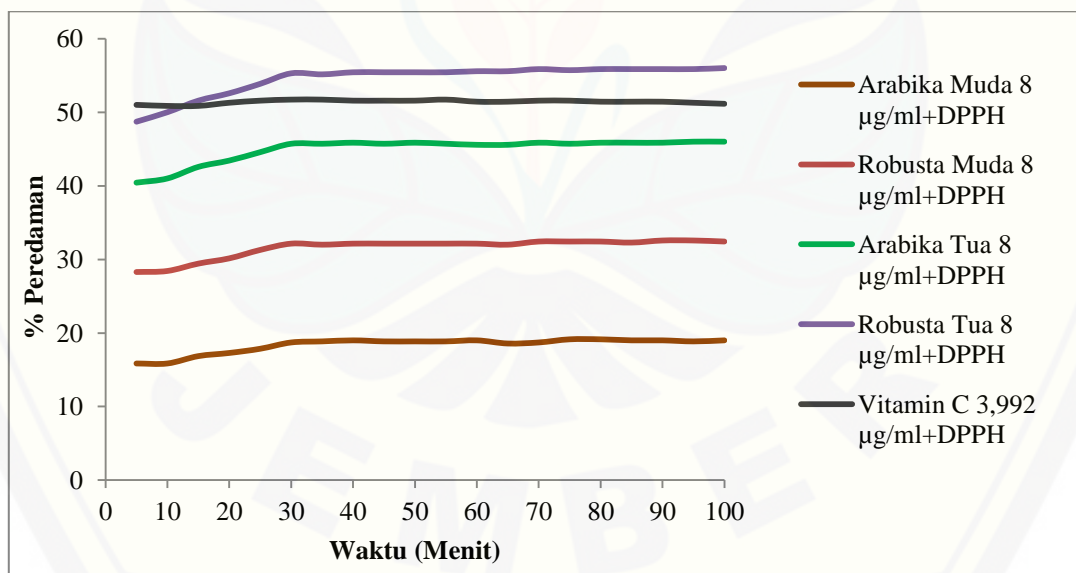


Gambar 4.4 Spektra panjang gelombang pengaruh pemberian larutan uji dan pembanding

Pada penetapan panjang gelombang maksimum di atas digunakan konsentrasi dari keempat ekstrak 8 µg/ml karena konsentrasi ini merupakan konsentrasi penetapan DPPH yang digunakan pada keempat ekstrak (mewakili keempat ekstrak). Apabila konsentrasi yang digunakan sama maka akan lebih mudah untuk melihat penurunan absorbansi setelah DPPH ditambahkan ekstrak. Hasil pada gambar menunjukkan penurunan absorbansi setelah DPPH ditambahkan ekstrak. Penurunan absorbansi terbesar yaitu DPPH yang ditambahkan ekstrak metanol daun kopi robusta tua, diikuti dengan arabika tua, robusta muda, dan arabika muda.

4.3.2 Penentuan Waktu Inkubasi

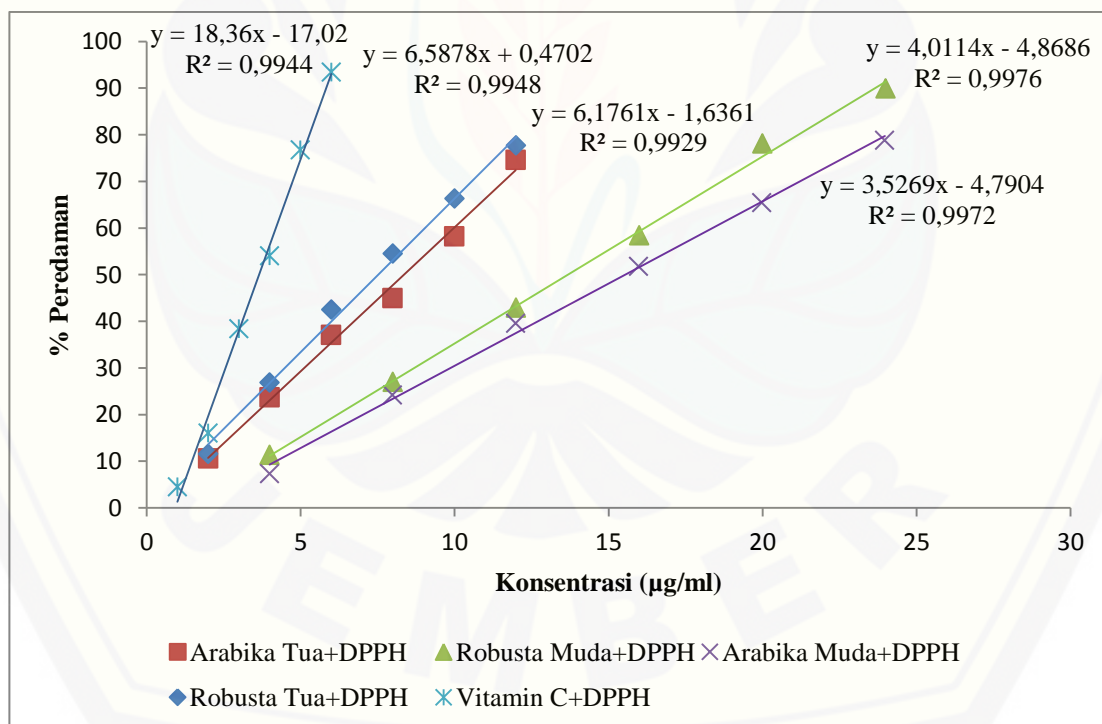
Penentuan waktu inkubasi dilakukan untuk mendapatkan waktu inkubasi optimum sampel dan pembanding. Waktu inkubasi optimum menandakan bahwa masing-masing sampel atau pembanding telah bereaksi sempurna dengan DPPH. Larutan uji ekstrak dan pembanding (vitamin C) direaksikan dengan larutan DPPH dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm mulai menit ke-0 sampai menit ke-100 dengan selang waktu 5 menit. Waktu reaksi dikatakan optimum jika reaksi terjadi telah membentuk plateau (Molyneux, 2004). Waktu inkubasi yang didapatkan dari hasil optimasi yaitu menit ke-30. Pada waktu 30 menit ini, masing-masing ekstrak atau vitamin C (pembanding) bereaksi optimal dengan DPPH yang ditandai dengan absorbansi yang tidak mengalami penurunan atau persen peredaman yang tidak mengalami peningkatan. Tabel waktu (menit) dan % peredaman yang dihasilkan dapat dilihat pada Lampiran G.2. Hubungan waktu dan persen peredaman dapat dilihat pada Gambar 4.5



Gambar 4.5 Hubungan waktu terhadap persen peredaman DPPH

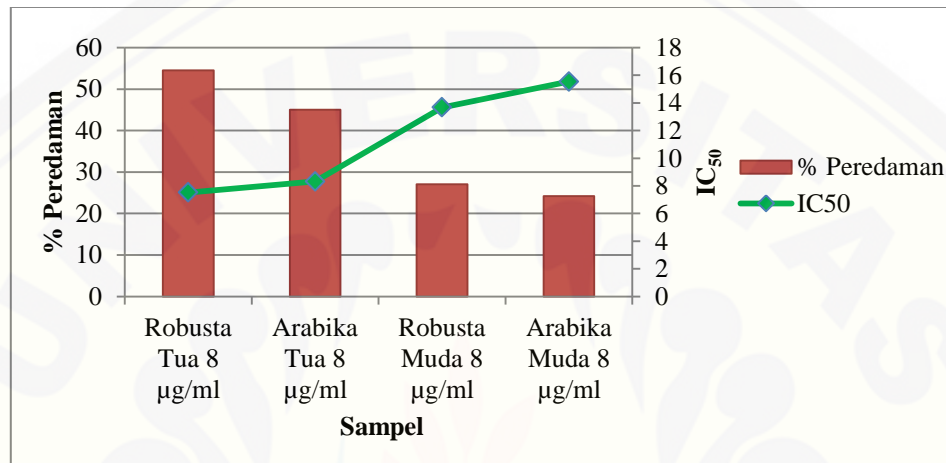
4.3.3 Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Pengukuran dilakukan dengan mereaksikan 1,2 ml larutan DPPH 0,1 mM dengan 0,3 ml larutan uji sehingga akan diperoleh persen peredaman radikal bebas. Konsentrasi ekstrak maupun pembanding setelah direaksikan diplotkan dengan persen peredaman. Selanjutnya akan didapatkan nilai IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi efektif yang dapat meredam radikal bebas DPPH sebesar 50 persen. Hasil regresi linier menunjukkan adanya korelasi yang baik antara konsentrasi larutan uji dengan persen peredaman DPPH. Hal ini ditunjukkan dengan nilai r yang mendekati 1 dan semua nilai r hitung sampel uji dan pembanding $> r$ tabel dengan signifikansi 0,05. Persamaan y dan nilai R^2 yang diperoleh dari keempat sampel dan pembanding dari ketiga replikasi dapat dilihat pada Lampiran H. Hubungan konsentrasi dengan rata-rata persen peredaman DPPH ekstrak metanol daun kopi dapat dilihat pada gambar 4.6



Gambar 4. 6 Hubungan konsentrasi dengan persen peredaman DPPH (rata-rata±SD, n=3)

Semakin besar persen peredaman DPPH ekstrak metanol daun kopi maka IC_{50} semakin kecil yang menandakan bahwa aktivitas antioksidan semakin besar. Hubungan persen peredaman dan IC_{50} dapat dilihat pada Gambar 4.7. Peningkatan persen peredaman dari ekstrak diikuti oleh penurunan nilai IC_{50} pada konsentrasi larutan ekstrak yang sama yaitu 8 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 4.7 Hubungan persen peredaman DPPH dengan IC_{50}

Aktivitas antioksidan terbesar yaitu pembanding (vitamin C) dengan nilai IC_{50} sebesar $3,650 \pm 0,032 \mu\text{g/ml}$. Selanjutnya disusul oleh ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta muda, dan arabika muda dengan nilai IC_{50} sebesar $7,519 \pm 0,029 \mu\text{g/ml}$; $8,317 \pm 0,050 \mu\text{g/ml}$; $13,678 \pm 0,053 \mu\text{g/ml}$; dan $15,535 \pm 0,089 \mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} dari yang terbesar hingga terkecil dapat dilihat pada tabel 4.3

Tabel 4.3 Nilai IC_{50} vitamin C dan ekstrak metanol daun kopi

Sampel	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$, n=3)
Vitamin C	$3,650 \pm 0,032^a$
Ekstrak metanol daun kopi robusta tua	$7,519 \pm 0,029^b$
Ekstrak metanol daun kopi arabika tua	$8,317 \pm 0,050^c$
Ekstrak metanol daun kopi robusta muda	$13,678 \pm 0,053^d$
Ekstrak metanol daun kopi arabika muda	$15,535 \pm 0,089^e$

Keterangan : Data disajikan dalam rata-rata \pm SD, notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang bermakna antar sampel ($p < 0,05$)

Semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidan semakin besar karena hanya dengan konsentrasi yang kecil sudah mampu meredam radikal bebas (DPPH) sebanyak 50%. Nilai IC_{50} yang didapat menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun kopi dari keempat ekstrak memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kecil dibandingkan vitamin C. Namun, ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta muda, dan arabika muda tergolong antioksidan yang sangat aktif seperti vitamin C karena memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/ml}$. Suatu senyawa dikatakan antioksidan sangat aktif apabila nilai $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$, aktif untuk nilai IC_{50} di antara 50-100 $\mu\text{g/ml}$, sedang apabila nilai IC_{50} antara 100-150 $\mu\text{g/ml}$, dan lemah apabila nilai IC_{50} antara 151-200 $\mu\text{g/ml}$ (Zuhra *et al*, 2008).

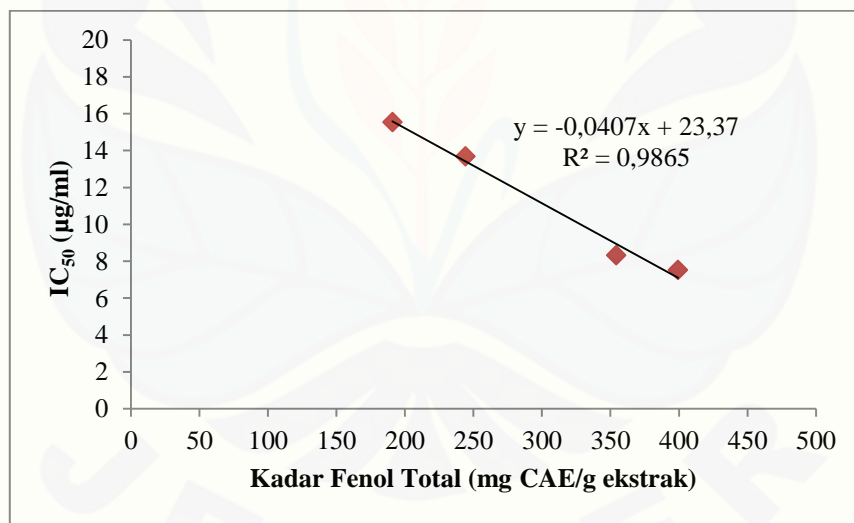
Vitamin C dalam metode ini digunakan sebagai pembanding karena senyawa ini merupakan antioksidan kuat dan merupakan sediaan yang banyak digunakan di masyarakat. Marinova dan Batchvarov (2011) menyatakan bahwa ada 5 senyawa yang digunakan sebagai pembanding dalam pengukuran aktivitas antioksidan, yaitu α -tokoferol (vitamin E), asam askorbat (vitamin C), BHA, BHT, dan trolox. Dari kelima pembanding tersebut, yang paling banyak digunakan yaitu vitamin C. Vitamin C dapat langsung menangkap radikal bebas oksigen baik dengan atau tanpa katalisator enzim. Reaksinya terhadap senyawa oksigen reaktif lebih cepat dibandingkan dengan komponen lainnya. Vitamin C juga melindungi makromolekul penting dari oksidan (Levine *et al*, 1995).

Berdasarkan spesiesnya, ekstrak metanol daun kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan ekstrak metanol daun kopi arabika (*Coffea arabica*) pada daun tua maupun daun muda. Ekstrak metanol daun kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki kadar fenol yang lebih besar dibandingkan daun arabika (*Coffea Arabica*) sehingga menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih besar. Yashin *et al.* (2003) meneliti aktivitas antioksidan pada biji kopi robusta dan arabika. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa biji kopi robusta (*Coffea canephora*) mengandung aktivitas antioksidan yang lebih besar daripada biji kopi arabika (*Coffea Arabica*) pada biji sebelum dan setelah

disangrai. Aktivitas antioksidan kopi robusta yang besar pada bijinya ternyata juga terjadi pada daunnya. Spesies kopi yang sama menunjukkan aktivitas antioksidan yang sama antara daun dan biji.

Berdasarkan umurnya, aktivitas antioksidan daun kopi tua lebih besar dibandingkan daun kopi muda. Daun tua memiliki kandungan fenol total yang lebih besar dibandingkan daun muda. Hal ini yang menyebabkan aktivitas antioksidan pada daun kopi tua lebih besar daripada daun muda.

Nilai kadar fenol total ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta tua, dan arabika tua yang telah ditentukan, dikorelasikan terhadap nilai IC_{50} keempat ekstrak dengan menggunakan persamaan regresi linier untuk mengetahui hubungan antara keduanya. Tabel kadar fenol total dan IC_{50} dari keempat ekstrak dapat dilihat pada Lampiran P. Berdasarkan hasil korelasi, diperoleh persamaan regresi linier seperti pada Gambar 4.7



Gambar 4.8 Hubungan kadar fenol total dengan IC_{50} ekstrak metanol daun kopi

Berdasarkan hasil dari regresi linier diketahui korelasi antara IC_{50} (y) dan kadar fenol total (x) ekstrak metanol daun kopi mempunyai koefisien korelasi $R^2 = 0,9865$ ($y = -0,0407x + 23,37$). Nilai korelasi ini menjelaskan bahwa IC_{50} memiliki hubungan yang linier dengan kadar fenol total. Semakin besar kadar fenol total maka

IC_{50} akan semakin kecil. IC_{50} menggambarkan aktivitas antioksidan. Semakin kecil IC_{50} maka aktivitas antioksidan akan semakin besar. Hasil korelasi ini menunjukkan bahwa senyawa fenol merupakan komponen utama yang memberikan aktivitas antioksidan. Senyawa fenol menghambat radikal bebas dengan cara mendonorkan proton (atom hidrogen) ketika bereaksi dengan senyawa radikal sehingga proses oksidasi dihambat dan terbentuk radikal yang stabil. Terbentuknya radikal stabil ini dikarenakan elektron bebas yang terdapat pada radikal distabilkan oleh delokalisasi elektron dengan adanya resonansi pada cincin aromatik (Tursiman *et al.*, 2012). Senyawa lain hanya memberikan sumbangan aktivitas antioksidan yang kecil. Senyawa lain yang kemungkinan memberikan aktivitas antioksidan yaitu berasal dari metabolit sekunder lain seperti alkaloid (kafein dan trigonelin), saponin, dan α -tokoferol (Erna, 2012; Farah, 2012). Dari sini dapat diketahui bahwa semakin besar kadar fenol total ekstrak metanol daun kopi maka aktivitas antioksidan semakin besar.

Hasil uji anova untuk aktivitas antioksidan (nilai IC_{50}) menunjukkan bahwa signifikansi atau nilai p (*p-value*) adalah 0,000. Nilai p yang diperoleh $< 0,05$ sehingga dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna aktivitas antioksidan (nilai IC_{50}) ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta muda, arabika muda, dan pembanding (vitamin C). Selanjutnya dilakukan uji LSD (*Least Significance Different*) untuk melihat sampel mana yang memiliki perbedaan bermakna. Signifikansi atau nilai p hasil uji LSD $< 0,05$ pada setiap sampel yang menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan (nilai IC_{50}) dari setiap sampel berbeda secara bermakna. Hasil uji anova dan *post hoc* (LSD) aktivitas antioksidan (IC_{50}) dapat dilihat pada Lampiran Q.2.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari uraian yang telah disampaikan adalah sebagai berikut :

1. Ekstrak metanol daun kopi robusta tua memiliki kadar fenol total terbesar yaitu $399,403 \pm 0,559$ mg CAE/g ekstrak, diikuti dengan ekstrak metanol daun kopi arabika tua, robusta muda, dan arabika muda dengan kadar fenol total berturut-turut yaitu $354,307 \pm 1,204$ mg CAE/g ekstrak; $244,232 \pm 1,761$ mg CAE/g ekstrak; dan $190,916 \pm 1,715$ mg CAE/g ekstrak.
2. Aktivitas antioksidan terbesar yaitu vitamin C dengan nilai IC_{50} sebesar $3,650 \pm 0,032$ μ g/ml, diikuti oleh ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta muda, dan arabika muda dengan nilai IC_{50} berturut-turut yaitu $7,519 \pm 0,029$ μ g/ml; $8,317 \pm 0,050$ μ g/ml; $13,678 \pm 0,053$ μ g/ml; dan $15,535 \pm 0,089$ μ g/ml.
3. Terdapat perbedaan bermakna kadar fenol total ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta muda, dan arabika muda.
4. Terdapat perbedaan bermakna aktivitas antioksidan (IC_{50}) ekstrak metanol daun kopi robusta tua, arabika tua, robusta muda, arabika muda, dan vitamin C.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai fraksinasi atau isolasi senyawa aktif dari ekstrak metanol daun kopi robusta (*Coffea canephora*) dan arabika (*Coffea arabica*) yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan.
2. Perlu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan secara *in vivo* ekstrak metanol daun kopi.

DAFTAR PUSTAKA

- AAK, 1988. *Budidaya Tanaman Kopi*. Yogyakarta : Kanisius.
- Achakzai, A. K. K., Achakzai, P., Masood, A., Kayani, S.A., & Tareen, R. B. 2009. Response of Plant Parts and Age on The Distribution of Secondary Metabolites on Plants Found in Quetta. *Pakistan Journal of Botany*. **41**(5) : 2129-2145.
- Agbor, G. A., Oben, J. E., Ngogang, J.Y., Xinxing, C., & Vinson, J.A. 2005. Antioxidant capacity of some herbs/spices from cameroon: a comparative study of two methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (17) : 6819-6824.
- Anggara, A. & Marini, S. 2011. *Kopi Si Hitam Menguntungkan, Budi Daya dan Pemasaran*. Yogyakarta: Cahaya Atma Pustaka.
- Antolovich, M., Prenzeler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. 2001. Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst*. **127**: 183-198.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker K.I., & Özyurt, D. 2007. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assay Applied to Phenolic Compounds with The CUPRAC Assay. *Molecules*, **12** : 1496-1547.
- Brewer, M. S. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **10** : 221-247.
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bøhn, S.K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W.C., Phillips, K.M., Jacobs, D.R., & Blomhoff, R. 2010. The Total Antioxidant Content of More than 3100 Foods, Beverages, Spices, Herbs, and Supplements Sed Worldwide. *Nutrition Journal*, **9** (3) : 1-11.
- Clifford, M. N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79** : 36-372.
- Day, R.A & Underwood, A.L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Edisi Keenam. Jakarta : Erlangga.

- Dehpour, A. A., Ebrahimzadeh, M. A., Fazel, N.S., & Mohammad, N. S. 2009. Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas Y Aceites*, **60** (4) :405-412.
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan.
- Erna, C. 2012. *Uji Aktivitas Antioksidan dan Karakteristik Fitokimia pada Kopi Luwak Arabika dan Pengaruhnya terhadap Tekanan Darah Tikus Normal dan Tikus Hipertensi*. Tesis. Depok: Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian.
- Farah, A. 2012. *Coffee constituents in Coffee: Emerging Health Effects and Disease revention*. First Edition. United Kingdom : Blackwell Publishing Ltd.
- Ge, M., O'reilly, A., Baillie, N., Twentyman, G., Sturt, J., Fitzpatrick, M., & Taylor, T. 2008. Vitamin C: Evidence, application and commentary. *NZFP*, **3** (5) : 312-318.
- Gunalan, G., Myla, N., & Balabhaskar, R. 2012. In Vitro Antioxidant Analysis of Selected Coffee Bean Varieties. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **4** (4) : 2126-2132.
- Hacisevki, A. 2009. An Overview of Ascorbic Acid Biochemistry. *Journal Faculty of Pharmacy*, **38** (3) : 233-255.
- Halliwell, B. 2002. *Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and in Vivo*. Singapore: National University of Singapore.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia*. Edisi Kedua. Bandung: ITB.
- Hecimovic, I., Cvitanovic, A.B., Horzic, D., & Komes, D. 2011. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*, **129** (3) : 991-1000.
- ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*). 2011. *Coffea L.* www.itis.gov [serial online]. http://itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=35189. [29 Desember 2014].
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. 2009. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, **2** : 41-60.
- Kementrian Perindustrian RI. 2013. *Produksi Kopi Nusantara Ketiga Terbesar di Dunia*. www.kemenperin.go.id [serial online]

<http://www.kemenperin.go.id/artikel/6611/Produksi-Kopi-Nusantara-Ketiga-Terb Besar-Di-Duni>. [20 Desember 2014].

- Khopkar, S. M. 2010. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI-Press.
- Kikuzaki, H. & Nakatani, N. 1993. Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents. *Journal of Food Science*, **58** (6) : 1407-1410.
- Kim H. J., Eun J.C., Sung H.C., Shin K.C., Heu D.P., & Sang W.C. 2002. Antioxidative Activity of Resveratrol and Its Derivatives Isolated from Seed of *Paeonia lactiflora*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **66** : 1990-1993.
- Kuit, M., Thiet, N. V., & Jansen, D. 2004. *Manual for Arabica Cultivation*. Vietnam : Tan Lam Agricultural Product Joint Stock Company.
- Kushalappa, A.C. & Eskes, A. 1989. *Coffee Rust : Epidemiology, Resistance and Management*. Florida : CRC Press.
- Lestari, F. 2007. *Bahaya Kimia : Sampling & Pengukuran kontaminan Kimia di Udara*. Jakarta : EGC.
- Levine, M., Dhariwal, K. R., Welch, R. W., Wang, Y., & Park, J. B. 1995. Determination of Optimal Ascorbic Acid Requirements in Humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **62** : 1347S-1356S.
- Marinova, G. & Batchvarov, V. 2011. Evaluation Of The Methods For Determination Of The Free Radical Scavenging Activity By Dpph. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **17** (1) : 11-24.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal of Science and Technology*, **26** (2) : 211-219.
- Muhilal. 1991. Teori radikal bebas dalam gizi dan kedokteran. *Cermin Dunia Kedokteran*, **73** : 9-11.
- Mulja & Suharman. 1995. *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Najiyati & Danarti. 2001. *Kopi Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya.

- Nely, F. 2007. *Aktivitas Antioksidan Rempah Pasar Dan Bubuk Rempah Pabrik Dengan Metode Polifenol Dan Uji Aom (Active Oxygen Method)*. Skripsi. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Nursalam & Kurniawati. 2007. *Asuhan Keperawatan pada Pasien Terinfeksi HIV/AIDS*. Jakarta: Salemba Medika.
- Panggabean, E. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta : PT. AgroMedia Pustaka.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. 2001. *Introduction to Spectroscopy*. Edisi ke-4. Washington : Departement of Chemistry Western Washington University.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Rio, D.D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. 2003. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oil Consumed in Italy Assessed by Three Different in Vitro Assays. *Journal of Nutrition*, **133** : 2812-2819.
- Percival, M. 1998. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*, **31** : 1-4.
- Pérez-Hernández, L. M. Chávez-Quiroz, K., Medina-Juárez, L. A., & Meza, N.G. 2012. *Journal of Mexico Chemistry and Society*, **56** (4) : 430-435.
- Prakash, A., Rigelhof, F., & Miller, E. 2001. Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories : Analithycal Progress*, **19** (2) : 1 – 4.
- Prastowo, B., Karmawati, E., Rubijo, Siswanto, Indrawanto, C. & Munarso, S.J. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Bogor : Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Prylbylski, R., Lee, Y., & Eskin, N. 2001. Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Buckwheat Seed Components. in Pokorny J, Yanishlieva, Gordon M. (eds). *Antioxidants in Food*. England : Woodhead Publishing Ltd.
- Rahardjo, P. 2012. *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Rita, Y. 2006. *Kandungan Tanin Dan Potensi Anti Streptococcus Mutans Daun The Varietas Assamica pada Berbagai Tahap Pengolahan*. Skripsi. Bogor : Institut Pertanian Bogor.

- Salgado, P. R., Favarin, J. L., Leandro, R. A., & Filho, O. F. L. 2008. Total Phenol Concentrations in Coffee Tree Leaves during Fruit Development. *Scientia and Agricola*, **65** (4) : 354-359.
- Sarma, A. D., Mallick, A. R., & Ghosh, A. K. 2010. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. *International Journal of Pharma Sciences and Researc*, **3** : 185-192.
- Shivaprasad, H. N, Mohan, S., Kharya, M. D., Shiradkar, M.R., & Lakshman, K. 2005. In-vitro models for antioxidant activity evaluation : A Review. *Pharmaceutical Reviews*, **3**(4).
- Silalahi, J. 2006. *Makanan Fungsional*. Yogyakarta : Kanisius.
- Singleton, V.L. & J.A Rossi. 1965. Colorimetry of Total Phenolic with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent. *American Journal Enology and Viticulture*. **16**: 144-158.
- Soltani, M. & Baharara, J. 2014. Antioxidant and Antiproliferative Capacity of Dichloromethane Extract of *Holoturia leucospilota* sea cucumber. *International Journal of Cellular & Molecular Biotechnology*, **2014** :1-9.
- Tambayong, J. 2000. *Patofisiologi untuk Keperawatan*. Jakarta : EGC.
- Tice, R. 1998. *Chlorogenic Acid [327-97-9] and Caffeic Acid [331-39-5] : Review of Toxicological Literature*. North Carolina : ILS.
- Tursiman, Ardiningsih, P., & Nofiani, R. 2012. Total Fenol Fraksi Etil Asetat dari Buah Asam Kandis (*Garcinia dioica* Blume). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, **1** (1) : 45-48.
- Vermerris, W. & Nicholson, R. 2006. *Phenolic Compound Biochemistry*. Netherlands : Springer.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami & Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta : Penerbit Kanisius.
- Yashin, A., Yashin, Y., Wang, J. Y., & Nemzer, B. 2013. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Antioxidants*, **2** : 230-245.
- Zuhra, C. F., Tarigan, J. B., & Sihotang, H. 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid Dari Daun Katuk (*Sauropus Androgunus* (L) Merr.). *Jurnal Biologi Sumatera*, **3** (1) :7-10.

LAMPIRAN

Lampiran A. Gambar Ekstrak Metanol Daun Kopi



Lampiran B. Perhitungan % Rendemen

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

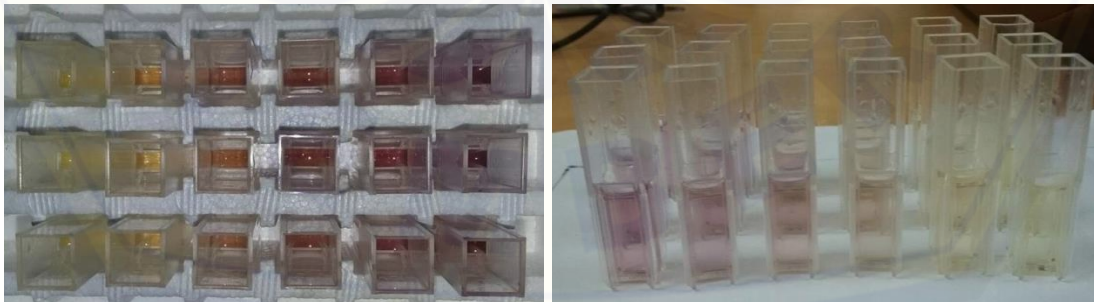
$$\text{Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Muda} = \frac{37,91 \text{ g}}{251,32 \text{ g}} \times 100\% = 18,717\%$$

$$\text{Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Tua} = \frac{42,99 \text{ g}}{250,96 \text{ g}} \times 100\% = 17,130\%$$

$$\text{Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda} = \frac{40,31 \text{ g}}{250,57 \text{ g}} \times 100\% = 16,062\%$$

$$\text{Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Tua} = \frac{46,90 \text{ g}}{252 \text{ g}} \times 100\% = 15,084 \%$$

Lampiran C. Gambar Pengukuran Aktivitas Antioksidan



Lampiran D. Data Absorbansi

D.1 Larutan DPPH 32 µg/ml

Operator:

Wavelength Scan
 Data Mode: ABS
 Scan Range: 600.0-400.0nm
 Slit Width: 4nm
 Speed(nm/min): 400nm/min
 Lamp Change Wavelength: 340.0nm
 Path Length:

ALL Data							
WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS
600.0	0.317	599.5	0.316	599.0	0.316	598.5	0.317
598.0	0.318	597.5	0.319	597.0	0.319	596.5	0.320
596.0	0.321	595.5	0.323	595.0	0.324	594.5	0.325
594.0	0.326	593.5	0.327	593.0	0.328	592.5	0.329
592.0	0.330	591.5	0.331	591.0	0.332	590.5	0.334
590.0	0.334	589.5	0.335	589.0	0.337	588.5	0.339
588.0	0.341	587.5	0.342	587.0	0.343	586.5	0.345
586.0	0.346	585.5	0.348	585.0	0.349	584.5	0.351
584.0	0.353	583.5	0.355	583.0	0.357	582.5	0.359
582.0	0.360	581.5	0.361	581.0	0.362	580.5	0.364
580.0	0.365	579.5	0.366	579.0	0.369	578.5	0.370
578.0	0.372	577.5	0.374	577.0	0.376	576.5	0.377
576.0	0.378	575.5	0.380	575.0	0.381	574.5	0.383
574.0	0.385	573.5	0.388	573.0	0.390	572.5	0.392
572.0	0.394	571.5	0.396	571.0	0.398	570.5	0.400
570.0	0.402	569.5	0.404	569.0	0.405	568.5	0.407
568.0	0.409	567.5	0.411	567.0	0.413	566.5	0.415
566.0	0.417	565.5	0.419	565.0	0.422	564.5	0.424
564.0	0.426	563.5	0.428	563.0	0.430	562.5	0.433
562.0	0.435	561.5	0.437	561.0	0.440	560.5	0.443
560.0	0.445	559.5	0.448	559.0	0.450	558.5	0.453
558.0	0.456	557.5	0.458	557.0	0.461	556.5	0.463
556.0	0.466	555.5	0.469	555.0	0.472	554.5	0.476
554.0	0.480	553.5	0.483	553.0	0.486	552.5	0.489
552.0	0.493	551.5	0.496	551.0	0.500	550.5	0.503
550.0	0.505	549.5	0.508	549.0	0.512	548.5	0.514
548.0	0.517	547.5	0.520	547.0	0.524	546.5	0.527
546.0	0.530	545.5	0.533	545.0	0.536	544.5	0.539
544.0	0.542	543.5	0.546	543.0	0.550	542.5	0.554
542.0	0.558	541.5	0.562	541.0	0.565	540.5	0.568
540.0	0.572	539.5	0.576	539.0	0.579	538.5	0.583
538.0	0.587	537.5	0.590	537.0	0.594	536.5	0.598
536.0	0.602	535.5	0.606	535.0	0.610	534.5	0.614
534.0	0.618	533.5	0.622	533.0	0.627	532.5	0.630
532.0	0.634	531.5	0.637	531.0	0.641	530.5	0.644
530.0	0.647	529.5	0.651	529.0	0.655	528.5	0.657
528.0	0.660	527.5	0.662	527.0	0.665	526.5	0.668
526.0	0.671	525.5	0.673	525.0	0.676	524.5	0.679
524.0	0.682	523.5	0.684	523.0	0.687	522.5	0.689
522.0	0.691	521.5	0.693	521.0	0.695	520.5	0.697
520.0	0.699	519.5	0.700	519.0	0.702	518.5	0.703
518.0	0.704	517.5	0.706	517.0	0.707	516.5	0.707
516.0	0.707	515.5	0.708	515.0	0.708	514.5	0.707
514.0	0.707	513.5	0.707	513.0	0.707	512.5	0.707
512.0	0.707	511.5	0.706	511.0	0.705	510.5	0.705
510.0	0.704	509.5	0.702	509.0	0.700	508.5	0.699
508.0	0.698	507.5	0.697	507.0	0.695	506.5	0.693
506.0	0.691	505.5	0.689	505.0	0.687	504.5	0.685
504.0	0.682	503.5	0.679	503.0	0.676	502.5	0.674
502.0	0.672	501.5	0.669	501.0	0.667	500.5	0.664
500.0	0.661	499.5	0.658	499.0	0.654	498.5	0.651
498.0	0.648	497.5	0.644	497.0	0.641	496.5	0.637
496.0	0.633	495.5	0.630	495.0	0.626	494.5	0.622
494.0	0.618	493.5	0.613	493.0	0.609	492.5	0.605
492.0	0.601	491.5	0.597	491.0	0.593	490.5	0.589
490.0	0.585	489.5	0.581	489.0	0.578	488.5	0.575
488.0	0.572	487.5	0.568	487.0	0.564	486.5	0.560
486.0	0.556	485.5	0.552	485.0	0.548	484.5	0.544

482.0	0.524	481.5	0.520	481.0	0.517	480.5	0.513
480.0	0.509	479.5	0.505	479.0	0.502	478.5	0.498
478.0	0.495	477.5	0.491	477.0	0.488	476.5	0.484
476.0	0.480	475.5	0.475	475.0	0.471	474.5	0.467
474.0	0.464	473.5	0.460	473.0	0.457	472.5	0.453
472.0	0.449	471.5	0.445	471.0	0.441	470.5	0.438
470.0	0.436	469.5	0.431	469.0	0.428	468.5	0.425
468.0	0.423	467.5	0.420	467.0	0.417	466.5	0.413
466.0	0.410	465.5	0.407	465.0	0.404	464.5	0.401
464.0	0.397	463.5	0.394	463.0	0.391	462.5	0.388
462.0	0.385	461.5	0.383	461.0	0.380	460.5	0.377
460.0	0.374	459.5	0.371	459.0	0.368	458.5	0.366
458.0	0.363	457.5	0.361	457.0	0.358	456.5	0.355
456.0	0.353	455.5	0.350	455.0	0.348	454.5	0.345
454.0	0.343	453.5	0.340	453.0	0.338	452.5	0.336
452.0	0.333	451.5	0.331	451.0	0.329	450.5	0.327
450.0	0.325	449.5	0.323	449.0	0.321	448.5	0.320
448.0	0.318	447.5	0.316	447.0	0.314	446.5	0.313
446.0	0.311	445.5	0.309	445.0	0.307	444.5	0.306
444.0	0.304	443.5	0.303	443.0	0.301	442.5	0.300
442.0	0.298	441.5	0.296	441.0	0.295	440.5	0.293
440.0	0.292	439.5	0.290	439.0	0.289	438.5	0.288
438.0	0.287	437.5	0.285	437.0	0.284	436.5	0.283
436.0	0.282	435.5	0.281	435.0	0.279	434.5	0.278
434.0	0.277	433.5	0.276	433.0	0.276	432.5	0.274
432.0	0.273	431.5	0.272	431.0	0.271	430.5	0.270
430.0	0.269	429.5	0.268	429.0	0.267	428.5	0.266
428.0	0.265	427.5	0.264	427.0	0.263	426.5	0.262
426.0	0.261	425.5	0.261	425.0	0.259	424.5	0.258
424.0	0.257	423.5	0.256	423.0	0.256	422.5	0.255
422.0	0.254	421.5	0.253	421.0	0.252	420.5	0.251
420.0	0.251	419.5	0.250	419.0	0.249	418.5	0.248
418.0	0.247	417.5	0.247	417.0	0.246	416.5	0.245
416.0	0.244	415.5	0.244	415.0	0.243	414.5	0.242
414.0	0.241	413.5	0.240	413.0	0.239	412.5	0.239
412.0	0.238	411.5	0.238	411.0	0.237	410.5	0.237
410.0	0.236	409.5	0.235	409.0	0.235	408.5	0.235
408.0	0.235	407.5	0.234	407.0	0.234	406.5	0.233
406.0	0.233	405.5	0.233	405.0	0.233	404.5	0.232
404.0	0.232	403.5	0.232	403.0	0.232	402.5	0.231
402.0	0.231	401.5	0.231	401.0	0.231	400.5	0.231
400.0	0.230						

D.2 Larutan Uji yang Direaksikan dengan DPPH pada Menit ke 5 sampai 100

%T/ABS
 Data Mode: ABS
 WL: 515.0
 Lamp Change Wavelength: 340.0nm
 Path Length:

ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS
1	0.589	2	0.502	3	0.417	4	0.359
5	0.343	6	0.589	7	0.501	8	0.413
9	0.350	10	0.344	11	0.582	12	0.494
13	0.402	14	0.389	15	0.344	16	0.579
17	0.489	18	0.396	19	0.332	20	0.341
21	0.575	22	0.481	23	0.388	24	0.323
25	0.339	26	0.569	27	0.475	28	0.380
29	0.313	30	0.338	31	0.568	32	0.476
33	0.380	34	0.314	35	0.338	36	0.567
37	0.475	38	0.379	39	0.312	40	0.339
41	0.568	42	0.475	43	0.380	44	0.312
45	0.339	46	0.568	47	0.475	48	0.379
49	0.312	50	0.339	51	0.568	52	0.475
53	0.380	54	0.312	55	0.338	56	0.567
57	0.475	58	0.381	59	0.311	60	0.340
61	0.570	62	0.476	63	0.381	64	0.311
65	0.340	66	0.569	67	0.473	68	0.379
69	0.309	70	0.339	71	0.566	72	0.473
73	0.380	74	0.310	75	0.339	76	0.566
77	0.473	78	0.379	79	0.309	80	0.340
81	0.567	82	0.474	83	0.379	84	0.309
85	0.340	86	0.567	87	0.472	88	0.379
89	0.309	90	0.340	91	0.568	92	0.472
93	0.378	94	0.309	95	0.341	96	0.567
97	0.473	98	0.378	99	0.308	100	0.342
101	0.700						

D.3 Larutan Vitamin C

WL: 515.0
Lamp Change Wavelength: 340.0nm
Path Length:

ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS
1	0.759	2	0.720	3	0.732	4	0.722
5	0.624	6	0.636	7	0.649	8	0.464
9	0.469	10	0.469	11	0.359	12	0.353
13	0.334	14	0.165	15	0.199	16	0.166
17	0.050	18	0.049	19	0.051		

D.4 Larutan Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Muda

%T/ABS
Data Mode: ABS
WL: 515.0
Lamp Change Wavelength: 340.0nm
Path Length:

ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS
1	0.723	2	0.639	3	0.641	4	0.643
5	0.527	6	0.529	7	0.527	8	0.415
9	0.410	10	0.413	11	0.305	12	0.304
13	0.292	14	0.161	15	0.159	16	0.155
17	0.073	18	0.074	19	0.072		

D.5 Larutan Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Tua

%T/ABS
Data Mode: ABS
WL: 515.0
Lamp Change Wavelength: 340.0nm
Path Length:

ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS
1	0.628	2	0.554	3	0.558	4	0.604
5	0.554	6	0.578	7	0.460	8	0.485
9	0.460	10	0.458	11	0.363	12	0.386
13	0.323	14	0.358	15	0.362	16	0.348
17	0.329	18	0.286	19	0.282	20	0.289
21	0.284	22	0.135	23	0.187	24	0.213
25	0.223	26	0.211	27	0.210	28	0.143
29	0.233	30	0.193	31	0.138	32	0.139

D.6 Larutan Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda

%T/ABS
Data Mode: ABS
WL: 515.0
Lamp Change Wavelength: 340.0nm
Path Length:

ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS
1	0.726	2	0.671	3	0.675	4	0.672
5	0.548	6	0.554	7	0.549	8	0.425
9	0.446	10	0.445	11	0.341	12	0.354
13	0.355	14	0.257	15	0.238	16	0.258
17	0.156	18	0.150	19	0.156		

D.7 Larutan Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Tua

ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS
1	0.652	2	0.579	3	0.585	4	0.582
5	0.496	6	0.486	7	0.498	8	0.400
9	0.403	10	0.414	11	0.356	12	0.360
13	0.358	14	0.269	15	0.266	16	0.274
17	0.162	18	0.162	19	0.167		

Lampiran E. Perhitungan Bahan Pengukuran Aktivitas Antioksidan

E.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

$$10 \text{ mg DPPH dilarutkan dalam } 10 \text{ ml metanol} = \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1000 \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran

$$\begin{aligned} \frac{2 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} \times 1000 \mu\text{g/ml} &= 40 \mu\text{g/ml} \\ &= \frac{40}{394,32} \times 1000 \\ &= 101,4405 \mu\text{M} \\ &= 0,1 \text{ mM} \end{aligned}$$

E.2 Pembuatan Larutan Perbandingan (Vitamin C)

- Larutan Induk 1

$$\frac{25,1 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1004 \mu\text{g/ml} \times \frac{99,8 \%}{100\%} = 1001,992 \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran

$$\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1001,992 \mu\text{g/ml} = 100,199 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100,199 \mu\text{g/ml} = 5,01 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{b) } \frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100,199 \mu\text{g/ml} = 10,02 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{c) } \frac{1,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100,199 \mu\text{g/ml} = 15,03 \mu\text{g/ml}$$

$$d) \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100,199 \text{ } \mu\text{g/ml} = 20,04 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$e) \frac{2,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100,199 \text{ } \mu\text{g/ml} = 25,05 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$f) \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100,199 \text{ } \mu\text{g/ml} = 30,06 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

-Larutan induk 2 dan induk 3

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{ml}} = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} \times \frac{99,8\%}{100\%} = 998 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran

$$\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 998 \text{ } \mu\text{g/ml} = 99,8 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$a) \frac{0,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,8 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4,99 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$b) \frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,8 \text{ } \mu\text{g/ml} = 9,98 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c) \frac{1,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,8 \text{ } \mu\text{g/ml} = 14,97 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$d) \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,8 \text{ } \mu\text{g/ml} = 19,96 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$e) \frac{2,5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,8 \text{ } \mu\text{g/ml} = 24,95 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$f) \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,8 \text{ } \mu\text{g/ml} = 29,94 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

E.3 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metanol Robusta Tua

-Larutan induk 1, induk 2 dan induk 3

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran

$$\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$a) \frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$b) \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 20 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c) \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 30 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$d) \frac{4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$e) \frac{5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 200 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$a) \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 200 \text{ } \mu\text{g/ml} = 60 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

E.4 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metanol Arabika Tua

-Larutan induk 1 dan induk 2

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ mL}} \times 1000 \frac{\text{mL}}{\text{L}} = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran

$$\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$a) \frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$b) \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 20 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c) \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 30 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$d) \frac{4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$e) \frac{5 \text{ mL}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 200 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$a) \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 200 \text{ } \mu\text{g/ml} = 60 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

-Larutan Induk 3

$$\frac{24,9 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 996 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran

$$\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 996 \text{ } \mu\text{g/ml} = 99,6 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,6 \text{ } \mu\text{g/ml} = 9,96 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{b) } \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,6 \text{ } \mu\text{g/ml} = 19,92 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{c) } \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,6 \text{ } \mu\text{g/ml} = 29,88 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{d) } \frac{4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,6 \text{ } \mu\text{g/ml} = 39,84 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{e) } \frac{5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,6 \text{ } \mu\text{g/ml} = 49,8 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 996 \text{ } \mu\text{g/ml} = 199,2 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 199,2 \text{ } \mu\text{g/ml} = 59,76 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

E.5 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Robusta Muda

-Larutan induk 1, induk 2 dan induk 3

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran

$$\frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 20 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{b) } \frac{4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 200 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 200 \text{ } \mu\text{g/ml} = 60 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{4 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 400 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/ml} = 80 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{6 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 600 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 600 \text{ } \mu\text{g/ml} = 120 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

E.6 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Metanol Arabika Muda

-Larutan induk 1 dan induk 3

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran

$$\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 20 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{b) } \frac{4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 200 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 200 \text{ } \mu\text{g/ml} = 60 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 400 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 400 \text{ } \mu\text{g/ml} = 80 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{6 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 600 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{2 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 600 \text{ } \mu\text{g/ml} = 120 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

-Larutan Induk 2

$$\frac{24,9 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 996 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Pengenceran

$$\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 996 \text{ } \mu\text{g/ml} = 99,6 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{a) } \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,6 \text{ } \mu\text{g/ml} = 19,92 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$b) \frac{4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 99,6 \text{ } \mu\text{g/ml} = 39,84 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 996 \text{ } \mu\text{g/ml} = 199,2 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$a) \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 199,2 \text{ } \mu\text{g/ml} = 59,76 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 996 \text{ } \mu\text{g/ml} = 398,4 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$a) \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 398,4 \text{ } \mu\text{g/ml} = 79,68 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\frac{6 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 996 \text{ } \mu\text{g/ml} = 597,6 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$a) \frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 597,6 \text{ } \mu\text{g/ml} = 119,52 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Lampiran F. Pengujian Peredaman Radikal Bebas

Larutan uji 0,3 ml ditambahkan larutan DPPH ad 1,5 ml

F.1 Larutan Uji Pembanding (Vitamin C)

-Replikasi 1

$$a) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 30,06 \text{ } \mu\text{g/ml} = 6,012 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$b) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 25,05 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5,010 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 20,04 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4,008 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$d) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 15,03 \text{ } \mu\text{g/ml} = 3,006 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$e) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 10,02 \text{ } \mu\text{g/ml} = 2,004 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$f) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 5,01 \text{ } \mu\text{g/ml} = 1,002 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Replikasi 2 dan Replikasi 3

$$a) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 29,94 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5,988 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$b) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 24,95 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4,990 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 19,96 \text{ } \mu\text{g/ml} = 3,992 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$d) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 14,97 \text{ } \mu\text{g/ml} = 2,994 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$e) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 9,98 \text{ } \mu\text{g/ml} = 1,996 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$f) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 4,99 \text{ } \mu\text{g/ml} = 0,998 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

F2 Larutan Uji Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Tua

Replikasi 1, Replikasi 2 dan Replikasi 3

$$a) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 60 \text{ } \mu\text{g/ml} = 12 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$b) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml} = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml} = 8 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$d) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 30 \text{ } \mu\text{g/ml} = 6 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$e) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 20 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$f) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 10 \text{ } \mu\text{g/ml} = 2 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

F.3 Larutan Uji Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Tua

Replikasi 1

$$a) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 59,76 \text{ } \mu\text{g/ml} = 11,952 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$b) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 49,8 \text{ } \mu\text{g/ml} = 9,960 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 39,84 \text{ } \mu\text{g/ml} = 7,968 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$d) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 29,88 \text{ } \mu\text{g/ml} = 5,976 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$e) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 19,92 \text{ } \mu\text{g/ml} = 3,984 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$f) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 9,96 \text{ } \mu\text{g/ml} = 1,992 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Replikasi 2 dan Replikasi 3

$$a) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 60 \text{ } \mu\text{g/ml} = 12 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$b) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml} = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml} = 8 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$d) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 30 \text{ } \mu\text{g/ml} = 6 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$e) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 20 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$f) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 10 \text{ } \mu\text{g/ml} = 2 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

F.4 Larutan Uji Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Muda

Replikasi 1, Replikasi 2 dan Replikasi 3

$$a) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 120 \text{ } \mu\text{g/ml} = 24 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$b) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 20 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$c) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 80 \text{ } \mu\text{g/ml} = 16 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$d) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 60 \text{ } \mu\text{g/ml} = 12 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$e) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml} = 8 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$f) \frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 20 \text{ } \mu\text{g/mL} = 4 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

F.5 Larutan Uji Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda

Replikasi 1 dan Replikasi 3

a) $\frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 120 \text{ } \mu\text{g/ml} = 24 \text{ } \mu\text{g/ml}$

b) $\frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 100 \text{ } \mu\text{g/ml} = 20 \text{ } \mu\text{g/ml}$

c) $\frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 80 \text{ } \mu\text{g/ml} = 16 \text{ } \mu\text{g/ml}$

d) $\frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 60 \text{ } \mu\text{g/ml} = 12 \text{ } \mu\text{g/ml}$

e) $\frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml} = 8 \text{ } \mu\text{g/ml}$

f) $\frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 20 \text{ } \mu\text{g/ml} = 4 \text{ } \mu\text{g/ml}$

Replikasi 2

a) $\frac{0,3 \text{ mL}}{1,5 \text{ mL}} \times 119,52 \text{ } \mu\text{g/ml} = 23,904 \text{ } \mu\text{g/ml}$

b) $\frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 99,6 \text{ } \mu\text{g/ml} = 19,920 \text{ } \mu\text{g/ml}$

c) $\frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 79,68 \text{ } \mu\text{g/ml} = 15,936 \text{ } \mu\text{g/ml}$

d) $\frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 59,76 \text{ } \mu\text{g/ml} = 11,952 \text{ } \mu\text{g/ml}$

e) $\frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 39,84 \text{ } \mu\text{g/ml} = 7,968 \text{ } \mu\text{g/ml}$

f) $\frac{0,3 \text{ ml}}{1,5 \text{ ml}} \times 19,92 \text{ } \mu\text{g/ml} = 3,984 \text{ } \mu\text{g/ml}$

Lampiran G. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Waktu Inkubasi

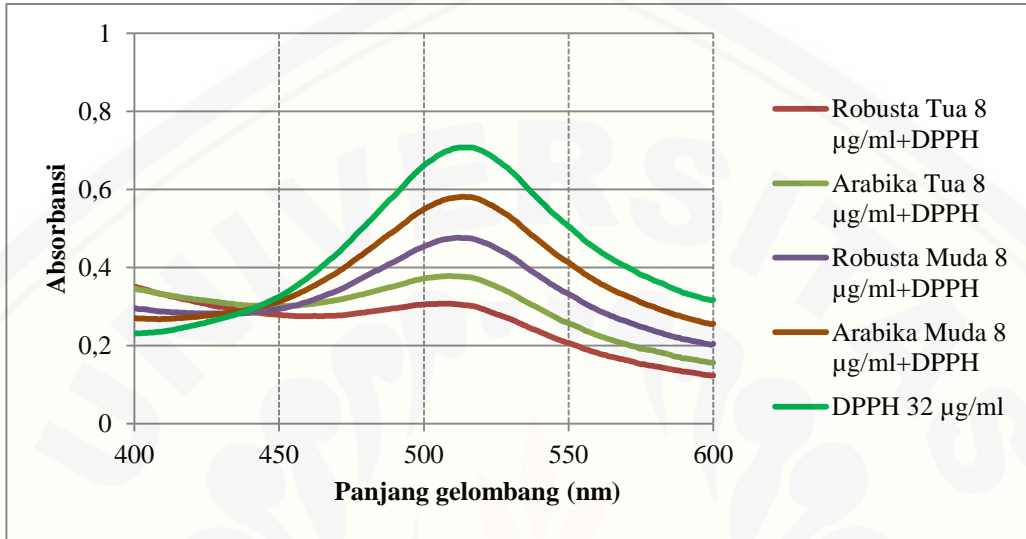
G.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Scan panjang gelombang

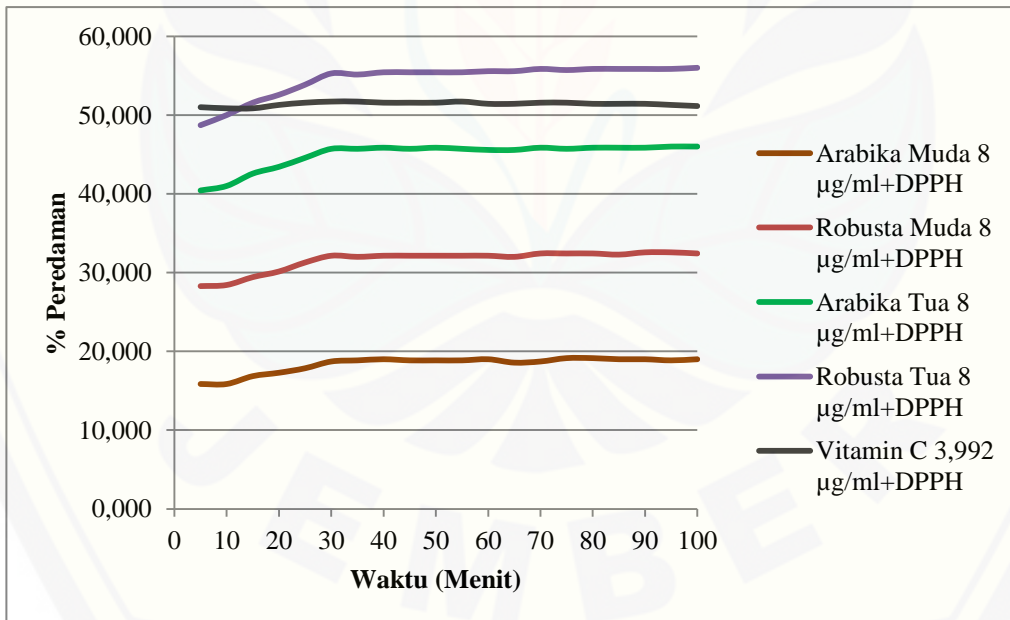
Data Mode : ABS

Scan Range : 600,0-400,0 nm

Slide Width : 4 nm
 Speed (nm/min) : 400 nm/min
 Lamp Change Wavelength : 340,0 nm



G.2 Penentuan Waktu Inkubasi



Waktu (Menit)	Peredaman (%)				
	Arabika Muda 8 $\mu\text{g/ml}$	Robusta Muda 8 $\mu\text{g/ml}$	Arabika Tua 8 $\mu\text{g/ml}$	Robusta Tua 8 $\mu\text{g/ml}$	Vitamin C 3,992 $\mu\text{g/ml}$
5	15,857	28,286	40,429	48,714	51,000
10	15,857	28,429	41,000	50,000	50,857
15	16,857	29,429	42,571	51,571	50,857
20	17,286	30,143	43,429	52,571	51,286
25	17,857	31,286	44,571	53,857	51,571
30	18,714	32,143	45,714	55,286	51,714
35	18,857	32,000	45,714	55,143	51,714
40	19,000	32,143	45,857	55,429	51,571
45	18,857	32,143	45,714	55,429	51,571
50	18,857	32,143	45,857	55,429	51,571
55	18,857	32,143	45,714	55,429	51,714
60	19,000	32,143	45,571	55,571	51,429
65	18,571	32,000	45,571	55,571	51,429
70	18,714	32,429	45,857	55,857	51,571
75	19,143	32,429	45,714	55,714	51,571
80	19,143	32,429	45,857	55,857	51,429
85	19,000	32,286	45,857	55,857	51,429
90	19,000	32,571	45,857	55,857	51,429
95	18,857	32,571	46,000	55,857	51,286
100	19,000	32,429	46,000	56,000	51,143

LAMPIRAN H. Perhitungan % Peredaman dan IC_{50}

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Rata-rata IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	SD	RSD (%)
Vitamin C	3,637	3,650	0,032	0,881
	3,687			
	3,627			
Ekstrak Metanol Robusta Tua	7,548	7,519	0,029	0,381
	7,491			
	7,516			
Ekstrak Metanol Arabika Tua	8,270	8,317	0,050	0,596
	8,311			
	8,369			
Ekstrak Metanol Robusta Muda	13,717	13,678	0,053	0,388
	13,700			
	13,618			
Ekstrak Metanol Arabika Muda	15,453	15,535	0,089	0,573
	15,630			
	15,521			

$$\text{Persen Peredaman} = \frac{A \text{ kontrol} - A \text{ sampel}}{A \text{ kontrol}} \times 100 \%$$

H.1 Vitamin C

-Replikasi 1

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,720	1,002	5,138
0,624	2,004	17,391
0,464	3,006	38,867
0,359	4,008	52,701
0,165	5,010	78,261
0,050	6,012	93,412

Absorbansi Kontrol = 0,759

Perhitungan Persen Peredaman

$$\text{a) } 1,002 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,720}{0,759} \times 100 \% = 5,138 \%$$

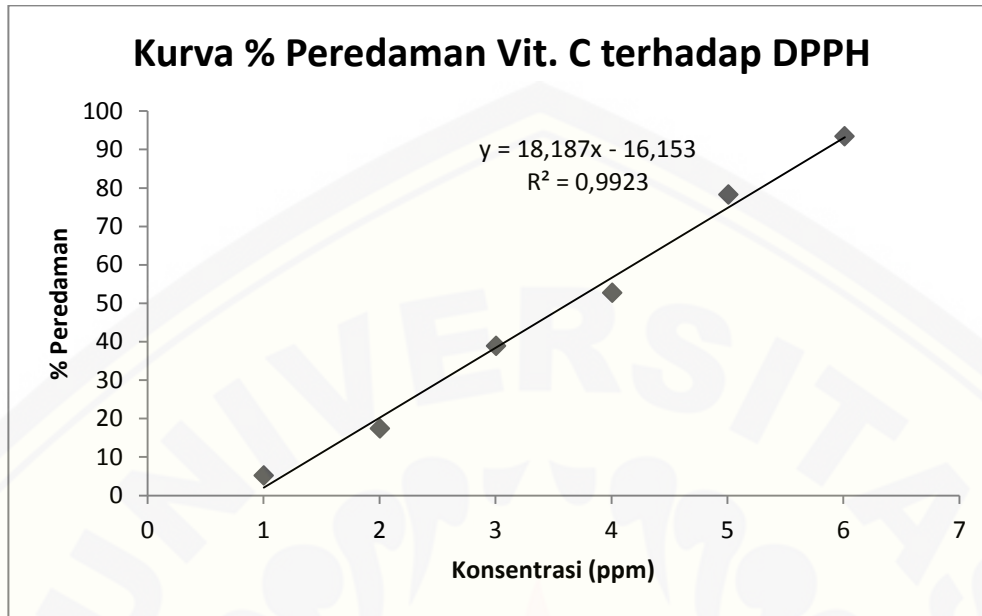
$$\text{b) } 2,004 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,624}{0,759} \times 100 \% = 17,391 \%$$

$$\text{c) } 3,006 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,464}{0,759} \times 100 \% = 38,867 \%$$

$$\text{d) } 4,008 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,359}{0,759} \times 100 \% = 52,701 \%$$

$$\text{e) } 5,010 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,165}{0,759} \times 100 \% = 78,261 \%$$

$$\text{f) } 6,012 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,051}{0,759} \times 100 \% = 93,412 \%$$



Persamaan regresi : $y = 18,187x - 16,153$

$$R^2 = 0,9923$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 18,187x - 16,153$$

$$x = \frac{50 + 16,153}{18,187}$$

$$x = 3,637$$

$$IC_{50} = 3,637 \mu\text{g/ml}$$

-Replikasi 2

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,732	0,998	3,557
0,636	1,996	16,206
0,469	2,994	38,208
0,353	3,992	53,491
0,199	4,990	73,781
0,049	5,988	93,544

Absorbansi Kontrol = 0,759

Perhitungan Persen Peredaman

$$a) 0,998 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759-0,723}{0,759} \times 100 \% = 3,557 \%$$

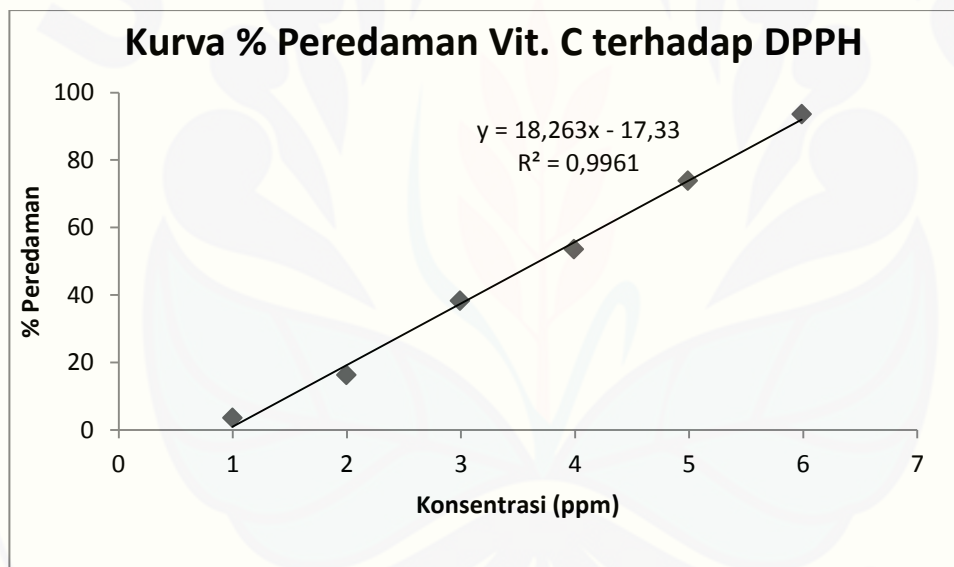
$$b) 1,996 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759-0,636}{0,759} \times 100 \% = 16,206 \%$$

$$c) 2,994 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759-0,469}{0,759} \times 100 \% = 38,208 \%$$

$$d) 3,992 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759-0,353}{0,759} \times 100 \% = 53,491 \%$$

$$e) 4,990 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759-0,199}{0,759} \times 100 \% = 73,781 \%$$

$$f) 5,988 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759-0,049}{0,759} \times 100 \% = 93,544 \%$$



Persamaan regresi : $y = 18,263x - 17,330$

$$R^2 = 0,9961$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 18,263x - 17,330$$

$$x = \frac{50+17,330}{18,263}$$

$$x = 3,687$$

$$IC_{50} = 3,687 \mu\text{g/ml}$$

-Replikasi 3

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,722	0,998	4,875
0,649	1,996	14,493
0,469	2,994	38,208
0,334	3,992	55,995
0,166	4,990	78,129
0,051	5,988	93,281

Absorbansi Kontrol = 0,759

Perhitungan Persen Peredaman

$$\text{a) } 0,998 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,722}{0,759} \times 100 \% = 4,875 \%$$

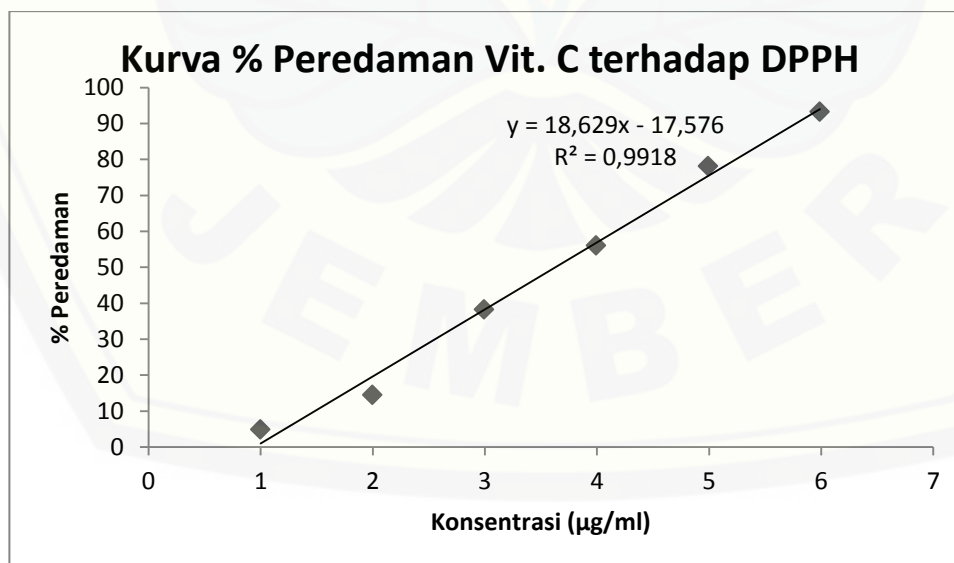
$$\text{b) } 1,996 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,649}{0,759} \times 100 \% = 14,875 \%$$

$$\text{c) } 2,994 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,469}{0,759} \times 100 \% = 38,208 \%$$

$$\text{d) } 3,992 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,334}{0,759} \times 100 \% = 55,995 \%$$

$$\text{e) } 4,990 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,166}{0,759} \times 100 \% = 78,129 \%$$

$$\text{f) } 5,998 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,051}{0,759} \times 100 \% = 93,281 \%$$



Persamaan regresi : $y = 18,629x - 17,576$

$$R^2 = 0,9918$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 18,629x - 17,576$$

$$x = \frac{50+17,576}{18,629}$$

$$x = 3,627$$

$$IC_{50} = 3,627 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Rata-rata } IC_{50} = \frac{3,637+3,687+3,627}{3} = 3,650 \mu\text{g/ml}$$

$$SD = 0,032$$

$$RSD = 0,881 \%$$

H.2 Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Tua

Replikasi 1

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,554	2,000	11,783
0,460	4,000	26,751
0,363	6,000	42,197
0,286	8,000	54,459
0,213	10,000	66,083
0,143	12,000	77,229

Absorbansi Kontrol = 0,628

Perhitungan Persen Peredaman

$$\text{a) } 2 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628-0,554}{0,628} \times 100 \% = 11,783 \%$$

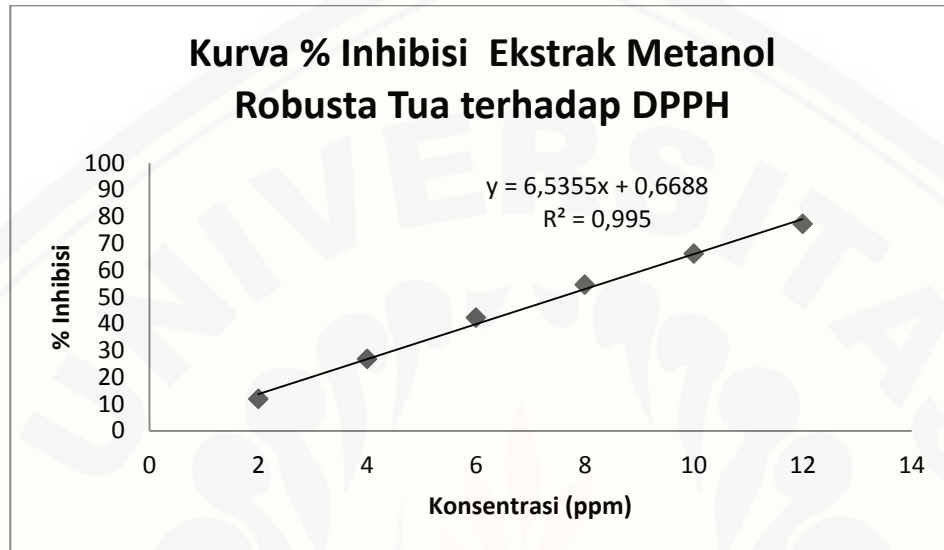
$$\text{b) } 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628-0,460}{0,628} \times 100 \% = 26,751 \%$$

$$\text{c) } 6 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628-0,363}{0,628} \times 100 \% = 42,197 \%$$

$$\text{d) } 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628-0,286}{0,628} \times 100 \% = 54,459 \%$$

$$e) 10 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628-0,213}{0,628} \times 100 \% = 66,083 \%$$

$$f) 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628-0,143}{0,628} \times 100 \% = 77,229 \%$$



Persamaan regresi : $y = 6,5355x + 0,6688$

$$R^2 = 0,995$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 6,5355x + 0,6688$$

$$x = \frac{50-0,6688}{6,5355}$$

$$x = 7,548$$

$$IC_{50} = 7,548 \mu\text{g/ml}$$

-Replikasi 2

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,558	2,000	11,146
0,460	4,000	26,751
0,358	6,000	42,994
0,282	8,000	55,095
0,211	10,000	66,401
0,138	12,000	78,025

Absorbansi Kontrol = 0,628

Perhitungan Persen Peredaman

$$a) 2 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628-0,558}{0,628} \times 100 \% = 11,146 \%$$

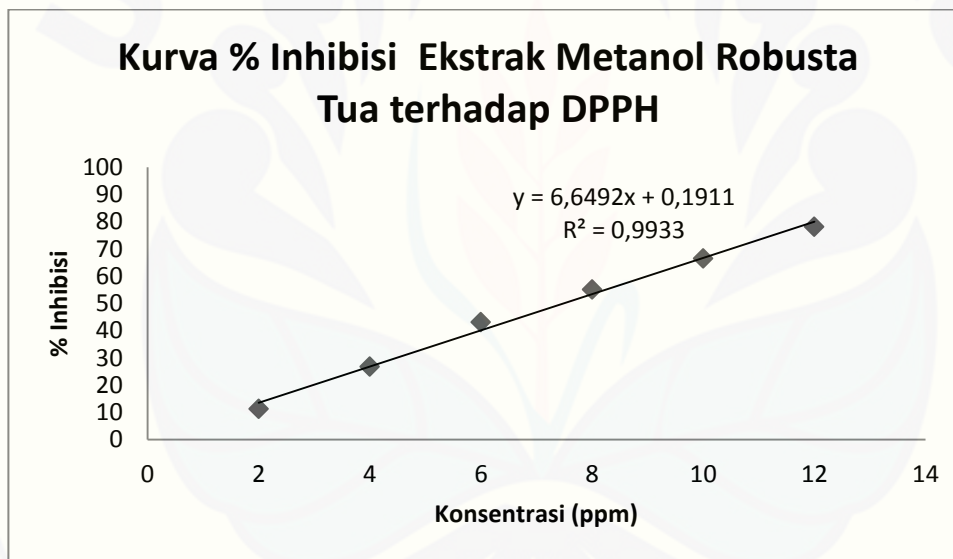
$$b) 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759-0,460}{0,628} \times 100 \% = 26,751 \%$$

$$c) 6 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628-0,358}{0,628} \times 100 \% = 42,994 \%$$

$$d) 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759-0,282}{0,628} \times 100 \% = 55,095 \%$$

$$e) 10 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759-0,211}{0,628} \times 100 \% = 66,401 \%$$

$$f) 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628-0,138}{0,628} \times 100 \% = 78,025 \%$$



Persamaan regresi : $y = 6,6492x + 0,1911$

$$R^2 = 0,9933$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 6,6492x + 0,1911$$

$$x = \frac{50-0,1911}{6,6492}$$

$$x = 7,491$$

$$IC_{50} = 7,491 \mu\text{g/ml}$$

-Replikasi 3

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,554	2,000	11,783
0,458	4,000	27,070
0,362	6,000	42,357
0,289	8,000	53,981
0,210	10,000	66,561
0,139	12,000	77,866

Absorbansi Kontrol = 0,628

Perhitungan Persen Peredaman

$$\text{a) } 2 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628 - 0,554}{0,628} \times 100 \% = 11,783 \%$$

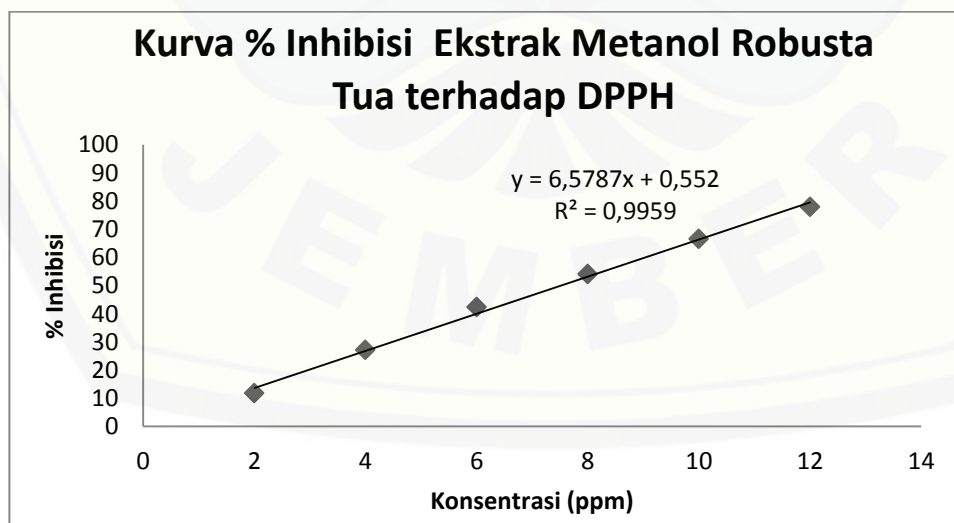
$$\text{b) } 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,458}{0,628} \times 100 \% = 27,070 \%$$

$$\text{c) } 6 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628 - 0,362}{0,628} \times 100 \% = 42,357 \%$$

$$\text{d) } 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,289}{0,628} \times 100 \% = 53,981 \%$$

$$\text{e) } 10 \mu\text{g/ml} = \frac{0,759 - 0,210}{0,628} \times 100 \% = 66,561 \%$$

$$\text{f) } 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,628 - 0,139}{0,628} \times 100 \% = 77,866 \%$$



Persamaan regresi : $y = 6,5787x - 0,552$

$$R^2 = 0,9959$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 6,5787x - 0,552$$

$$x = \frac{50+0,552}{6,5787}$$

$$x = 7,516$$

$$IC_{50} = 7,516 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Rata-rata } IC_{50} = \frac{7,548 + 7,491 + 7,516}{3} = 7,519 \mu\text{g/ml}$$

$$SD = 0,029$$

$$RSD = 0,381 \%$$

H.3 Ekstrak Metanol Arabika Tua

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,579	2,000	11,196
0,496	4,000	23,926
0,400	6,000	38,650
0,356	8,000	45,399
0,269	10,000	58,742
0,162	12,000	75,153

Absorbansi Kontrol = 0,652

Perhitungan Persen Peredaman

$$\text{a) } 2 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652-0,597}{0,652} \times 100 \% = 11,196 \%$$

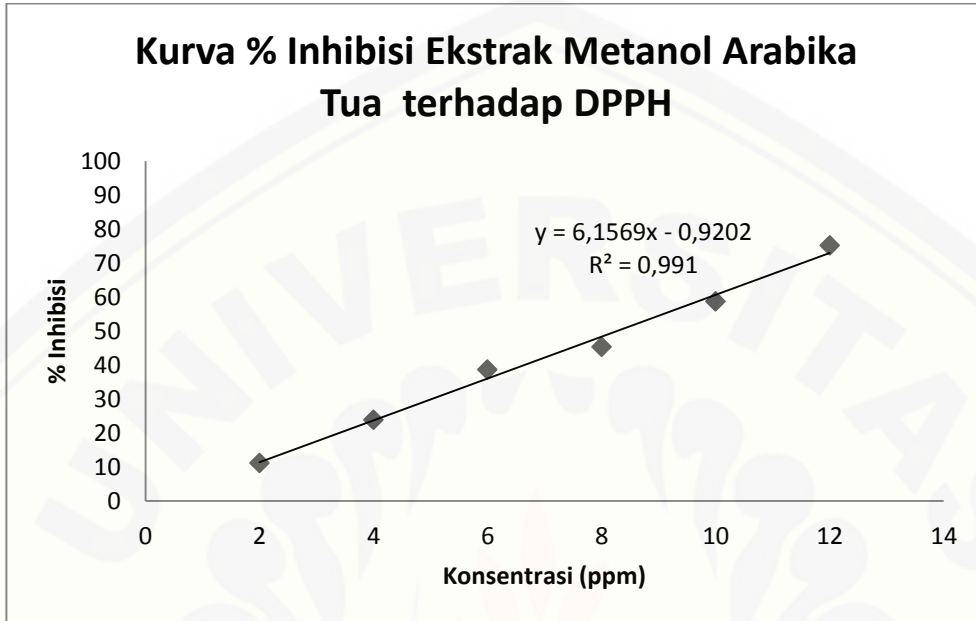
$$\text{b) } 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652-0,496}{0,652} \times 100 \% = 23,926 \%$$

$$\text{c) } 6 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652-0,400}{0,652} \times 100 \% = 38,650 \%$$

$$\text{d) } 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652-0,356}{0,652} \times 100 \% = 45,399 \%$$

$$\text{e) } 10 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652-0,269}{0,652} \times 100 \% = 58,742 \%$$

$$f) 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652 - 0,162}{0,652} \times 100 \% = 75,153 \%$$



Persamaan regresi : $y = 6,1569x - 0,9202$

$$R^2 = 0,991$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 6,1569x - 0,9202$$

$$x = \frac{50 + 0,9202}{6,1569}$$

$$x = 8,270$$

$$IC_{50} = 8,270 \mu\text{g/ml}$$

-Replikasi 2

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,585	2,000	10,276
0,496	4,000	23,926
0,403	6,000	38,190
0,360	8,000	44,785
0,269	10,000	58,742
0,162	12,000	75,153

Absorbansi Kontrol = 0,652

Perhitungan Persen Peredaman

$$a) 2 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652-0,585}{0,652} \times 100 \% = 10,276 \%$$

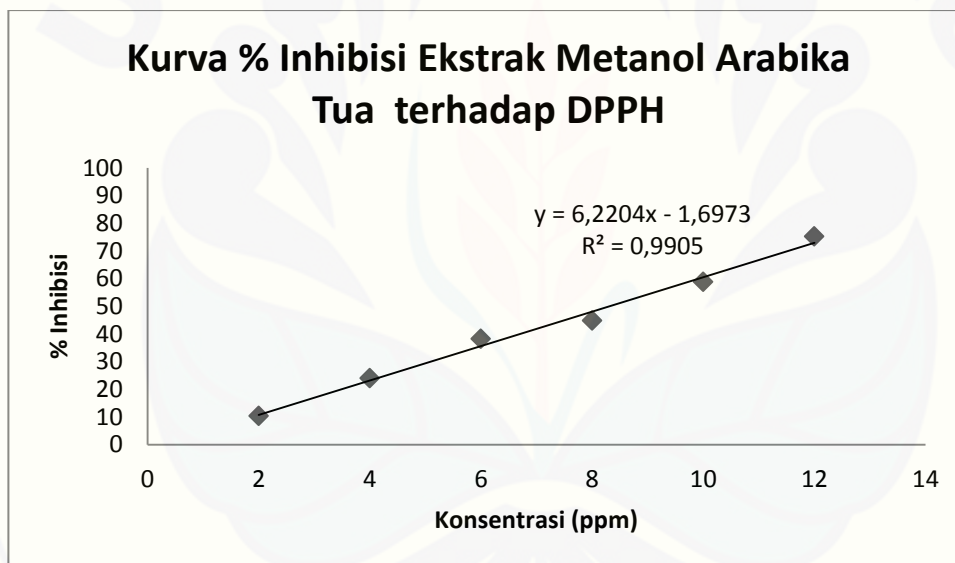
$$b) 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652-0,496}{0,652} \times 100 \% = 23,926 \%$$

$$c) 6 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652-0,403}{0,652} \times 100 \% = 38,190 \%$$

$$d) 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652-0,360}{0,652} \times 100 \% = 44,785 \%$$

$$e) 10 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652-0,269}{0,652} \times 100 \% = 58,742 \%$$

$$f) 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652-0,162}{0,652} \times 100 \% = 75,153 \%$$



Persamaan regresi : $y = 6,2204x - 1,6973$

$$R^2 = 0,9905$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 6,2204x - 1,6973$$

$$x = \frac{50+1,6973}{6,2204}$$

$$x = 8,311$$

$$IC_{50} = 8,311 \mu\text{g/ml}$$

-Replikasi 3

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,582	1,992	10,736
0,498	3,984	23,620
0,414	5,976	36,503
0,358	7,968	45,092
0,274	9,960	57,975
0,167	11,952	74,387

Absorbansi Kontrol = 0,652

Perhitungan Persen Peredaman

$$\text{a) } 2 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652 - 0,582}{0,652} \times 100 \% = 10,736 \%$$

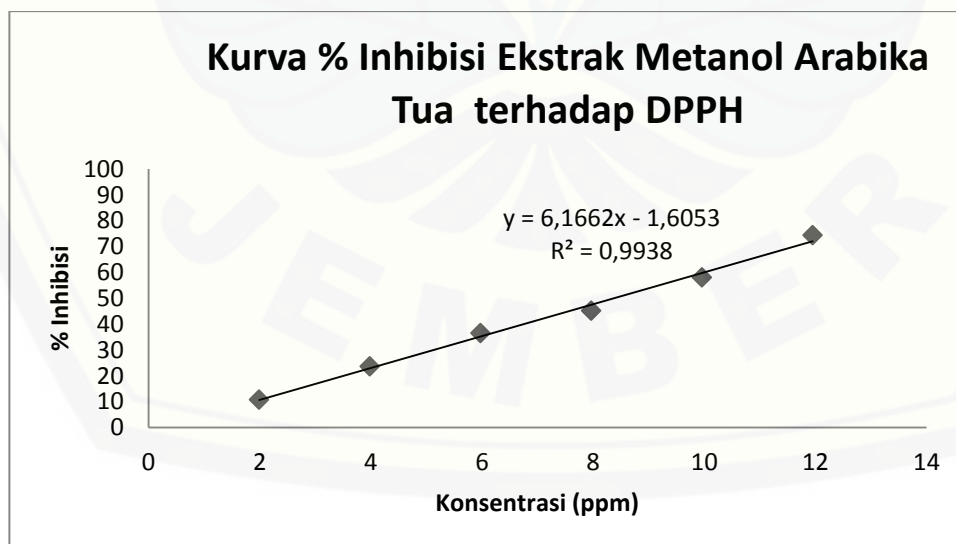
$$\text{b) } 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652 - 0,498}{0,652} \times 100 \% = 23,620 \%$$

$$\text{c) } 6 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652 - 0,414}{0,652} \times 100 \% = 36,503 \%$$

$$\text{d) } 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652 - 0,358}{0,652} \times 100 \% = 45,092 \%$$

$$\text{e) } 10 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652 - 0,274}{0,652} \times 100 \% = 57,975 \%$$

$$\text{f) } 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,652 - 0,167}{0,652} \times 100 \% = 74,387 \%$$



Persamaan regresi : $y = 6,1662x - 1,6053$

$$R^2 = 0,9938$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 6,1662x - 1,6053$$

$$x = \frac{50+1,6053}{6,1662}$$

$$x = 8,369$$

$$IC_{50} = 8,369 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Rata-rata } IC_{50} = \frac{8,270 + 8,311 + 8,369}{3} = 8,317 \mu\text{g/ml}$$

$$SD = 0,050$$

$$RSD = 0,596 \%$$

H.4 Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Muda

Replikasi 1

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,639	4,000	11,618
0,527	8,000	27,109
0,415	12,000	42,600
0,305	16,000	57,815
0,161	20,000	77,732
0,073	24,000	89,903

Absorbansi Kontrol = 0,723

Perhitungan Persen Peredaman

$$\text{a) } 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,639}{0,723} \times 100 \% = 11,618 \%$$

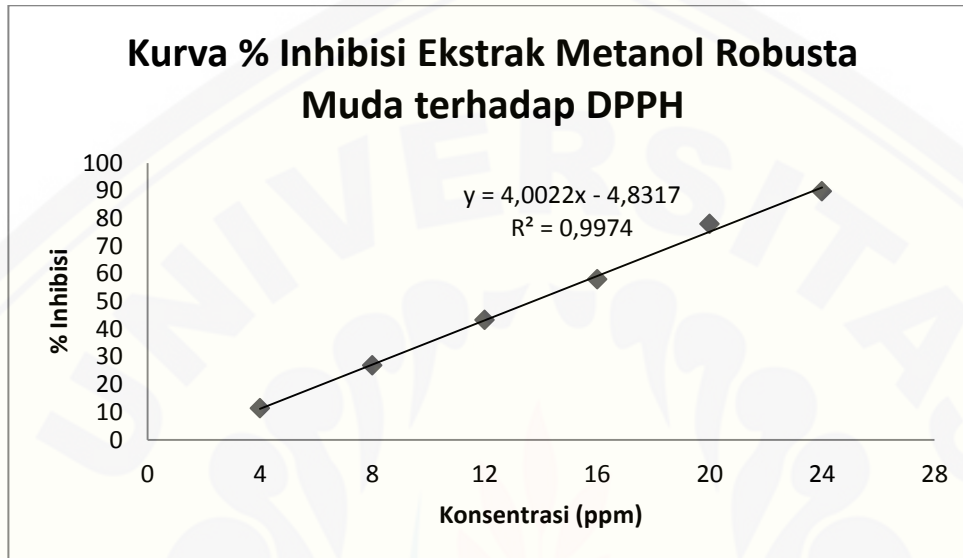
$$\text{b) } 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,527}{0,723} \times 100 \% = 27,109 \%$$

$$\text{c) } 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,415}{0,723} \times 100 \% = 42,600 \%$$

$$\text{d) } 16 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,305}{0,723} \times 100 \% = 57,815 \%$$

$$e) 20 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,161}{0,723} \times 100 \% = 77,732 \%$$

$$f) 24 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,073}{0,723} \times 100 \% = 89,903 \%$$



Persamaan regresi : $y = 3,9893x - 4,7211$

$$R^2 = 0,9977$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 3,9893x - 4,7211$$

$$x = \frac{50+4,7211}{3,9893}$$

$$x = 13,717$$

$$IC_{50} = 13,717 \mu\text{g/ml}$$

Replikasi 2

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,641	4,000	11,342
0,529	8,000	26,833
0,410	12,000	43,292
0,304	16,000	57,953
0,159	20,000	78,008
0,074	24,000	89,765

Absorbansi Kontrol = 0,723

Perhitungan Persen Peredaman

$$a) 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,641}{0,723} \times 100 \% = 11,342 \%$$

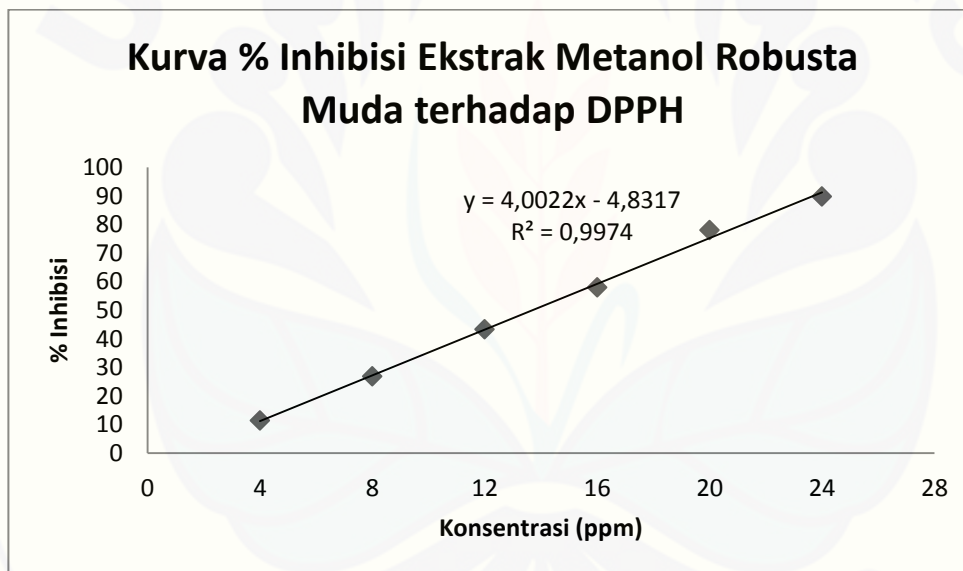
$$b) 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,529}{0,723} \times 100 \% = 26,833 \%$$

$$c) 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,410}{0,723} \times 100 \% = 43,292 \%$$

$$d) 16 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,304}{0,723} \times 100 \% = 57,953 \%$$

$$e) 20 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,159}{0,723} \times 100 \% = 78,008 \%$$

$$f) 24 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,074}{0,723} \times 100 \% = 89,765 \%$$



Persamaan regresi : $y = 4,0022x - 4,8317$

$$R^2 = 0,9974$$

Perhitungan IC₅₀

$$50 = 4,0022x - 4,8317$$

$$x = \frac{50+4,8317}{4,0022}$$

$$x = 13,700$$

$$IC_{50} = 13,700 \mu\text{g/ml}$$

-Replikasi 3

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,643	4,000	11,065
0,527	8,000	27,109
0,413	12,000	42,877
0,292	16,000	59,613
0,155	20,000	78,562
0,072	24,000	90,041

Absorbansi Kontrol = 0,723

Perhitungan % Peredaman

$$\text{a) } 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,643}{0,723} \times 100 \% = 11,065 \%$$

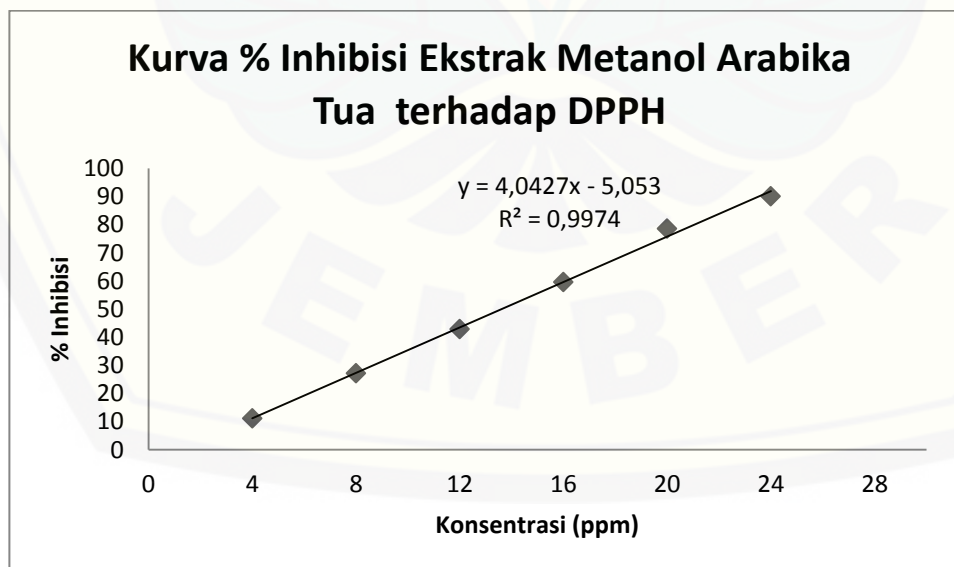
$$\text{b) } 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,527}{0,723} \times 100 \% = 27,109 \%$$

$$\text{c) } 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,413}{0,723} \times 100 \% = 42,877 \%$$

$$\text{d) } 16 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,292}{0,723} \times 100 \% = 59,613 \%$$

$$\text{e) } 20 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,155}{0,723} \times 100 \% = 78,562 \%$$

$$\text{f) } 24 \mu\text{g/ml} = \frac{0,723-0,072}{0,723} \times 100 \% = 90,041 \%$$



Persamaan regresi : $y = 4,0427x - 5,053$

$$R^2 = 0,9974$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 4,0427x - 5,053$$

$$x = \frac{50+5,053}{4,0427}$$

$$x = 13,618$$

$$IC_{50} = 13,618 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Rata-rata } IC_{50} = \frac{13,717 + 13,700 + 13,618}{3} = 13,678 \mu\text{g/ml}$$

$$SD = 0,053$$

$$RSD = 0,388 \%$$

H.5 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda

-Replikasi 1

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredamani
0,671	4,000	7,576
0,548	8,000	24,518
0,425	12,000	41,460
0,341	16,000	53,030
0,257	20,000	64,601
0,156	24,000	78,512

Absorbansi Kontrol = 0,726

Perhitungan % Peredaman

$$\text{a) } 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726 - 0,671}{0,726} \times 100 \% = 7,576 \%$$

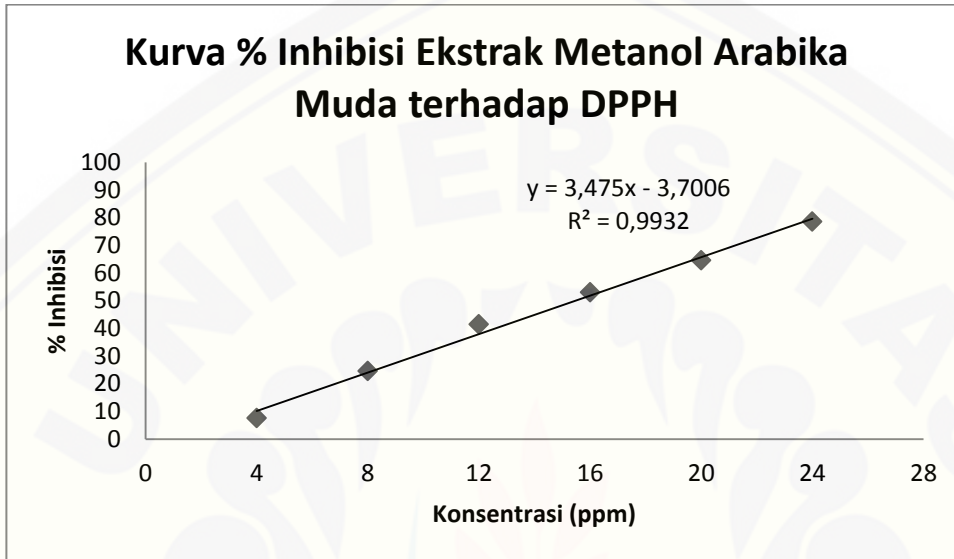
$$\text{b) } 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726 - 0,548}{0,726} \times 100 \% = 24,518 \%$$

$$\text{c) } 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726 - 0,425}{0,726} \times 100 \% = 41,460 \%$$

$$\text{d) } 16 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726 - 0,341}{0,726} \times 100 \% = 53,030 \%$$

e) $20 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726-0,257}{0,726} \times 100 \% = 64,601 \%$

f) $24 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726-0,156}{0,726} \times 100 \% = 78,512 \%$



Persamaan regresi : $y = 3,475x - 3,7006$

$R^2 = 0,9932$

Perhitungan IC_{50}

$50 = 3,475x - 3,7006$

$x = \frac{50+3,7006}{3,475}$

$x = 15,453$

$IC_{50} = 15,453 \mu\text{g/ml}$

-Replikasi 2

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,672	3,984	7,438
0,549	7,968	24,380
0,445	11,952	38,705
0,355	15,936	51,102
0,258	19,920	64,463
0,156	23,904	78,512

Absorbansi Kontrol = 0,726

Perhitungan Persen Peredaman

$$a) 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726-0,672}{0,726} \times 100 \% = 7,438 \%$$

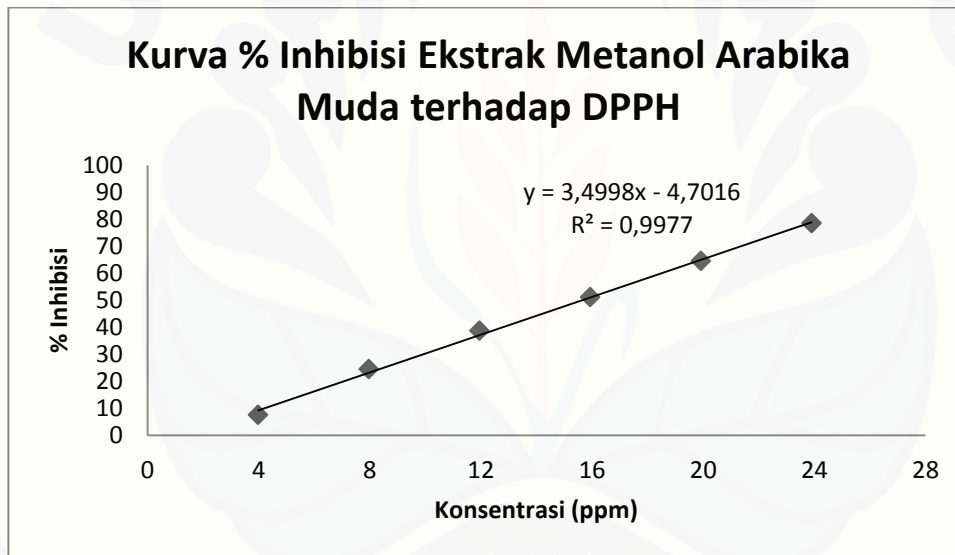
$$b) 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726-0,549}{0,726} \times 100 \% = 24,380 \%$$

$$c) 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726-0,445}{0,726} \times 100 \% = 38,705 \%$$

$$d) 16 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726-0,355}{0,726} \times 100 \% = 51,102 \%$$

$$e) 20 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726-0,258}{0,726} \times 100 \% = 64,463 \%$$

$$f) 24 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726-0,156}{0,726} \times 100 \% = 78,512 \%$$



Persamaan regresi : $y = 3,4998x - 4,7016$

$$R^2 = 0,9977$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 3,4998x - 4,7016$$

$$x = \frac{50+4,7016}{3,4998}$$

$$x = 15,630$$

$$IC_{50} = 15,630 \mu\text{g/ml}$$

-Replikasi 3

Absorbansi	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Peredaman
0,675	4,000	7,025
0,554	8,000	23,691
0,446	12,000	38,567
0,354	16,000	51,240
0,238	20,000	67,218
0,150	24,000	79,339

Absorbansi Kontrol = 0,726

Perhitungan % Peredaman

$$\text{a) } 4 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726 - 0,675}{0,726} \times 100 \% = 7,025 \%$$

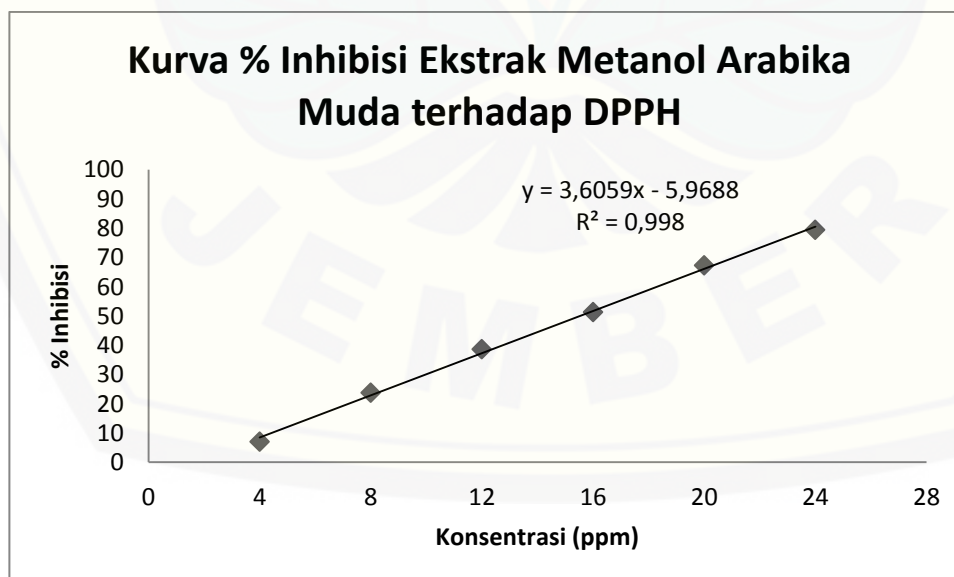
$$\text{b) } 8 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726 - 0,554}{0,726} \times 100 \% = 23,691 \%$$

$$\text{c) } 12 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726 - 0,446}{0,726} \times 100 \% = 38,567 \%$$

$$\text{d) } 16 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726 - 0,354}{0,726} \times 100 \% = 51,240 \%$$

$$\text{e) } 20 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726 - 0,238}{0,726} \times 100 \% = 67,218 \%$$

$$\text{f) } 24 \mu\text{g/ml} = \frac{0,726 - 0,150}{0,726} \times 100 \% = 79,339 \%$$



Persamaan regresi : $y = 3,6059x - 5,9688$

$$R^2 = 0,998$$

Perhitungan IC_{50}

$$50 = 3,6059x - 5,9688$$

$$x = \frac{50+5,9688}{3,6059}$$

$$x = 15,521$$

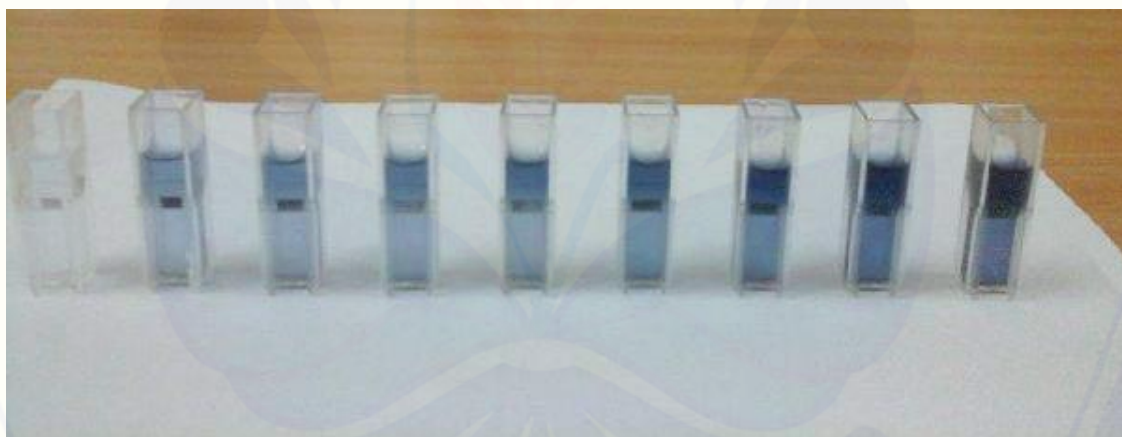
$$IC_{50} = 15,521 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Rata-rata } IC_{50} = \frac{15,453 + 15,630 + 15,521}{3} = 15,535 \mu\text{g/ml}$$

$$SD = 0,089$$

$$RSD = 0,573 \%$$

Lampiran I. Gambar Penetapan Kadar Fenol Total



Lampiran J.Data Absorbansi Penetapan Kadar Fenol

J.1 Asam Klorogenat 10 µg/ml

U-1800 Spectrophotometer

Serial NUM: 5730116
 ROM Version: 07
 Sample Name:
 Date:
 Operator:

Wavelength Scan
 Data Mode: ABS
 Scan Range: 1000.0-400.0nm
 Slit Width: 4nm
 Speed(nm/min): 400nm/min
 Lamp Change Wavelength: 340.0nm
 Path Length:

ALL Data							
WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS	WL(nm)	ABS
1000.0	0.443	999.0	0.444	998.0	0.445	997.0	0.447
996.0	0.448	995.0	0.449	994.0	0.450	993.0	0.452
992.0	0.453	991.0	0.455	990.0	0.456	989.0	0.457
988.0	0.458	987.0	0.459	986.0	0.460	985.0	0.461
984.0	0.462	983.0	0.463	982.0	0.464	981.0	0.465
980.0	0.466	979.0	0.467	978.0	0.468	977.0	0.469
976.0	0.470	975.0	0.472	974.0	0.473	973.0	0.474
972.0	0.475	971.0	0.477	970.0	0.478	969.0	0.479
968.0	0.480	967.0	0.481	966.0	0.482	965.0	0.483
964.0	0.484	963.0	0.485	962.0	0.486	961.0	0.487
960.0	0.488	959.0	0.490	958.0	0.491	957.0	0.493
956.0	0.494	955.0	0.496	954.0	0.497	953.0	0.499
952.0	0.500	951.0	0.502	950.0	0.503	949.0	0.505
948.0	0.506	947.0	0.507	946.0	0.508	945.0	0.510
944.0	0.511	943.0	0.513	942.0	0.514	941.0	0.515
940.0	0.516	939.0	0.518	938.0	0.519	937.0	0.520
936.0	0.521	935.0	0.523	934.0	0.524	933.0	0.525
932.0	0.526	931.0	0.528	930.0	0.529	929.0	0.530
928.0	0.531	927.0	0.532	926.0	0.533	925.0	0.534
924.0	0.535	923.0	0.536	922.0	0.537	921.0	0.538
920.0	0.539	919.0	0.541	918.0	0.542	917.0	0.543
916.0	0.544	915.0	0.545	914.0	0.546	913.0	0.547
912.0	0.547	911.0	0.549	910.0	0.550	909.0	0.551
908.0	0.551	907.0	0.552	906.0	0.553	905.0	0.554
904.0	0.555	903.0	0.555	902.0	0.556	901.0	0.557
900.0	0.558	899.0	0.559	898.0	0.560	897.0	0.560
896.0	0.561	895.0	0.562	894.0	0.563	893.0	0.564
892.0	0.564	891.0	0.565	890.0	0.566	889.0	0.566
888.0	0.567	887.0	0.568	886.0	0.569	885.0	0.570
884.0	0.571	883.0	0.572	882.0	0.573	881.0	0.573
880.0	0.574	879.0	0.575	878.0	0.576	877.0	0.577
876.0	0.578	875.0	0.579	874.0	0.580	873.0	0.581
872.0	0.582	871.0	0.583	870.0	0.584	869.0	0.585
868.0	0.586	867.0	0.587	866.0	0.588	865.0	0.589
864.0	0.590	863.0	0.591	862.0	0.592	861.0	0.593
860.0	0.594	859.0	0.595	858.0	0.596	857.0	0.597
856.0	0.598	855.0	0.599	854.0	0.600	853.0	0.601
852.0	0.602	851.0	0.604	850.0	0.605	849.0	0.606
848.0	0.608	847.0	0.609	846.0	0.610	845.0	0.611
844.0	0.612	843.0	0.614	842.0	0.615	841.0	0.616
840.0	0.617	839.0	0.618	838.0	0.620	837.0	0.621
836.0	0.622	835.0	0.624	834.0	0.625	833.0	0.627
832.0	0.628	831.0	0.629	830.0	0.631	829.0	0.632
828.0	0.633	827.0	0.635	826.0	0.636	825.0	0.637
824.0	0.639	823.0	0.640	822.0	0.642	821.0	0.643
820.0	0.645	819.0	0.646	818.0	0.647	817.0	0.649
816.0	0.650	815.0	0.652	814.0	0.654	813.0	0.655
812.0	0.657	811.0	0.658	810.0	0.660	809.0	0.661
808.0	0.662	807.0	0.663	806.0	0.665	805.0	0.666
804.0	0.668	803.0	0.669	802.0	0.670	801.0	0.672
800.0	0.673	799.0	0.674	798.0	0.676	797.0	0.677
796.0	0.678	795.0	0.680	794.0	0.681	793.0	0.682
792.0	0.684	791.0	0.685	790.0	0.686	789.0	0.688
788.0	0.689	787.0	0.690	786.0	0.691	785.0	0.692
784.0	0.693	783.0	0.694	782.0	0.696	781.0	0.696
780.0	0.697	779.0	0.699	778.0	0.700	777.0	0.701
776.0	0.702	775.0	0.703	774.0	0.704	773.0	0.705
772.0	0.706	771.0	0.707	770.0	0.708	769.0	0.709

764.0	0.712	763.0	0.712	762.0	0.712	761.0	0.713
760.0	0.714	759.0	0.714	758.0	0.715	757.0	0.715
756.0	0.716	755.0	0.717	754.0	0.717	753.0	0.717
752.0	0.718	751.0	0.718	750.0	0.718	749.0	0.718
748.0	0.719	747.0	0.719	746.0	0.720	745.0	0.720
744.0	0.720	743.0	0.720	742.0	0.720	741.0	0.720
740.0	0.720	739.0	0.720	738.0	0.720	737.0	0.720
736.0	0.720	735.0	0.720	734.0	0.720	733.0	0.720
732.0	0.719	731.0	0.719	730.0	0.719	729.0	0.718
728.0	0.718	727.0	0.718	726.0	0.717	725.0	0.717
724.0	0.717	723.0	0.716	722.0	0.716	721.0	0.715
720.0	0.715	719.0	0.714	718.0	0.714	717.0	0.713
716.0	0.713	715.0	0.712	714.0	0.712	713.0	0.711
712.0	0.710	711.0	0.710	710.0	0.709	709.0	0.708
708.0	0.708	707.0	0.707	706.0	0.706	705.0	0.706
704.0	0.705	703.0	0.704	702.0	0.704	701.0	0.703
700.0	0.702	699.0	0.701	698.0	0.700	697.0	0.700
696.0	0.699	695.0	0.698	694.0	0.697	693.0	0.696
692.0	0.695	691.0	0.694	690.0	0.693	689.0	0.692
688.0	0.691	687.0	0.690	686.0	0.689	685.0	0.688
684.0	0.687	683.0	0.686	682.0	0.685	681.0	0.684
680.0	0.684	679.0	0.683	678.0	0.682	677.0	0.680
676.0	0.679	675.0	0.678	674.0	0.677	673.0	0.676
672.0	0.675	671.0	0.674	670.0	0.673	669.0	0.673
668.0	0.672	667.0	0.671	666.0	0.670	665.0	0.669
664.0	0.668	663.0	0.667	662.0	0.666	661.0	0.665
660.0	0.664	659.0	0.663	658.0	0.662	657.0	0.661
656.0	0.660	655.0	0.660	654.0	0.659	653.0	0.658
652.0	0.656	651.0	0.655	650.0	0.654	649.0	0.653
648.0	0.652	647.0	0.651	646.0	0.650	645.0	0.649
644.0	0.648	643.0	0.647	642.0	0.646	641.0	0.645
640.0	0.644	639.0	0.643	638.0	0.642	637.0	0.641
636.0	0.640	635.0	0.638	634.0	0.637	633.0	0.636
632.0	0.635	631.0	0.634	630.0	0.633	629.0	0.632
628.0	0.631	627.0	0.630	626.0	0.629	625.0	0.628
624.0	0.627	623.0	0.626	622.0	0.624	621.0	0.623
620.0	0.622	619.0	0.621	618.0	0.620	617.0	0.618
616.0	0.617	615.0	0.616	614.0	0.615	613.0	0.613
612.0	0.612	611.0	0.611	610.0	0.610	609.0	0.608
608.0	0.607	607.0	0.606	606.0	0.605	605.0	0.603
604.0	0.602	603.0	0.600	602.0	0.599	601.0	0.598
600.0	0.597	599.0	0.598	598.0	0.597	597.0	0.595
596.0	0.594	595.0	0.593	594.0	0.592	593.0	0.590
592.0	0.589	591.0	0.588	590.0	0.587	589.0	0.586
588.0	0.584	587.0	0.583	586.0	0.581	585.0	0.579
584.0	0.577	583.0	0.575	582.0	0.572	581.0	0.569
580.0	0.567	579.0	0.565	578.0	0.563	577.0	0.562
576.0	0.560	575.0	0.558	574.0	0.557	573.0	0.556
572.0	0.554	571.0	0.553	570.0	0.552	569.0	0.551
568.0	0.549	567.0	0.547	566.0	0.545	565.0	0.544
564.0	0.542	563.0	0.540	562.0	0.539	561.0	0.537
560.0	0.535	559.0	0.534	558.0	0.532	557.0	0.531
556.0	0.529	555.0	0.528	554.0	0.526	553.0	0.524
552.0	0.522	551.0	0.521	550.0	0.519	549.0	0.517
548.0	0.516	547.0	0.515	546.0	0.513	545.0	0.511
544.0	0.508	543.0	0.507	542.0	0.505	541.0	0.503
540.0	0.502	539.0	0.500	538.0	0.497	537.0	0.496
536.0	0.494	535.0	0.492	534.0	0.490	533.0	0.487
532.0	0.485	531.0	0.483	530.0	0.481	529.0	0.480
528.0	0.477	527.0	0.475	526.0	0.473	525.0	0.471
524.0	0.470	523.0	0.467	522.0	0.465	521.0	0.462
520.0	0.461	519.0	0.459	518.0	0.457	517.0	0.455
516.0	0.453	515.0	0.451	514.0	0.450	513.0	0.448
512.0	0.445	511.0	0.443	510.0	0.442	509.0	0.440
508.0	0.438	507.0	0.436	506.0	0.434	505.0	0.432
504.0	0.431	503.0	0.429	502.0	0.427	501.0	0.425
500.0	0.423	499.0	0.422	498.0	0.420	497.0	0.419
496.0	0.417	495.0	0.415	494.0	0.414	493.0	0.412
492.0	0.410	491.0	0.409	490.0	0.407	489.0	0.406
488.0	0.404	487.0	0.403	486.0	0.401	485.0	0.399
484.0	0.398	483.0	0.396	482.0	0.394	481.0	0.393
480.0	0.391	479.0	0.389	478.0	0.388	477.0	0.386
476.0	0.384	475.0	0.383	474.0	0.381	473.0	0.379
472.0	0.377	471.0	0.376	470.0	0.374	469.0	0.372
468.0	0.370	467.0	0.369	466.0	0.367	465.0	0.365
464.0	0.363	463.0	0.361	462.0	0.359	461.0	0.357
460.0	0.355	459.0	0.353	458.0	0.351	457.0	0.349
456.0	0.347	455.0	0.345	454.0	0.343	453.0	0.341
452.0	0.338	451.0	0.336	450.0	0.334	449.0	0.332
448.0	0.330	447.0	0.328	446.0	0.326	445.0	0.323

440.0	0.314	439.0	0.311	438.0	0.309	437.0	0.307
436.0	0.306	435.0	0.304	434.0	0.302	433.0	0.300
432.0	0.299	431.0	0.297	430.0	0.295	429.0	0.294
428.0	0.293	427.0	0.292	426.0	0.291	425.0	0.290
424.0	0.289	423.0	0.288	422.0	0.287	421.0	0.287
420.0	0.287	419.0	0.286	418.0	0.285	417.0	0.285
416.0	0.285	415.0	0.284	414.0	0.284	413.0	0.284
412.0	0.285	411.0	0.285	410.0	0.286	409.0	0.285
408.0	0.286	407.0	0.287	406.0	0.288	405.0	0.289
404.0	0.290	403.0	0.292	402.0	0.293	401.0	0.295
400.0	0.297						

J.2 Standar Asam Klorogenat

```

Concentration
Data Mode:          ABS
WL:                 743.0nm
Type:               1st
K1: 17.43
K0: -2.640
R: 0.999
R2: 0.999
Lamp Change Wavelength: 340.0nm
Path Length:

STD
ID      ABS      CONC
1       0.424      5.000
2       0.583      7.500
3       0.711      10.00
4       0.889      12.50
5       1.043      15.00
6       1.267      20.00
7       1.624      25.00
8       1.842      30.00
    
```

J.3 Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Tua

```

%T/ABS
Data Mode:          ABS
WL:                 743.0
Lamp Change Wavelength: 340.0nm
Path Length:

ID      ABS      ID      ABS      ID      ABS      ID      ABS
1       1.311      2       1.306      3       1.299
    
```

J.4 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Tua

```

%T/ABS
Data Mode:          ABS
WL:                 743.0
Lamp Change Wavelength: 340.0nm
Path Length:

ID      ABS      ID      ABS      ID      ABS      ID      ABS
1       1.172      2       1.164      3       1.167
    
```

J.5 Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Muda

```

%T/ABS
Data Mode:          ABS
WL:                 743.0
Lamp Change Wavelength: 340.0nm
Path Length:
  
```

ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS
1	0.849	2	0.850	3	0.861		

J.6 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda

```

%T/ABS
Data Mode:          ABS
WL:                 743.0
Lamp Change Wavelength: 340.0nm
Path Length:
  
```

ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS	ID	ABS
1	0.695	2	0.707	3	0.700		

Lampiran K. Pembuatan Larutan pada Penetapan Kadar Fenol Total

K.I Larutan Asam Klorogenat

-Larutan Induk

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

-Pengenceran

a) $\frac{1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$

b) $\frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/ml} = 150 \text{ } \mu\text{g/ml}$

c) $\frac{2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 200 \text{ } \mu\text{g/ml}$

d) $\frac{5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 500 \text{ } \mu\text{g/ml} = 250 \text{ } \mu\text{g/ml}$

e) $\frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 300 \text{ } \mu\text{g/ml}$

f) $\frac{4 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 400 \text{ } \mu\text{g/ml}$

g) $\frac{5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 500 \text{ } \mu\text{g/ml}$

h) $\frac{15 \text{ ml}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/ml} = 600 \text{ } \mu\text{g/ml}$

K.2 Larutan Ekstrak Metanol Robusta Tua

Replikasi 1

$$\frac{25,3 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1012 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Replikasi 2

$$\frac{25,2 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1008 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Replikasi 3

$$\frac{25,1 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1004 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

K.3 Larutan Ekstrak Metanol Arabika Tua

Replikasi 1, replikasi 2 dan replikasi 3

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

K.4 Larutan Uji Ekstrak Metanol Robusta Muda

Replikasi 1 dan replikasi 2

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Replikasi 3

$$\frac{25,1 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1004 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

K.5 Larutan Uji Ekstrak Metanol Arabika Muda

Replikasi 1 dan replikasi 3

$$\frac{25 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1000 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Replikasi 2

$$\frac{25,1 \text{ mg}}{25 \text{ ml}} \times 1000 \frac{\text{ml}}{\text{l}} = 1004 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

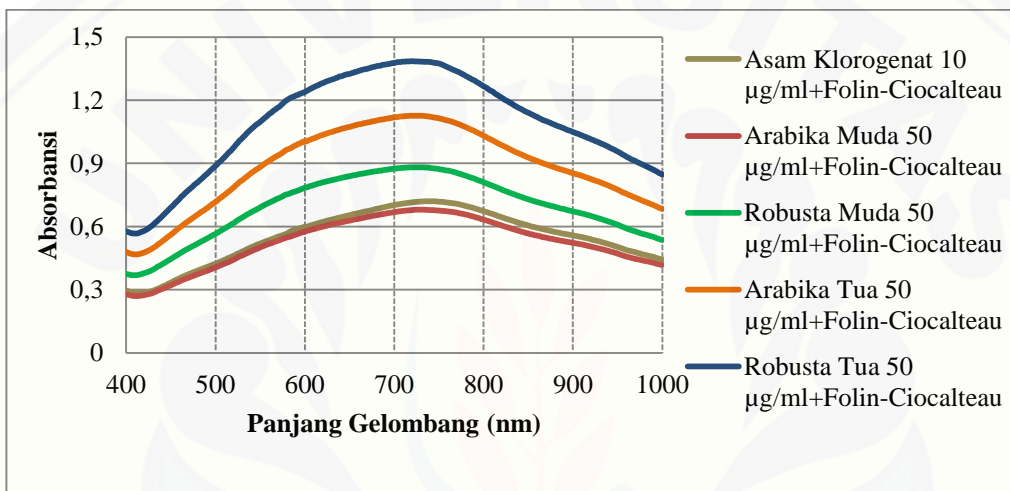
Lampiran L. Pembuatan Larutan Na₂CO₃ 20 %

$$\frac{20 \text{ g}}{100 \text{ ml}} = \frac{5 \text{ g}}{25 \text{ ml}}$$

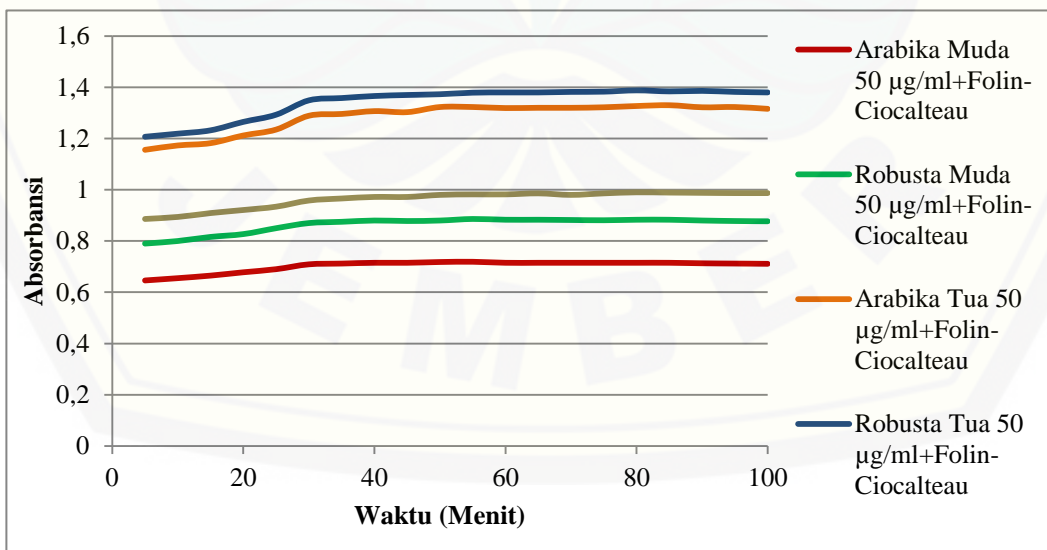
Ditimbang 5 g Na₂CO₃ dilarutkan dalam akuades ad 25 ml

Lampiran M. Hasil Spektra Optimasi Panjang Gelombang Maksimum Fenol

Data Mode : ABS
 Scan Range : 1000,0-400,0 nm
 Slide Width : 4 nm
 Speed (nm/min) : 400 nm/min
 Lamp Change Wavelength : 340,0 nm



Lampiran N. Hasil Optimasi Waktu Inkubasi



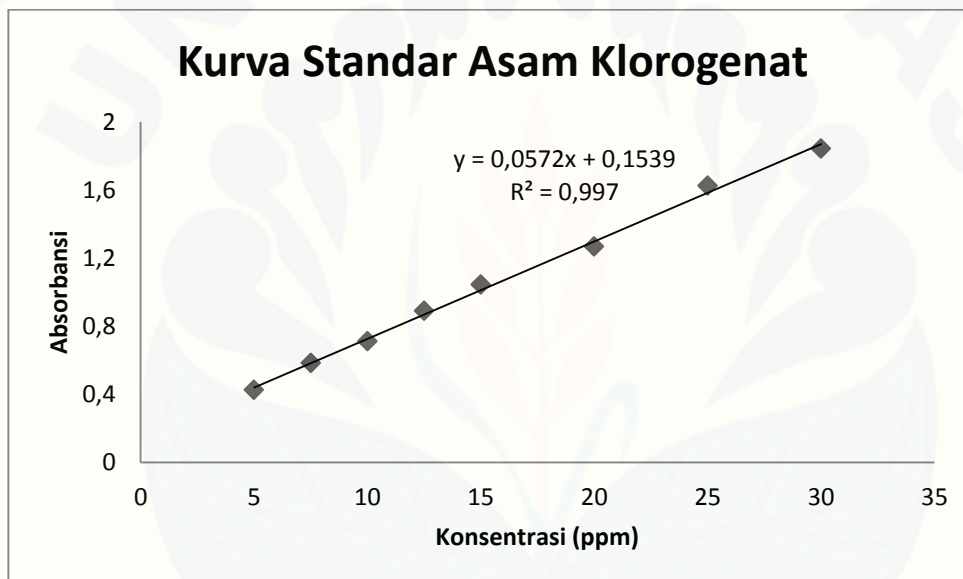
Waktu (Menit)	Absorbansi				
	Arabika Muda 50 $\mu\text{g/ml}$	Robusta Muda 50 $\mu\text{g/ml}$	Arabika Tua 50 $\mu\text{g/ml}$	Robusta Tua 50 $\mu\text{g/ml}$	Asam Klorogenat 15 $\mu\text{g/ml}$
5	0,646	0,790	1,156	1,207	0,886
10	0,655	0,800	1,173	1,219	0,894
15	0,665	0,816	1,182	1,232	0,909
20	0,678	0,827	1,212	1,265	0,921
25	0,690	0,850	1,235	1,293	0,934
30	0,709	0,870	1,289	1,349	0,958
35	0,712	0,875	1,296	1,358	0,966
40	0,715	0,880	1,307	1,366	0,972
45	0,715	0,878	1,303	1,370	0,972
50	0,718	0,880	1,323	1,373	0,980
55	0,719	0,886	1,323	1,379	0,982
60	0,715	0,883	1,319	1,380	0,982
65	0,715	0,883	1,320	1,380	0,986
70	0,715	0,882	1,320	1,382	0,980
75	0,715	0,881	1,322	1,383	0,986
80	0,715	0,883	1,327	1,388	0,990
85	0,715	0,883	1,330	1,384	0,989
90	0,713	0,880	1,322	1,386	0,988
95	0,712	0,878	1,323	1,382	0,987
100	0,711	0,877	1,316	1,380	0,987

Lampiran O. Perhitungan Hasil Pengukuran Kadar Fenol Total

Sampel	Penimbangan (mg)	Kadar Fenol Total (mg CAE/g ekstrak)	Rata-Rata	SD	RSD (%)
Robusta Tua	25,300	399,802	399,403	0,559	0,140
	25,200	399,643			
	25,100	398,765			
Arabika Tua	25,000	355,560	354,307	1,204	0,340
	25,000	353,160			
	25,000	354,200			
Robusta Muda	25,000	243,040	244,232	1,761	0,721
	25,000	243,400			
	25,100	244,232			
Arabika Muda	25,000	189,200	190,916	1,715	0,898
	25,100	192,629			
	25,000	190,920			

Standar : Asam Klorogenat

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi
5	0,424
7,5	0,583
10	0,711
12,5	0,889
15	1,043
20	1,267
25	1,624
30	1,842



Persamaan

$$y = 0,0572x + 0,1539$$

$$R^2 = 0,997$$

O.1. Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Tua

-Replikasi 1

$$1,311 = 0,0572x + 0,1539$$

$$x = 20,229 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$20,229 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} = 40,458 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 ml

$$\frac{40,458 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 10114,5 \mu\text{g} = 10,115 \text{ mg}$$

$$\frac{10,115 \text{ mg}}{25,3 \text{ mg}} = 399,802 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

-Replikasi 2

$$1,306 = 0,0572x + 0,1539$$

$$x = 20,142 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$20,142 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} = 40,283 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 ml

$$\frac{40,283 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 10070,750 \mu\text{g} = 10,071 \text{ mg}$$

$$\frac{10,071 \text{ mg}}{25,2 \text{ mg}} = 399,643 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

-Replikasi 3

$$1,299 = 0,0572x + 0,1539$$

$$x = 20,019 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$20,019 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} = 40,038 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 ml

$$\frac{40,038 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 10009,5 \mu\text{g} = 10,009 \text{ mg}$$

$$\frac{10,009 \text{ mg}}{25,1 \text{ mg}} = 398,765 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

Rata-rata kadar fenol total = 399,403 mgCAE/g ekstrak

SD = 0,559

RSD = 0,140 %

O.2 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Tua

-Replikasi 1

$$1,172 = 0,0572x + 0,1539$$

$$x = 17,799 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$17,799 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} = 35,598 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 ml

$$\frac{35,598 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 8899,500 \mu\text{g} = 8,899 \text{ mg}$$

$$\frac{8,899 \text{ mg}}{25 \text{ mg}} = 355,560 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

-Replikasi 2

$$1,164 = 0,0572x + 0,1539$$

$$x = 17,659 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$17,659 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} = 35,318 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 ml

$$\frac{35,318 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 8829,5 \mu\text{g} = 8,829 \text{ mg}$$

$$\frac{8,829 \text{ mg}}{25 \text{ mg}} = 353,160 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

-Replikasi 3

$$1,167 = 0,0572x + 0,1539$$

$$x = 17,711 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$17,711 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} = 35,422 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 ml

$$\frac{35,422 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 8855,5 \mu\text{g} = 8,855 \text{ mg}$$

$$\frac{8,855 \text{ mg}}{25 \text{ mg}} = 354,200 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

Rata-rata kadar fenol total = 354,307 mg CAE/g ekstrak

SD = 1,204

RSD = 0,340 %

O.3. Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta Muda

-Replikasi 1

$$0,849 = 0,0572x + 0,1539$$

$$x = 12,152 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$12,152 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} = 24,304 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 ml

$$\frac{24,304 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 6076 \mu\text{g} = 6,076 \text{ mg}$$

$$\frac{6,076 \text{ mg}}{25 \text{ mg}} = 243,040 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

-Replikasi 2

$$0,850 = 0,0572x + 0,1539$$

$$x = 12,169 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$12,169 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ ml} = 24,338 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 ml

$$\frac{24,338 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 6084,5 \mu\text{g} = 6,085 \text{ mg}$$

$$\frac{6,085 \text{ mg}}{25 \text{ mg}} = 243,400 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

-Replikasi 3

$$0,861 = 0,0572x + 0,1539$$

$$x = 12,362 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$12,362 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ ml} = 24,724 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 l

$$\frac{24,724 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 6181 \mu\text{g} = 6,181 \text{ mg}$$

$$\frac{6,181 \text{ mg}}{25,1 \text{ mg}} = 246,255 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

Rata rata kadar fenol total : 244,232 mg CAE/g ekstrak

SD = 1,761

RSD = 0,721 %

O.4 Ekstrak Metanol Daun Kopi Arabika Muda

-Replikasi 1

$0,695 = 0,0572x + 0,1539$

$$x = 9,460 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$9,460 \mu\text{g/mL} \times 2 \text{ mL} = 18,92 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 ml

$$\frac{18,92 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ mL} = 4730 \mu\text{g} = 4,730 \text{ mg}$$

$$\frac{4,730 \text{ mg}}{25 \text{ mg}} = 189,200 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

-Replikasi 2

$0,707 = 0,0572x + 0,1539$

$$x = 9,669 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$9,669 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} = 19,338 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 ml

$$\frac{19,338 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 4834,500 \mu\text{g} = 4,835 \text{ mg}$$

$$\frac{4,835 \text{ mg}}{25,1 \text{ mg}} = 192,629 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

-Replikasi 3

$0,700 = 0,0572x + 0,1539$

$$x = 9,547 \mu\text{g/ml}$$

➤ Dalam 2 ml

$$9,547 \mu\text{g/ml} \times 2 \text{ ml} = 19,094 \mu\text{g}$$

➤ Dalam 25 ml

$$\frac{19,094 \mu\text{g}}{0,1 \text{ ml}} \times 25 \text{ ml} = 4773,5 \mu\text{g} = 4,773 \text{ mg}$$

$$\frac{4,773 \text{ mg}}{25 \text{ mg}} = 190,920 \text{ mg CAE/g ekstrak}$$

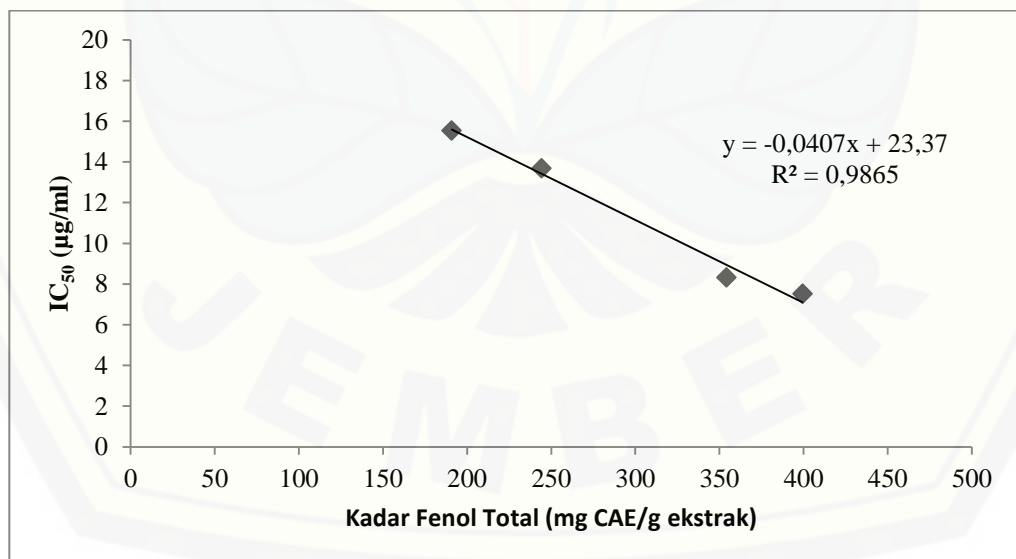
Rata-rata kadar fenol total = 190,916 mg CAE/g ekstrak

SD = 1,715

RSD = 0,898 %

**Lampiran P. Korelasi Kadar Fenol Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak
Metanol Daun Kopi**

Sampel	Kadar Fenol Total	IC ₅₀
Ekstak metanol daun kopi robusta tua	399,403	7,519
Ekstak metanol daun kopi arabika tua	354,307	8,317
Ekstak metanol daun kopi robusta muda	244,232	13,678
Ekstak metanol daun kopi arabika tua	190,916	15,535



Lampiran Q. Hasil Uji Anova dan LSD

Q.1 Kadar Fenol Total

Tests of Normality

Sampel_Daun		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kadar_fenol_total	Robusta Tua	.333	3	.	.862	3	.273
	Arabika Tua	.202	3	.	.994	3	.853
	Robusta Muda	.268	3	.	.950	3	.571
	Arabika Muda	.260	2	.			

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

kadar_fenol_total

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Robusta Tua	3	3.99403E2	.558500	.322450	398.01594	400.79072	398.765	399.802
Arabika Tua	3	3.54307E2	1.203550	.694870	351.31688	357.29645	353.160	355.560
Robusta Muda	3	2.43557E2	.611377	.352978	242.03859	245.07608	243.040	244.232
Arabika Muda	3	1.90916E2	1.714503	.989869	186.65727	195.17539	189.200	192.629
Total	12	2.97046E2	87.204671	2.517382E1	241.63871	352.45312	189.200	399.802

Test of Homogeneity of Variances

kadar_fenol_total

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.949	3	8	.462

ANOVA

kadar_fenol_total

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	83641.054	3	27880.351	2.198E4	.000
Within Groups	10.148	8	1.268		
Total	83651.201	11			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

kadar_fenol_total

LSD

(I) Sampel_Daun	(J) Sampel_Daun	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Robusta Tua	Arabika Tua	45.096667	.919579	.000	42.97611	47.21722
	Robusta Muda	155.846000	.919579	.000	153.72545	157.96655
	Arabika Muda	208.487000	.919579	.000	206.36645	210.60755
Arabika Tua	Robusta Tua	-45.096667	.919579	.000	-47.21722	-42.97611
	Robusta Muda	110.749333	.919579	.000	108.62878	112.86989
	Arabika Muda	163.390333	.919579	.000	161.26978	165.51089
Robusta Muda	Robusta Tua	-155.846000	.919579	.000	-157.96655	-153.72545
	Arabika Tua	-110.749333	.919579	.000	-112.86989	-108.62878
	Arabika Muda	52.641000	.919579	.000	50.52045	54.76155
Arabika Muda	Robusta Tua	-208.487000	.919579	.000	-210.60755	-206.36645
	Arabika Tua	-163.390333	.919579	.000	-165.51089	-161.26978
	Robusta Muda	-52.641000	.919579	.000	-54.76155	-50.52045

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Q.2 Aktivitas Antioksidan (Nilai IC₅₀)

Tests of Normality

Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IC ₅₀ Robusta Tua	.199	3	.	.995	3	.865
Arabika Tua	.212	3	.	.990	3	.811
Robusta Muda	.326	3	.	.874	3	.308
Arabika Muda	.227	3	.	.982	3	.746
Vitamin C	.260	2	.			

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

IC ₅₀	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					Robusta Tua	3		
Arabika Tua	3	8.31667	.049743	.028719	8.19310	8.44023	8.270	8.369
Robusta Muda	3	1.36783E1	.052937	.030563	13.54683	13.80984	13.618	13.717
Arabika Muda	3	1.55347E1	.089288	.051550	15.31286	15.75647	15.453	15.630
Vitamin C	3	3.65800	.031575	.018230	3.57956	3.73644	3.635	3.694
Total	15	9.74120	4.465368	1.152953	7.26836	12.21404	3.635	15.630

Test of Homogeneity of Variances

IC₅₀

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.346	4	10	.319

ANOVA

IC₅₀

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	279.123	4	69.781	2.316E4	.000
Within Groups	.030	10	.003		
Total	279.153	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

IC₅₀

LSD

(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Robusta Tua	Arabika Tua	-.798333	.044814	.000	-.89819	-.69848
	Robusta Muda	-6.160000	.044814	.000	-6.25985	-6.06015
	Arabika Muda	-8.016333	.044814	.000	-8.11619	-7.91648
	Vitamin C	3.860333	.044814	.000	3.76048	3.96019
Arabika Tua	Robusta Tua	.798333	.044814	.000	.69848	.89819
	Robusta Muda	-5.361667	.044814	.000	-5.46152	-5.26181
	Arabika Muda	-7.218000	.044814	.000	-7.31785	-7.11815
	Vitamin C	4.658667	.044814	.000	4.55881	4.75852
Robusta Muda	Robusta Tua	6.160000	.044814	.000	6.06015	6.25985
	Arabika Tua	5.361667	.044814	.000	5.26181	5.46152
	Arabika Muda	-1.856333	.044814	.000	-1.95619	-1.75648
	Vitamin C	10.020333	.044814	.000	9.92048	10.12019
Arabika Muda	Robusta Tua	8.016333	.044814	.000	7.91648	8.11619
	Arabika Tua	7.218000	.044814	.000	7.11815	7.31785
	Robusta Muda	1.856333	.044814	.000	1.75648	1.95619
	Vitamin C	11.876667	.044814	.000	11.77681	11.97652
Vitamin C	Robusta Tua	-3.860333	.044814	.000	-3.96019	-3.76048
	Arabika Tua	-4.658667	.044814	.000	-4.75852	-4.55881
	Robusta Muda	-10.020333	.044814	.000	-10.12019	-9.92048
	Arabika Muda	-11.876667	.044814	.000	-11.97652	-11.77681

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran R. CoA Vitamin C



石药集团维生药业(石家庄)有限公司
CSPC WEISHENG PHARMACEUTICAL (SHIJIAZHUANG) CO., LTD.



Certificate of Analysis

COA NO.: 12061225

Product: Ascorbic Acid

Analysis Standard: BP2011/USP34

Batch Number: 1120270164

Quantity: 4000kg

Manufacture Date: Mar. 22, 2012

Expiry Date: Mar. 21, 2015

Analysis contents	Analysis standard	Analysis results
Characteristics	White or almost white crystalline powder or colourless crystals	Pass
Identification	Positive reaction	Pass
Melting point	About 190°C	190°C
Specific rotation	+20.5°~+21.5°	+21.0°
pH	2.1-2.6	2.3
Residue on ignition	≤0.1%	0.04%
Assay	99.0%-100.5%	99.8%
Heavy metals	≤10ppm	<10ppm
Clarity of solution	Clear	Pass
Color of solution	≤BY ₁	<BY ₁
Impurity E	≤0.2%	<0.2%
Copper	≤5.0ppm	<5.0ppm
Iron	≤2.0ppm	<2.0ppm

Conclusion: The above product conforms with BP2011/USP34 standard.

QC

Rechecker

Writer

Manufacturer: CSPC Weisheng Pharmaceutical (Shijiazhuang) Co., Ltd.

ADD: NO.236 Huanghe Street High-Tech Industrial Development Zone, Shijiazhuang City,
Hebei Province, China

