

Pengembangan Biosensor Antioksidan Berbasis *3-metil-2-benzothiazolin hidrazon* (MBTH) dan Enzim *Polyphenol Oxidase* (PPO) untuk Kontrol Kualitas Serbuk Kopi

Agus Abdul Gani^{1*}, Moch. Amrun Hidayat², Bambang Kuswandi²

¹⁾PMIPA-FKIP, Universitas Jember

²⁾Fakultas Farmasi, Universitas Jember (UNEJ)

*E-mail: agusagani@yahoo.com

ABSTRAK

Pengembangan alat uji antioksidan sederhana telah dilakukan melalui desain, konstruksi dan fabrikasi biosensor berbasis *3-metil-2-benzothiazolin hidrazon* (MBTH) dan enzim *polyphenol oxidase* (PPO). Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan sampel kopi yakni dengan mengukur perubahan warna yang ditimbulkan oleh interaksi senyawa antioksidan dalam kopi dengan reagen MBTH dan enzim PPO. Desain sensor menggunakan matriks pendukung *blister* dan *96 multiwellplate* yang kecil, kompak dan sederhana sehingga mudah di bawa kemanapun (*portable*). Kontribusi dari penelitian ini adalah memberikan solusi nyata, berupa alat dan metode penentuan kualitas kopi, sehingga kualitas kopi Indonesia dapat ditingkatkan melalui *screening* menggunakan biosensor antioksidan yang dapat dioperasikan secara cepat, tepat, mudah dan murah. Selain itu, penelitian ini merupakan bagian dari penelitian unggulan Universitas Jember 2013-2020 yakni “Kopi untuk kesejahteraan Nasional”. Fabrikasi biosensor dengan menggunakan reagen MBTH yang dipadu dengan enzim PPO, dan diimobilisasikan pada material pendukung telah berhasil dilakukan. Biosensor antioksidan hasil fabrikasi memiliki waktu respon 14 menit, linieritas (25-300) ppm, volume larutan sampel optimum 4 µL, linieritas 0,997 dengan sensitifitas 0,085 ppm, LOD 20,601 ppmCE, LOQ 68,671 ppmCE, RSD kepresisian 3,111 %, keakuratan (recovery) 103,068 %. Aplikasi biosensor terhadap sampel nyata memberikan hasil yang tidak berbeda dengan penggunaan metode spektroskopi yang telah distandarkan. Berarti biosensor antioksidan berbasis MBTH dan PPO hasil fabrikasi memiliki kelayakan untuk diaplikasikan penentuan kualitas serbuk biji kopi.

Kata Kunci : Biosensor, Antioksidan, Serbuk biji kopi

PENDAHULUAN

Kopi merupakan salah satu jenis minuman yang disukai oleh seluruh lapisan masyarakat karena kopi memiliki banyak manfaat. Manfaat yang dimiliki oleh minuman kopi berasal dari kandungan bioaktif yang terdapat dalam biji kopi (AEKI, 2005). Senyawa antioksidan dalam biji kopi memiliki aktivitas sebagai antikanker (Ayelign, A., & Sabally K.2013), antiinflamasi (Belay, A., Gholap, A.V.2009), antibakteri. Dari berbagai studi ilmiah diketahui bahwa kopi memiliki efek positif terhadap kesehatan. Kopi dapat menurunkan resiko penyakit diabetes, menurunkan resiko penyakit Parkinson serta meningkatkan kesadaran dan suasana hati. Efek farmakologi kopi tersebut terkait erat dengan kandungan senyawa antioksidan di dalamnya seperti kafein, asam klorogenat dan asam galat.

Jumlah kandungan antioxidant merupakan parameter utama kualitas produk serbuk biji kopi yang dapat menentukan cita rasa (Bisht, 2010). Berbagai metode dikembangkan untuk mendeteksi senyawa antioksidan di dalam kopi, misalnya dengan teknik kromatografi (HPLC) atau spektroskopi. Metode HPLC dan spektrofotometri UV-Vis banyak digunakan untuk mendeteksi asam klorogenat dan kafein. Aktivitas antioksidan kopi telah diuji dengan berbagai metode spektrometri seperti metode FRAP, ABTS, DPPH dan HPLC-ABTS (Al-Othman et.al, 2012; Ayelign,

AK.(2013); López-Martínez et al. 2003, Stalmach, et al.2006). Namun demikian, metode spektrometri dan kromatografi tersebut memiliki beberapa kelemahan, yakni: membutuhkan peralatan yang relatif mahal, analisis harus memiliki pengetahuan dan keterampilan kimia analisis yang memadai, waktu analisis yang relatif lama serta membutuhkan volume sampel yang relatif besar. Oleh karenanya dibutuhkan alternatif metode pengujian aktifitas antioksidan kopi yang cepat, tepat, murah dan mudah.

Pengembangan alat uji antioksidan sederhana dapat dilakukan melalui desain, konstruksi dan fabrikasi biosensor enzim yang spesifik terhadap keberadaan senyawa antioksidan [Oestreich-Janzen, S. (2010)]. Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan sampel kopi yakni dengan mengukur perubahan warna yang ditimbulkan oleh interaksi antara senyawa antioksidan dalam kopi dengan enzim. Desain sensor menggunakan matriks pendukung *blister* dan *96 multiwellplate* yang kecil, kompak dan sederhana sehingga mudah di bawa kemanapun (*portable*).

Penelitian ini dilakukan bertujuan, memberikan solusi alternative cara kontrol kualitas kopi secara mudah dan cepat, melalui fabrikasi atau mendesain biosensor berbasis *imobilisasi* enzim yang spesifik terhadap keberadaan senyawa antioksidan seperti *polyphenol oxidase* (PPO). Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan sampel kopi yakni dengan mengukur

perubahan warna yang ditimbulkan oleh interaksi senyawa antioksidan dalam kopi dengan enzim PPO (Farah, A., & Donangelo, C.M., 2006). Desain sensor menggunakan matriks pendukung *blister* dan *96 multiwellplate* yang kecil, kompak dan sederhana sehingga mudah di bawa kemanapun (*portable*). Berdasarkan perubahan warna sensor dan intensitasnya, dapat ditentukan kandungan senyawa antioksidan dalam kopi.

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

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

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian *experimental laboratories* yang bertujuan untuk mengembangkan biosensor antioksidan dengan menggunakan enzim PPO yang dipadu dengan 3-metil-2-benzotiazolinon hidrazon (MBTH). Alat yang digunakan pada penelitian meliputi seperangkat alat gelas, mikro pipet, timbangan analitik, lemari es, botol semprot, vial, gunting, *scanner canoscan* LIDE 110, kuvet, spektrofotometer UV-Vis, dan *stopwatch*. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah enzim PPO, MBTH (Fluka), Asam Klorogenat 99% p.a, aquadest, dapar fosfat pH 7, Blister obat sebagai pencetak biosensor, dan sampel larutan biji beras kopi.

Langkah awal dalam fabrikasi biosensor dilakukan dengan cara mengimobilisasikan enzim Polyphenol Oksidase (PPO) dan reagen MBTH ke material gel pendukung. Enzim tersebut diteteskan pada blister obat. Blister obat yang telah terisi gel dan terimobilisasi enzim selanjutnya dikeringkan selama 30 menit untuk membentuk biosensor polifenol. Optimasi yang dilakukan dalam pembuatan biosensor meliputi optimasi konsentrasi PPO dan MBTH, optimasi perbandingan volume PPO dan MBTH, optimasi volume terhadap perubahan warna. Karakterisasi sensor antioksidan yang dilakukan meliputi penentuan waktu respon, linieritas, sensitivitas, batas deteksi, batas kuantitasi, selektivitas, presisi, akurasi serta stabilitas sensor antioksidan. Wujud sensor hasil fabrikasi berupa lembaran/butiran sensor, kapabilitas sensor berdasarkan interaksinya dengan antioksidan dalam larutan sampel kopi dipaparkan sebagaimana data-data dan gambar-gambar berikut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Optimasi Konsentrasi MBTH

Optimasi MBTH, terjadinya perubahan warna dapat diamati seperti pada Gambar 2. Secara visual perubahan warna dapat teramati secara jelas pada biosensor polifenol yang diimobilisasi oleh reagen dengan konsentrasi MBTH sebesar 6,0 mg/mL; 12,0 mg/mL dan 24,0 mg/mL seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Sedangkan nilai $\Delta mean RGB$ yang paling tinggi diperoleh dari penggunaan MBTH dengan konsentrasi 24,0 mg/mL yaitu sebesar 27,925. Namun pada konsentrasi 12 mg/mL $\Delta mean RGB$ yang dihasilkan cukup tinggi pula yaitu 27,665. Sehingga penggunaan MBTH dengan konsentrasi 12,0 mg/mL dinilai paling optimal baik berdasarkan perubahan warna yang dapat teramati secara visual, nilai $\Delta mean RGB$ serta efisiensi bahan.

Optimasi Perbandingan Volume Reagen

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

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

Waktu Respon Sensor

Waktu respon sensor berdasarkan intensitas sinyal yang dihasilkan didapatkan bahwa intensitas sinyal mulai stabil setelah mencapai waktu 14 menit, sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 4. Dengan demikian berarti waktu respon sensor kimia berbasis enzim PPO dan 3-metil-2-benzothiazolinon (MBTH) untuk deteksi polifenol adalah 14 menit.

Optimasi Volume Larutan Reagen

Penentuan volume reagen ini bertujuan untuk menentukan volume reagen yang optimal. Reagen yang dimaksudkan disini adalah campuran MBTH dan enzim PPO dengan perbandingan 1:1. Konsentrasi MBTH yang digunakan ialah 12 mg/mL sedangkan konsentrasi enzim PPO sebesar 500 unit/mL. Optimasi volume

larutan sampel dalam proses deteksi fenolat dilakukan dengan memvariasikan volume larutan sampel dan

metode pencelupan. Selanjutnya antara kedua metode di tetapkan optimasi terbaik untuk volume larutan sampel.



kontak dengan larutan sampel



Sesudah kontak dengan larutan sampel

Sebelum

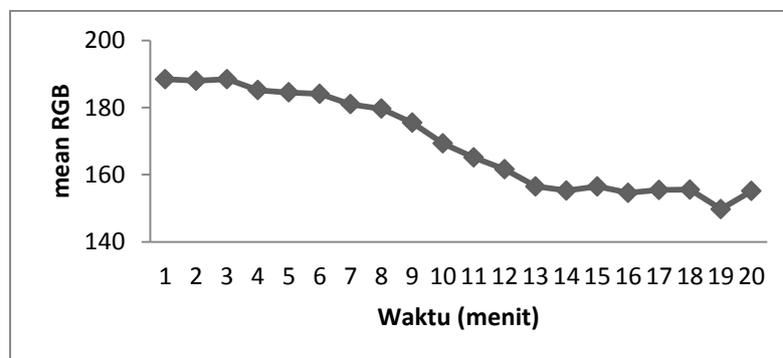
Gambar 1. Wujud sensor hasil fabrikasi dan perubahan warna sensor.



Gambar 2. Perubahan warna yang terjadi pada optimasi konsentrasi MBTH



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



Gambar 4. Waktu respon biosensor

Optimasi dilakukan dengan menggunakan cairan berwarna dikarenakan reagen yang digunakan memiliki warna putih kekuningan sehingga sukar untuk diidentifikasi seberapa besar area yang telah terbasahi atau tertutupi oleh reagen. Berdasarkan optimasi yang telah dilakukan, dapat dilihat bahwa dengan volume 5,0 μ L larutan mampu menutupi seluruh area *chip* kertas dan waktu untuk pengeringan cukup cepat yaitu selama 8,35 menit. Setelah direaksikan dengan standar katekin 150 ppm, reagen dengan volume 5,0 μ L juga dapat memberikan perubahan warna pada area yang cukup luas dan cukup jelas diamati secara visual. Sehingga volume reagen sebanyak 5,0 μ L dinilai merupakan volume yang optimal.

Optimasi Volume Larutan Sampel

Optimasi volume larutan sampel dalam proses deteksi fenolat dilakukan dengan memvariasikan volume larutan sampel dan metode pencelupan. Selanjutnya antara kedua metode di tetapkan optimasi terbaik untuk volume larutan sampel. Data hasil pengukuran dipaparkan sebagaimana Tabel 1.

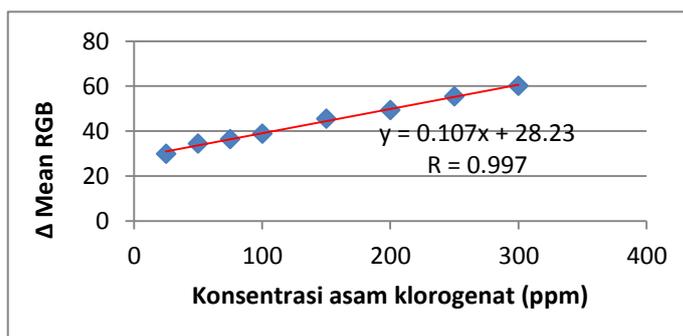
Berdasarkan data pada Tabel 1, didapatkan realita bahwa metode celup dengan menggunakan sensor didapatkan intensitas RGB 52,828. Berdasarkan variasi volume larutan sampel, didapatkan bahwa volume larutan sampel yang dialirkan untuk berinteraksi dengan sensor terbaik, yang sesuai dengan metode celup adalah 4 μ L memberikan intensitas RGB 52, 389, mendekati teknik celup.

Tabel 1. Data optimasi volume larutan sampel.

Aplikasi	Mean RGB Blangko			Mean RGB			Δmean RGB			rata-rata	SD
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3		
Celup	236.144	235.173	235.820	182.760	182.891	183.003	53.384	52.282	52.817	52.828	0.551
1 μL	237.023	236.983	235.923	210.983	210.762	208.023	26.040	26.221	27.900	26.720	1.026
2 μL	236.927	236.541	236.029	200.982	200.004	200.753	35.945	36.537	35.276	35.919	0.631
3 μL	237.029	236.128	235.028	187.923	186.430	185.532	49.106	49.698	49.496	49.433	0.301
4 μL	235.087	235.762	235.948	182.932	183.934	182.763	52.155	51.828	53.185	52.389	0.708
5 μL	235.982	235.387	236.082	178.437	178.520	179.032	57.545	56.867	57.050	57.154	0.351
6 μL	235.982	235.772	234.012	176.730	176.421	177.376	59.252	59.351	56.636	58.413	1.540

Tabel 2 Data hasil pengukuran polifenol dalam sampel nyata menggunakan biosensor polifenol hasil fabrikasi

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



Gambar 5. Kurva linieritas, Data ditunjukkan dengan rata-rata ± SD (n=3).

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

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

Linieritas Sensor dan Sensitivitas

Penentuan linieritas dilakukan dengan membuat seri konsentrasi standar asam klorogenat 25-300 ppm. Standar asam klorogenat diteteskan pada biosensor polifenol dan kemudian diukur perubahan intensitas warna yang terjadi (Δ mean RGB). Realitanya dapat

diketahui bahwa adanya hubungan yang proporsional antara konsentrasi analit terhadap respon dari biosensor polifenol. Linieritas berada pada rentang 25-300 ppm dengan persamaan regresi $y = 0,107x + 28,231$. Linieritas tersebut telah memenuhi parameter linieritas dengan nilai koefisien korelasi (r) mendekati ±

1 (Harmita, 2004) dan lebih besar dari $r_{\text{tabel}} = 0,917$ (Supardi, 2012) dengan nilai r yang dihasilkan adalah 0,997 dan nilai koefisien variasi dari fungsi ($V \times 0$) tidak lebih besar dari 5% (Yuwono, M. & Indrayanto, G., 2005) yaitu sebesar 4,7%. Linieritas sensor ditunjukkan sebagaimana Gambar 5.

Berdasarkan persamaan regresi, nilai slope yang dihasilkan sebesar 0,107. Nilai tersebut dapat diartikan bahwa dengan adanya perubahan konsentrasi sebesar 1 ppm *CE* akan mengakibatkan perubahan $\Delta \text{mean RGB}$ sebesar 0,107.

Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

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

Selektivitas

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

Presisi

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

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

Akurasi

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

Waktu Pakai

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

Aplikasi Sampel Nyata

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

menggunakan biosensor polifenol dapat dilihat pada Tabel 2.

KESIMPULAN

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

DAFTAR PUSTAKA

- AEKI. (2005). Statistik Kopi Tahun 2003-2005. Asosiasi Eksportir Kopi Indonesia, Jakarta.
- Al-Othman, Z.A., Aqel, A., Alharbi, M.K.E., Badjah-Hadj-Ahmed, A.Y., Al-Warthan, A.A. (2012). Fast Chromatographic Determination Of Caffeine In Food Using A Capillaryhexyl Methacrylate Monolithic Column. *Food Chemistry*. 132: 2217–2223.
- Ayelnig, A., Sabally K. (2013). Determination Of Chlorogenic Acids (CGA) In Coffee Beans Using HPLC. *American Journal of Research Communication*, 1,2, 78-91.
- Belay, A., Gholap, A.V. (2009). Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 3,11, 234-240.
- Bisht, S., Sisodia, S. (2010). Coffea arabica: A wonder gift to medical science. *J. Natural Pharmaceutics*, 1, 1, 58-65.
- Farah, A., Donangelo, C.M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18, 1, 23-36.
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 1(3):117 – 135.
- Kuswandi B, 2010b. *Biosensor (Konsep, Desain & Eksperimentasi)*. Jember: Jember University Press.
- López-Martínez, L., López-de-Alba, P.L., García-Campos, R., León-Rodríguez, L.M.D. (2003). Simultaneous determination of methylxanthines in coffees and teas by UV-Vis spectrophotometry and partial least squares. *Analytica Chimica Acta*, 493, 83-94.
- Oestreich-Janzen, S. (2010). *Chemistry of Coffee*, 3.25, Elsevier Ltd., 1085-1113.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, M. B., & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, 133:2812–2819.
- Phan, T.T.D., Kuban, V., Kráčmar, S. (2012). Determination of caffeine contents of coffee brands in the Vietnamese market. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1:995-1002.
- Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A., & Saura-Calixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90:133–139.
- Stalmach, A., Mullen, W., Nagai, C., Crozier, A. (2006). On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1): 253-262.
- Supardi. 2012. *Aplikasi Statistika dalam Penelitian*. Jakarta: UFUK Press.
- Vignoli, J.A., Bassoli, D.G., Benassi, M.T., (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124, 863–868.
- Wenjing, L., Sheng, Z., Ling, Y., Yinhu, L., Zhonghua, L., (2011). Simultaneous determination of 6 phenolic acids in coffee beans by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chinese journal of chromatography*, 29, 5, 439-442.
- Yuwono, M. dan Indrayanto, G. (2005). *Validation of Chromatographic Methods of Analysis*. In Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, Elsevier Inc, 32: 234 – 259.