

Isolasi Senyawa Flavonoid yang Berpotensi Memiliki Aktivitas Antioksidan dari Daun Kopi Robusta (*Coffea Canephora* Pierre Ex A.Froehner)

Flavonoid Isolation Of Robusta Coffee (*Coffea Canephora* Pierre Ex Froehner) Leaves That Potentially Have Antioxidant Activity

¹Ika Kartika, ²Kiki Mulkiya Yuliawati, ³Esti Rachmawati Sadiyah

^{1,2,3}Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Tamansari No.1 Bandung 40116

email: ¹Ika113101@gmail.com, ²qqmulkiya@gmail.com, ³esti_sadiyah@gmail.com

Abstract. purpose of this research was to isolate flavonoid compound of robusta coffee (*coffea canephora pierre ex froehner*) leaves that potentially have antioxidant activity. Robusta coffee leaves was made into raw material and then extracted by multilevel maceration method using n-hexane, ethyl acetate, and methanol solvents. The extract was fractionated by vacuum liquid chromatography method using gradient elution n-hexane, ethyl acetate, and methanol solvent mixture. Extract and fraction was monitored by thin layer chromatography (TLC) using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) to test antioxidant activity and sitroborate to identify flavonoid. Selected fraction was isolated using preparative TLC method. Maximum wavelength of isolates were determined using UV-Vis spectrophotometry. Ethyl acetate extract was selected and isolation was performed toward fraction 6. Isolate purity was tested using two-dimensional TLC and single development TLC. Isolates were then characterized using UV-Vis spectrophotometry and showed maximum wavelength in 274 nm and 360 nm and suspected to be flavonol flavonoids.

Keywords: Robusta Coffea (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), Antioxidant, Isolation, Flavonoid, Flavonol.

Abstrak. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi senyawa flavonoid yang berpotensi memiliki aktivitas antioksidan dari daun kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner). Daun kopi Robusta dibuat menjadi simplisia kemudian diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol. Kemudian dilakukan pemantauan aktivitas antioksidan secara kualitatif menggunakan penampak bercak DPPH dan sitroborat. Ekstrak yang terpilih kemudian difraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum dengan elusi gradien menggunakan campuran pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol. Terhadap fraksi dilakukan pemantauan dengan KLT menggunakan penampak bercak DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) untuk uji aktivitas antioksidan dan sitroborat untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid. Pada fraksi terpilih dilakukan isolasi dengan metode KLT preparatif, isolat dikarakterisasi dengan penentuan panjang gelombang maksimal menggunakan spektrofotometri UV-sinar tampak. Berdasarkan hasil pemantauan, ekstrak yang terpilih yaitu ekstrak etil asetat dan fraksi yang diteruskan untuk isolasi yaitu fraksi 6, dan terdapat isolat terpilih yaitu bercak dengan Rf 0,6. Isolat diuji kemurniannya menggunakan KLT dua dimensi dan KLT pengembangan tunggal. Hasil karakterisasi isolat menggunakan spektrofotometri UV-sinar tampak menunjukkan adanya panjang gelombang maksimal pada pita I 274 Nm dan pita II 360 Nm dan diduga termasuk flavonoid golongan flavonol.

Kata Kunci: Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner), Antioksidan, Isolasi, Flavonoid, Flavonol.

A. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang kaya akan keanekaragaman hayati termasuk keragaman tumbuhannya. Salah satu kekayaan Indonesia yaitu tanaman kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) (Leunufna,2007:81).

Selama ini pemanfaatan kopi secara komersial hanya terfokus pada biji kopi sebagai minuman seduh maupun bahan tambahan makanan, sedangkan daunnya belum banyak dimanfaatkan.

Meskipun daun kopi robusta (*Coffea canephora*) belum banyak dimanfaatkan, tetapi sudah mulai diteliti khasiat dan kandungannya secara

ilmiah. Berdasarkan penelitian Shiyandkk(2017:39) daun kopi memiliki aktivitas antidiabetes karena memiliki kandungan senyawa fenolik yang melimpah. Senyawa fenol juga memiliki aktivitas antioksidan, aktivitas antioksidan daun kopi robusta (*Coffea canephora*) lebih tinggi jika dibandingkan dengan daun kopi arabika (*Coffea arabica*). Selain senyawa fenol dalam daun kopi robusta juga terkandung flavonoid, alkaloid dan saponin yang berdasarkan penelitian Hasanah(dkk,2017:49) senyawa tersebut berperan dalam aktivitas antioksidan.

penelitian mengenai khasiat dan kandungan secara ilmiah pada daun kopi Robusta telah dilakukan tetapi belum di ketahui senyawa aktif yang berperan dalam aktivitas antioksidan. sehingga dalam penelitian ini dirumuskan permasalahan: senyawa flavonoid apa yang dapat menghasilkan aktivitas antioksidan dari daun kopi robusta, maka tujuan dari penelitian ini adalah melakukan isolasi senyawa flavonoid yang menghasilkan aktivitas antioksidan dari daun kopi Robusta, identifikasi senyawa flavonoid tersebut.

Manfaat dari penelitian ini yaitu untuk mendapatkan gambaran senyawa flavonoid apa yang berperan dalam aktivitas antioksidan, Aktivitas antioksidan yang dihasilkan dari tumbuhan dapat dikembangkan untuk berbagai komoditas diantaranya sebagai bahan yang memiliki potensi sebagai tabir surya sehingga dapat melindungi kulit dan dapat digunakan pada sediaan kosmetika, serta dapat digunakan untuk zat tambahan pada bahan pangan fungsional misalnya minuman kaya akan antioksidan.

B. Landasan Teori

Tanaman kopi Robusta dapat tumbuh dengan baik pada ketinggian tempat 300-500 mdpl dengan curah

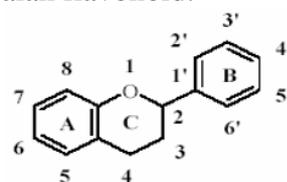
hujan 2.000-3.000 mm/tahun serta penyinaran dibawah 80% (Utomo,2011:4). Karakter morfologi yang khas pada kopi Robusta yaitu daunnya lebih besar dibandingkan kopi lainnya, dan memiliki bentuk pangkal tumpul, permukaan daun yang menggelembung, mengkilap, biasanya berukuran 10-30 cm dan mempunyai lebar 6 cm. Selain itu daunnya tumbuh berhadapan dan tipe daun tunggal (Marinova, dkk, 2011:14).

Tanaman kopi Robusta banyak mengandung berbagai zat kimia seperti kafein, trigonelin, glukosa, protein, teofilina, asam klorogenat, tannin, mineral, lemak. Daun kopi Robusta mengandung senyawa tanin, steroid, monoterpene, seskuiterpen, triterpene, flavonoid, alkaloid, saponin, dan polifenol (Suhardini,dkk,2016:222).

Daun kopi di daerah Sumatra digunakan sebagai minuman seduh yang di sebut “aia kawa” karena dipercaya mengandung alkaloid seperti kafein, kemudian juga saponin, flavonoid dan polifenol yang dapat mencegah berbagai penyakit karsinogenik (Pristiana, dkk, 2017:90).

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang dimiliki oleh sebagian besar tumbuhan hijau dan biasanya terkonsentrasi pada biji, buah, kulit kayu, daun, dan bunga. Flavonoid diketahui memiliki sifat sebagai antioksidan (Pallegrini, dkk, 2003 : 2813).

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol yang bersifat antioksidan yang kuat, dan merupakan senyawa metabolit sekunder yang paling banyak tersebar luas, sekitar 5-10% metabolit sekunder adalah flavonoid.



Gambar 1. Struktur kimia Flavonoid (Sumber: Markham, 1998)

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menghambat atau mencegah oksidasi dalam reaksi rantai. Antioksidan dapat melindungi sel-sel dari kerusakan yang disebabkan oleh molekul tidak stabil yang dikenal sebagai radikal bebas. Antioksidan dapat mendonorkan elektronnya kepada radikal bebas, sehingga dapat menstabilkan radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai (Hamid, dkk, 2004:143).

Ekstraksi adalah Teknik pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan distribusi zat terlarut diantara dua pelarut yang saling bercampur. Ekstraksi bertingkat dilakukan pada simplisia secara berturut-turut menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran berbeda, mulai dari pelarut non polar, semi polar dan polar. Maserasi ialah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruang (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes RI,2000).

Kromatografi merupakan pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam untuk memisahkan komponen yang berada pada larutan, molekul yang terlarut pada fase gerak akan melewati kolom yang merupakan fase diam

Spektrofotometri merupakan pengukuran suatu interaksi antara radiasi elektromagnetik dan molekul atau atom dari suatu zat kimia. Untuk menghasilkan pengukuran yang baik, larutan yang diukur sebaiknya memberikan serapan sebesar 0,2-0,8 di daerah ultraviolet atau cahaya tampak.

Spektrofotometri UV-Sinar tampak digunakan untuk menganalisis struktur flavonoid, cara tersebut digunakan untuk mengidentifikasi jenis flavonoid (Markham,1988:38).

C. Metodologi Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi penyiapan bahan, penetapan parameter standar simplisia dan ekstrak, penapisan fitokimia, ekstraksi, fraksinasi, uji aktivitas antioksidan, isolasi dan uji kemurnian, identifikasi senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan pada daun kopi Robusta.

Bahan daun kopi Robusta diperoleh dari Kecamatan Tanjungsari, Kabupaten Sumedang. Bahan penelitian yang digunakan berupa daun kopi Robusta yang sudah tua. Determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense SITH-ITB, pengolahan bahan meliputi pengambilan bahan, sortasi basah, pencucian, pengeringan bahan dengan cara diangin-angin selama kurang lebih 2 minggu, sortasi kering, dan pengecilan ukuran hingga diperoleh serbuk simplisia.

Penetapan parameter standar meliputi parameter standar spesifik dan non spesifik. Penetapan parameter standar spesifik meliputi pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik, penetapan kadar sari laut air, penetapan kadar sari larut etanol. Penetapan parameter standar non spesifik meliputi penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan susut pengeringan, kadar air, penetapan bobot jenis.

Penapisan fitokimia meliputi pengujian terhadap senyawa polifenolat, flavonoid, tannin, kuinon, monoterpen dan seskuiterpen, saponin, alkaloid, triterpenoid dan steroid. Penafisan fitokimia dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak.

Simplisia daun kopi Robusta diekstraksi dengan metode maserasi

bertingkat dengan menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol, masing-masing dilakukan selama 3x24 jam. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Pada masing-masing ekstrak dilakukan pemantauan menggunakan KLT dengan penampak bercak DPPH untuk aktivitas antioksidan dan sitroborat untuk deteksi senyawa flavonoid. Kemudian terhadap ekstrak terpilih dilakukan fraksinasi dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV) dengan metode elusi gradien campuran pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol.

Terhadap fraksi hasil KCV dilakukan pemantauan kembali dengan KLT. Fraksi terpilih dilakukan isolasi dengan menggunakan metode KLT preparatif untuk mendapatkan isolat. Isolat yang diperoleh dilakukan uji kemurnian dengan KLT dua dimensi dan KLT pengembangan tunggal. Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan spektrofotometri UV sinar tampak dengan mencari panjang gelombang maksimal sampel.

D. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Pengumpulan Bahan dan Determinasi

Daun kopi Robusta yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Kecamatan Tanjungsari, Kabupaten Sumedang, Jawa Barat. Daun kopi yang digunakan adalah daun kopi yang sudah tua, hal ini dilakukan karena berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Cahyani (2015:49), daun kopi yang sudah tua memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan daun kopi yang masih muda.

Daun kopi yang telah diperoleh kemudian dilakukan determinasi di Herbarium Bandungense SITH Institut Teknologi Bandung. Tujuan dilakukannya determinasi adalah untuk mengetahui kebenaran dari identitas

tanaman yang digunakan sehingga dapat meminimalisasi kesalahan dalam penggunaan bahan tanaman untuk penelitian. Berdasarkan hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel tanaman yang digunakan adalah daun kopi robusta dengan nama ilmiah *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner.

Pembuatan Simplisia

Dari 5 kg daun kopi segar dikeringkan dengan cara diangin-angin di ruangan yang terbuka dan bersih, diperoleh simplisia sebanyak ± 1 kg.

Penetapan Parameter Standar Spesifik

Pemeriksaan Makroskopik dan Mikroskopik

Tujuan dilakukannya pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik yaitu untuk mengetahui kebenaran dari bahan yang akan digunakan. Hasil pemeriksaan makroskopik menunjukkan bahwa daun kopi robusta memiliki bentuk oval yang memanjang, permukaan daun menggelembung dan mengkilap berwarna hijau tua. Lebar daun yaitu 6-8 cm dan panjang daun 15-18 cm.

Hasil pemeriksaan mikroskopik bahwa daun kopi robusta memiliki bentuk stomata parasitik dan memiliki sel-sel sekret yaitu sel minyak atsiri, Hal ini sesuai dengan pustaka yang disebutkan dalam Depkes RI(2000).

Penetapan Kadar Sari

Tujuan dari penetapan kadar sari yaitu untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat pada daun kopi robusta yang dapat tersari dalam pelarut tertentu yaitu senyawa yang dapat larut dalam air (polar) dan senyawa dapat larut dalam etanol (kurang polar).

Tabel. Hasil penetapan kadar sari

No.	Parameter standar	Hasil (%)
1	Rata-rata kadar sari larut air	24.75
2	Rata-rata kadar sari larut etanol	22.21

Dari hasil penetapan diketahui bahwa pada daun kopi robusta kadar sari larut air lebih besar dibandingkan kadar sari larut etanol, hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang bersifat polar pada simplisia lebih banyak dibandingkan dengan senyawa yang bersifat kurang polar.

Penetapan parameter standar non spesifik

Tujuan penetapan parameter ini yaitu untuk menetapkan kualitas simplisia dan ekstrak.

Tabel 2. Hasil penetapan parameter standar non spesifik

No.	Parameter standar	Hasil rata-rata
1	Susut pengeringan	9.28%
2	Kadar air	7.50%
3	Kadar abu total	6.19%
4	Kadar abu tidak larut asam	1.90%
5	Bobot jenis	1.02

Pada penetapan parameter standar kadar air dan susut pengeringan diketahui bahwa hasil susut pengeringan lebih tinggi dibanding kadar air, karena pada susut pengeringan terukur senyawa lain yang dapat menguap selain air misalnya minyak atsiri.

Pada penetapan kadar abu, hasil kadar abu total lebih tinggi dibanding kadar abu tidak larut asam ini dikarenakan pada kadar abu total memberikan gambaran kandungan mineral dan senyawa anorganik internal dan eksternal yang berasal dari proses

awal bahan sampai terbentuknya simplisia sedangkan pada kadar abu tidak larut asam memberikan gambaran kandungan senyawa anorganik yang berasal dari luar tanaman (eksternal) seperti pasir yang menempel pada simplisia. Selanjutnya penetapan bobot jenis bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak yang masih dapat dituang.

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan pada simplisia dan masing-masing ekstrak, yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada masing-masing sampel.

Tabel 3. Hasil penapisan fitokimia

No	Skrining	Simplisia	Ekstrak n-Heksan	Ekstrak etil asetat	Ekstrak Metanol
1	Alkaloid	-	-	-	-
2	Polifenol	+	-	-	+
3	Flavonoid	+	-	+	+
4	Saponin	-	-	+	+
5	Tanin	+	-	+	+
6	Kuinon	-	-	+	+
7	Monoterpen/ seskiterpen	+	+	+	-
8	Steroid/ Triterpen	+	+	-	-

Penapisan pada simplisia dan ekstrak menunjukkan bahwa daun kopi robusta mengandung senyawa flavonoid yaitu pada ekstrak etil asetat dan metanol sehingga memungkinkan untuk dilakukan isolasi senyawa flavonoid pada daun kopi robusta.

Ekstraksi

Proses ekstraksi daun kopi dilakukan dengan cara remaserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol. Dilakukan selama 3x24 jam untuk masing-masing pelarut. Pemilihan metode ini yaitu untuk menghindari kerusakan senyawa yang bersifat termolabil pada bahan, sedangkan tujuan dilakukannya remaserasi karena dapat menyari senyawa lebih banyak, hal ini

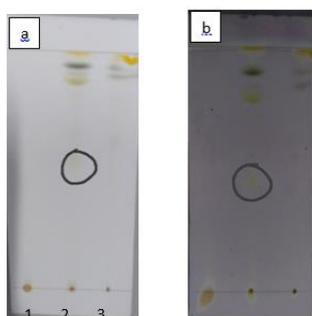
karena pada remaserasi dilakukan penambahan pelarut yang baru. Hasil rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel.4.

Tabel 4. Hasil rendemen ekstrak

No.	Sampel	Bobot awal (gram)	Bobot ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
1	ekstrak n-heksan	500	6.39	1.28
2	ekstrak etil asetat	380	6.76	1.78
3	ekstrak metanol	360	29.14	8.09

Pada masing-masing ekstrak dilakukan pemantauan dengan KLT menggunakan fase gerak n-heksan:etil asetat (2:4) fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄, serta dengan penampak bercak DPPH untuk aktivitas antioksidan dan sitroborat untuk deteksi senyawa flavonoid. Hasil pemantauan dapat dilihat pada gambar 2.

Gambar 2. Kromatogram pemantauan ekstrak



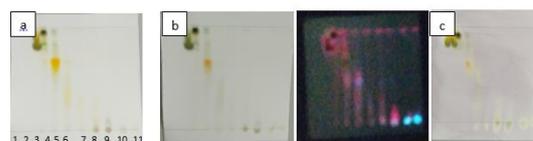
Keterangan: (a) penampak sitroborat
(b) penampak DPPH
1. Ekstrak metanol
2. Ekstrak etil asetat
3. Ekstrak n-heksan

Berdasarkan kromatogram pemantauan ekstrak, yang positif terhadap DPPH dan sitroborat yaitu ekstrak metanol dan etil asetat, yang memiliki kromatogram dengan pemisahan yang baik dengan yaitu ekstrak etil asetat dengan Rf 0,6 maka dipilih ekstrak etil asetat untuk dilanjutkan pada tahap fraksinasi.

Fraksinasi

Ekstrak terpilih yaitu etil asetat difraksinasi dengan KCV yang bertujuan untuk memudahkan proses pemisahan pada metode berikutnya. fase gerak yang digunakan yaitu dengan kepolaran gradien yang dimulai dari non polar, semi polar dan polar yaitu pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol. Hasil fraksinasi dengan KCV terdapat 11 fraksi yang selanjutnya di pantau kembali dengan KLT menggunakan fase gerak n-heksan:etil asetat (2:4) fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ untuk menentukan senyawa mana yang dilanjutkan untuk proses isolasi senyawa flavonoid. Hasil pemantauan dapat dilihat pada gambar 3.

Gambar 3. Kromatogram fraksi



Keterangan: (a) tanpa penampak bercak
(b) penampak sitroborat
(c) penampak DPPH

Dari hasil pemantauan dipilih fraksi 6 karena pada saat disemprot dengan penampak bercak sitroborat dan DPPH menunjukkan hasil yang positif dengan nilai Rf 0,6. dan dilihat pada lampu UV 366 nm menandakan positif flavonoid karena terlihat spot berwarna biru. Maka fraksi terpilih tersebut dilakukan isolasi.

E. Isolasi dan Pemurnian

Metode ini merupakan tahapan lanjutan yang digunakan untuk memisahkan senyawa flavonoid dengan senyawa lain sehingga memperoleh isolat murni. Isolasi dilakukan dengan metode KLT preparatif, dengan menggunakan eluen n-heksan:etil asetat (2:4), hasil KLT preparatif dapat dilihat pada gambar 4.

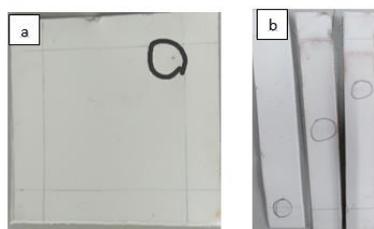
Gambar 4. Kromatogram KLT preparatif

UV 366 Nm

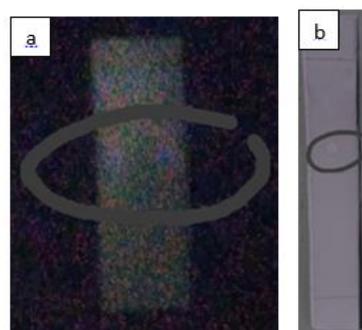
Dari hasil pengamatan terdapat beberapa pita yang terbentuk yaitu pita berwarna merah dan pita berwarna biru, pada plat dilakukan penyemprotan dengan sitroborat pada sisi kiri dan DPPH pada sisi kanan, pita yang terpilih yaitu pita yang berwarna biru, kemudian dikerok lalu dilarutkan dalam metanol kemudian di saring dan larutannya diambil untuk mendapatkan isolat murni.

Uji Kemurnian

Dilakukan uji kemurnian yang meliputi KLT pengembang tunggal dan KLT dua dimensi. Hasil uji kemurnian dapat dilihat pada gambar 5.

Gambar 5. Kromatogram uji kemurnian isolat

Hasil uji kemurnian dengan KLT dua dimensi dan KLT pengembangan tunggal menunjukkan bahwa isolat telah murni, hal ini dibuktikan dengan dihasilkan bercak tunggal. Untuk lebih memastikan bahwa yang diisolasi merupakan senyawa flavonoid maka dilakukan pemantauan kembali terhadap isolat yang telah diperoleh, hasil pemantauan dapat dilihat pada gambar 6.

Gambar 6. Kromatogram isolat

Keterangan: (a) penampak sitroborat
(b) penampak DPPH

Dari hasil pemantauan bahwa isolat yang telah disemprot penampak bercak dengan sitroborat dan DPPH menunjukkan hasil yang positif terhadap flavonoid dan antioksidan.

Identifikasi Isolat

Identifikasi isolat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-sinar tampak. Sampel dilarutkan dalam metanol kemudian diukur panjang gelombang maksimal sampel. Hasil spektrum menunjukkan bahwa isolat menghasilkan panjang gelombang pada pita I sebesar 274 nm dan pita II sebesar 360 nm, berdasarkan literatur data tersebut berada pada rentang pita I 250-280 nm dan pita II 330-360 nm yang menyatakan bahwa senyawa tersebut merupakan flavonoid golongan flavonol (Markham, 1988:39).

F. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa dari daun kopi robusta telah diisolasi senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yang diduga termasuk kedalam golongan flavonol.

G. Saran

Diharapkan adanya penelitian lebih lanjut dalam mengidentifikasi senyawa golongan flavonoid dari daun

kopi robusta dengan menggunakan spektrofotometri-UV-Vis dengan bantuan pereaksi geser flavonoid

225-276.

Daftar Pustaka

- Backer, C. A., Bakhuizen Van den Brink, R. C. (1965), *Flora of Java (Spermatophytes Only)*, Vol II, V.P, Noordhoff-Groningen, Netherlands.
- Baso, R. L., Amindita, R. (2018). Analisis Daya Saing Kopi Indonesia. *Jurnal Ekonomi Pertanian dan Agribisnis (JEPA)*, 2(1): 1-9.
- Cahyani, N. Y., (2015). *Perbandingan Kadar Fenol Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kopi Robusta dan Arabika*. [Skripsi], Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jember.
- Cronquist, A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press, New York.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1977). *Materia Medika Indonesia Jilid I*, Departemen Kesehatan, Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Farida, A., Ristianti, E., Kumoro A, C. (2013). Penurunan Kadar Kafein dan Asam Total pada Biji Kopi Robusta Menggunakan Teknologi Fermentasi Anaerob Fakultatif dengan Mikroba NOPKOR MZ-15. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, 2(3): 70-75.
- Fransworth, N. R. (1966). Biological and Phytochemical Screeening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(3): 225-276.
- Hasanah, M., Maharani, B., Munarsih, E. (2017). Daya Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Kopi Robusta (*Coffea Robusta*) terhadap Pereaksi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, *IJPST*. 4(2):42-49
- Leunufna, S. (2007). Kriopreservasi untuk Konservasi Plasma Nutfah Tanaman: Peluang Pemanfaatannya di Indonesia. *Jurnal AgroBiogen*, 3(2): 80-88.
- Markham, K. R. (1998). *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Terjemahan oleh Padmawainata, K., dan Niksolihin S. ITB, Bandung.
- Pristina, D. Y., Susanti, S., Nurwantoro. (2017). Antioksidan dan Kadar Fenol Berbagai Ekstrak Daun Kopi (*Coffea* sp): Potensi Aplikasi Bahan Alami untuk Fortifikasi Pangan. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 6(2): 40-45.
- Shiyan, S., Herlina., Arsela, D., Latifah, E. (2017). Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Etanolik Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Pada Tikus Diabetes Tipe 2 yang Diberi Diet Lemak Tinggi. *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*, 3(2): 39-46.