

SKRINING ANTIOKSIDAN DAN AKTIFITAS ANTIDIABETES EKSTRAK TERPURIFIKASI ETIL ASETAT KOPI HIJAU ARABIKA (*Coffea arabica* L.) SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-Vis

SCREENING OF ANTIOXIDANT AND ANTIDIABETIC ACTIVITIES OF GREEN COFFEE BEAN PURIFIED EXTRACT BY USING UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY

Rissa Laila Vifta^{1*}, Dwi Mafitasari², Erik Rahman³

¹²Universitas Ngudi Waluyo
Jalan Diponegoro No. 186, Gedanganak, Ungaran Timur, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah

³STIFAR Yayasan Pharmasi Semarang
Jalan Sarwo Edie Wibowo, Plamongsari, Semarang, Jawa Tengah

*e-mail korespondensi : rissalailavifta@gmail.com

Abstrak

Biji kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, alkaloid, tanin dan terpenoid. Kandungan flavonoid pada biji kopi hijau arabika diduga memiliki aktifitas sebagai antioksidan dan antidiabetes. Peningkatan aktifitas senyawa aktif dapat ditingkatkan melalui proses purifikasi. Purifikasi biji kopi hijau arabika dilakukan menggunakan pelarut etil asetat melalui pemisahan cair-cair. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktifitas antioksidan ekstrak terpurifikasi etil asetat biji kopi hijau arabika serta menganalisis aktivitas penurunan glukosa secara *in vitro*. Pengujian aktivitas antioksidan ditentukan menggunakan metode ABTS (2,2 azinobis (3- etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat), sedangkan pengujian antidiabetes menggunakan metode *Nelson Somogyi* dengan pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Hasil identifikasi kualitatif menunjukkan adanya senyawa aktif flavonoid pada ekstrak biji kopi hijau arabika (EBKHA) terpurifikasi etil asetat. Kadar flavonoid total pada EBKHA terpurifikasi etil asetat sebesar 49,47 mg QE/g. Aktifitas antioksidan pada EBKHA terpurifikasi etil asetat diperoleh nilai IC₅₀ 69,95 ppm dengan kategori kuat, sedangkan aktivitas penurunan kadar glukosa secara optimal pada konsentrasi 60 ppm dengan penurunan kadar glukosa sebesar 67,50%. Kandungan flavonoid pada EBKHA terpurifikasi etil asetat memiliki kemampuan antioksidan kuat serta berpotensi sebagai kandidat antidiabetes.

Kata kunci : Antidiabetes, Antioksidan, *Coffea arabica* L., Flavonoid, Purifikasi

Abstract

Arabica green coffee beans (*Coffea arabica* L.) contain secondary metabolites of flavonoids, alkaloids, tannins and terpenoids. The content of flavonoids in arabica green coffee beans was thought to have antioxidant and antidiabetic activity. Increased active activities of metabolites compounds can be increased by purification process. Purification of Arabica green coffee beans was carried out by using ethyl acetate solvent through liquid-liquid separation. This study aims to determine the antioxidant activity of purified ethyl acetate extracts of arabica green coffee beans and analyze glucose reduction activities *in vitro*. Testing for antioxidant activity was determined using the ABTS method (2,2 azinobis (3-ethylbenzothiazolin) -6-sulfonic acid), while the antidiabetic testing used the Nelson Somogyi method with absorbance reading using UV-Vis spectrophotometry. Qualitative identification results indicate the presence of active flavonoid compounds in Arabica green coffee bean extract (EBKHA) purified by ethyl acetate. Total flavonoid levels in EBKHA purified by ethyl acetate were 49.47 mg QE/g. Antioxidant activity on EBKHA purified by ethyl acetate obtained IC₅₀ value 69.95 ppm with a strong category, while the activity of reducing glucose levels optimally at a concentration of 60 ppm with a decrease in glucose levels of 67.50%. The flavonoid content in EBKHA purified by ethyl acetate has strong antioxidant ability and has the potential as an antidiabetic candidate.

Keywords : Antidiabetic, Antioxidant, *Coffea arabica* L., Flavonoids, Purification

PENDAHULUAN

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menetralkan dan melawan radikal bebas dengan menghambat terjadinya oksidan pada sel tubuh sehingga mengurangi terjadinya oksidasi dan kerusakan sel. Kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki potensi sebagai antioksidan alami. Biji kopi mengandung senyawa aktif asam klorogenat, kafein, alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan polifenol (Pramono dan Puspitasarai, 2015; Wahyuono et al., 2017). Selain kandungan senyawa tersebut, pada biji kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) terdapat air, asam, sukrosa, gula pereduksi, lemak, karbohidrat, lilin, lipid, minyak dan yang lain yang dapat mengganggu aktivitas dari kopi hijau arabika.

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit kronis yang terjadi ketika pankreas tidak memproduksi insulin yang cukup atau ketika tubuh tidak dapat secara efektif menggunakan insulin yang dihasilkan. Penyakit DM Tipe II merupakan jenis penyakit DM yang paling sering terjadi di kalangan masyarakat dan menjadi masalah kesehatan yang utama di dunia. Indonesia menempati urutan ke 4 dengan prevalensi penderita DM di dunia setelah India, Cina dan Amerika Serikat (Pratiwi et al., 2014). Peningkatan aktivitas senyawa aktif bahan alam dapat dilakukan melalui purifikasi. Purifikasi merupakan metode untuk mendapatkan komponen bahan alam murni bebas dari komponen kimia lain yang tidak dibutuhkan. Purifikasi ekstrak diharapkan akan meningkatkan khasiat senyawa aktif dalam ekstrak (Srijanto et al., 2012).

Berdasarkan uraian tersebut akan dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai skrining awal aktifitas antioksidan dan aktifitas penurunan kadar glukosa pada ekstrak biji kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) terpurifikasi etil asetat. Penggunaan pelarut etil asetat diharapkan dapat menarik senyawa aktif pada ekstrak biji kopi hijau secara lebih optimal. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS (2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asamsulfonat), sedangkan uji aktifitas antidiabetes dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode *Nelson Somogyi*. Penelitian diharapkan dapat memberikan informasi dan pengetahuan mengenai pemanfaatan bahan alam sebagai alternatif terapi farmakologis.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Seperangkat alat ekstraksi dengan metode maserasi, blender, oven, batang pengaduk, kertas saring, corong kaca, erlenmeyer, gelas ukur, beker gelas, cawan penguap, neraca analitik OHAUS, *rotary evaporator* RE 100-Pro, waterbath memmert dan corong pisah. Alat untuk uji *in vitro* meliputi labu takar, tabung reaksi, mikropipet BioHit 1000 μ L, pipet ukur, pipet tetes, spatula, vial, kuvet, dan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV Mini 1240.

Bahan-bahan yang digunakan adalah biji kopi hijau arabika, etanol teknis 96%, aquades, etil asetat (Merck®), NaOH (Merck®), NaCl 10% (Merck®), FeCl₃ 1% (Merck®), pereaksi dragendorff, mayer, HCl p.a (Merck®), HCl 2 N, H₂SO₄ Pekat (Merck®), kloroform (Merck®), asam asetat anhidrat, ammonia, metanol p.a (Merck®), ABTS (Sigma-Aldrich®), kalium persulfat (Merck®), Vitamin C, reagen nelson somogyi dan arsenomolibdat.

Ekstraksi dan Purifikasi

Ekstrak kopi hijau arabika dibuat dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 10 (Puspitasari dan Pramono, 2015), yaitu sebanyak 300 gram serbuk simplisia kering dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 2250 mL, dan dilanjutkan dengan remaserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 750 mL. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C sehingga akan diperoleh ekstrak kental (Afonso et al., 2016).

Purifikasi ekstrak kopi hijau arabika dilakukan menggunakan pelarut etil asetat dengan menimbang sebanyak 10 gram ekstrak kasar kemudian dilarutkan dengan air panas sebanyak 200 ml (1:20) sampai homogen. Setiap 100 mL larutan dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan etil asetat sebanyak 100 mL (1:1). Sampai diperoleh pemisahan lapisan air dan etil asetat. Penambahan etil asetat dilakukan hingga diperoleh lapisan etil asetat yang bening dimana lapisan etil asetat akan berada pada lapisan atas. Hasil purifikasi ekstrak dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental terpurifikasi dan dihitung rendemennya (Idrus et al., 2018).

Uji Kadar Air

Uji kadar air menggunakan *moisture balance* bertujuan agar pada saat penyimpanan

ekstrak terbebas dari cemaran jamur dan kapang (Salim, 2016).

Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol bertujuan untuk membuktikan bahwa tidak ada kandungan etanol dalam ekstrak sehingga tidak mempengaruhi pada saat pengujian. Uji bebas etanol dilakukan menggunakan prinsip esterifikasi dengan menambahkan asam asetat dan katalis asam sulfat pekat pada ekstrak. Hasil bebas etanol pada ekstrak ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang terbentuk (Serlahwaty dan Sevian, 2016).

Skrining Fitokimia

Metode penapisan fitokimia secara kualitatif dilakukan menggunakan pereaksi warna untuk memberikan gambaran mengenai golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman (Serlahwaty dan Sevian, 2016).

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode ABTS

Ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) sebanyak 50 mg dilarutkan dalam metanol p.a ad 50 mL dalam labu ukur sehingga diperoleh larutan stok 1000 ppm dan kemudian dibuat seri kadar dengan konsentrasi 40 ppm, 50 ppm, 60 ppm, 70 ppm dan 80 ppm. Masing-masing konsentrasi masukkan dalam labu ukur 10 mL di encerkan dengan metanol p.a hingga tanda batas. Diambil 1 mL masing-masing konsentrasi larutan sampel dan ditambah 3 mL ABTS dicukupkan dengan methanol p.a pada labu ukur 5 ml. Larutan dihomogenkan, kemudian tunggu *operating time* dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal menggunakan spektrofotometer Uv-Vis (Sami dan Rahimah, 2016).

Pengujian Vitamin C sebagai pembanding

Sebanyak 50 mg vitamin C dilarutkan dalam 50 mL etanol p.a sehingga diperoleh larutan stok 1000 ppm. Kemudian, dilakukan pengenceran larutan dengan konsentrasi 3, 5, 7, 9, dan 11 ppm. Masing-masing konsentrasi dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan encerkan dengan metanol p.a hingga tanda batas. Diambil 1 mL masing-masing konsentrasi vitamin C dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah 3 mL ABTS dan dicukupkan dengan methanol pa pada labu ukur 5 ml. Larutan dihomogenkan, kemudian tunggu *operating time* dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimal menggunakan

spektrofotometer UV-Vis (Sami dan Rahimah, 2016).

Uji Antidiabetes *In Vitro* dengan Metode Nelson-Somogyi

Ekstrak terpurifikasi kopi hijau arabika masing-masing dibuat larutan stok sebanyak 1000 ppm. Sebanyak 100 mg ekstrak terpurifikasi dilarutkan ke dalam labu 100 ml dengan akuades sampai tanda batas, kemudian dibuat seri konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm. Masing-masing seri larutan diambil 3 mL dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 3 mL baku glukosa dengan konsentrasi 40 ppm dalam akuades. Larutan diambil 1 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, dan ditambah 1 mL reagen *nelson*. Selanjutnya, ditutup dengan kapas dan dipanaskan di atas air mendidih selama 10 menit. Larutan didinginkan selama 5 menit, ditambah 1 mL reagen Arsenomolibdat, dan ditambah akuades sampai tanda batas. Larutan selanjutnya diaduk perlahan dan didiamkan selama waktu inkubasi. Hasilnya dilakukan pembacaan dengan spektrofotometri UV-Vis dan *operating time* yang sesuai panjang gelombang maksimum.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman biji kopi hijau arabika merupakan tahap awal yang dilakukan pada sebuah penelitian sebelum melangkah ke tahap selanjutnya. Hasil dari determinasi menunjukkan bahwa sampel tanaman yang digunakan adalah benar kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.).

Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.)

Proses penarikan senyawa aktif dalam kopi hijau arabika dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan metode maserasi. Cairan penyari yang digunakan adalah etanol 96%. Etanol 96% dipilih sebagai larutan penyari karena mampu menarik senyawa aktif senyawa secara optimal dari senyawa dengan tingkat kepolaran rendah sampai tinggi. Proses maserasi dilakukan selama 24 jam dan diremaserasi selama 2x24 jam. Hasil ekstrak yang didapatkan setelah dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dan diuapkan dengan water bath yaitu sebanyak 54,83 gram dengan rendemen sebesar 18,28%. Penggunaan suhu 60°C yaitu disesuaikan dengan sifat senyawa metabolit sekunder yang terkandung

dalam biji kopi arabika dan tidak melebihi titik didih etanol yakni antara 78-79°C.

Pada penelitian ini dilakukan purifikasi atau pemurnian terhadap ekstrak yang didapat. Proses purifikasi adalah metode untuk mendapatkan komponen bahan alam murni bebas dari komponen kimia lain yang tidak dibutuhkan (Nugroho et al., 2013). Pada penelitian ini purifikasi dilakukan menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar. Pelarut semi polar mampu mengekstrak senyawa fenol, alkaloid, aglikon, glikosida. Jenis pelarut pengestraksi juga mempengaruhi jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak, sesuai konsep like dissolve like (Romadanu et al., 2014).

Hasil rendemen ekstrak purifikasi etil asetat diperoleh sebesar 85,9% b/b dengan bobot awal ekstrak kasar sebesar 10 gram. Hasil uji kadar air terhadap ekstrak purifikasi etil asetat diperoleh kadar presenyase 0,66% MC. Kadar air yang terkandung dalam ekstrak tidak boleh lebih dari 10% karena dapat mempengaruhi mutu sediaan ekstrak tersebut (Zainab et al., 2016).

Uji Bebas Etanol

Ekstrak dilarutkan dengan H₂SO₄ Pekat dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam asetat dipanaskan sampai mendidih. Hasil pengujian ekstrak terpurifikasi etil asetat kopi hijau arabika dinyatakan bebas dari etanol karena tidak tercium bau ester.

Skrining Fitokimia

Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak terpurifikasi etil asetat kopi hijau arabika positif mengandung senyawa metabolit flavonoid, alkaloid, tanin dan terpenoid sesuai yang terdapat pada literatur (Gunalan et al., 2012).

Pengujian Flavonoid Total

Hasil uji flavonoid total pada ekstrak biji kopi hijau arabika terpurifikasi etil asetat diperoleh sebesar 49,47 mg QE/g. Kandungan flavonoid pada biji kopi hijau arabika memiliki korelasi terhadap aktifitas antioksidan maupun antidiabetesnya.

Tabel 1. Hasil Uji Flavonoid Total

Parameter	Hasil (mg QE/g)
Flavonoid Total EBKHA terpurifikasi etil asetat	49,47

Keterangan :

EBKHA = Ekstrak Biji Kopi Hijau Arabika

Pengujian Antioksidan dengan Metode ABTS

Panjang gelombang larutan ABTS didapatkan λ maksimal yaitu 740,20 nm dengan absorbansi 0,709. Penelitian yang dilakukan (Mistriyani et al., 2017), panjang gelombang maksimum 734 nm dengan absorbansi 0,600-0,800. Panjang gelombang maksimum yang dipilih merupakan λ dengan absorbansi yang paling tinggi atau yang memiliki serapan maksimal. Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang mempunyai serapan maksimum yaitu saat senyawa berada pada kondisi optimum sehingga diperoleh kepekaan yang maksimum.

Prinsip *Operating time* yaitu dengan mengamati kestabilan senyawa produk, diketahui absorbansi mulai dari saat direaksikan hingga tercapai serapan yang stabil. Penentuan *operating time* dengan metode ABTS yang diukur pada panjang gelombang maksimum 740,20 nm dengan absorbansi 0,709 yang stabil dilakukan pada menit ke 1-40 lalu dihitung absorbansinya, dari hasil pengukuran *operating time* didapatkan absorbansi stabil pada menit ke-6 sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Fidrianny et al., (2016).

Aktivitas antioksidan ekstrak kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) secara ditentukan dengan metode ABTS yaitu berdasarkan kemampuan ekstrak kopi hijau arabika dalam mereduksi atau meredam radikal bebas ABTS. Kemampuan ekstrak kopi hijau arabika ditandai dengan berkurangnya intensitas warna biru dari larutan ABTS yang telah ditambahkan dalam sampel. Aktivitas penangkap radikal bebas ABTS juga ditentukan berdasarkan parameter *inhibitory concentration* (IC₅₀). Semakin kuat aktivitas penangkapan radikal ABTS yang diberikan suatu sampel maka akan menghasilkan nilai IC₅₀ semakin kecil (Isnindar, 2017; Romadanu et al., 2014).

Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode ABTS yang telah dilakukan terhadap purifikasi etil asetat didapatkan nilai IC₅₀ 69.95 ppm (kuat), dan pembanding vitamin C yang termasuk golongan antioksidan yang sangat kuat sebesar 8.11 ppm. Penelitian yang dilakukan dapat diketahui bahwa vitamin C memiliki aktivitas peredaman radikal bebas yang lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak purifikasi etil asetat.

Tabel 2. Hasil Uji Antioksidan Metode ABTS

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Abs Rata-rata \pm SD	Aktivitas Antioksidan (%)	IC ₅₀ (ppm) (Kategori)
EBKHA terpurifikasi etil asetat	40	0,629 \pm 0,007	11,90	69,95 (kuat)
	50	0,552 \pm 0,0085	22,69	
	60	0,440 \pm 0,0094	38,37	
	70	0,351 \pm 0,01	50,84	
	80	0,270 \pm 0,0025	62,18	
Vitamin C	3	0,562 \pm 0,0037	20,73	8,11 (sangat kuat)
	5	0,458 \pm 0,001	35,40	
	7	0,388 \pm 0,0075	45,27	
	8	0,321 \pm 0,0057	54,72	
	11	0,254 \pm 0,0063	64,27	

Keterangan :

EBKHA = Ekstrak Biji Kopi Hijau Arabika

Pengujian antioksidan dengan pembandingan vitamin C yang sudah terbukti memiliki kemampuan yang poten dan berperan sebagai antioksidan dengan cara donor atom hidrogen pada senyawa radikal bebas, sehingga kurang reaktif (Rohman et al., 2010).

Kandungan senyawa aktif dalam ekstrak biji kopi hijau arabika berperan sebagai aktivitas antioksidan. Selain flavonoid, pada biji kopi hijau arabika mengandung senyawa metabolik lain seperti asam klorogenat dan karetenoid yang membantu dalam peningkatan aktivitas antioksidan (Fidrianny et al., 2016).

Uji Aktivitas Antidiabetes secara *In Vitro*

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang

yang memberikan absorbansi maksimum. Pengujian dilakukan pada kisaran panjang gelombang antara 700-780 nm dan diperoleh panjang gelombang maksimum 751,8 nm dengan waktu *operating time* selama 19 menit.

Pengujian dilanjutkan dengan pembuatan kurva standar glukosa. Pembuatan kurva standar glukosa bertujuan untuk mendapatkan persamaan linearitas antara absorbansi dengan konsentrasi.

Tabel 3. Hasil Uji Antioksidan Metode ABTS

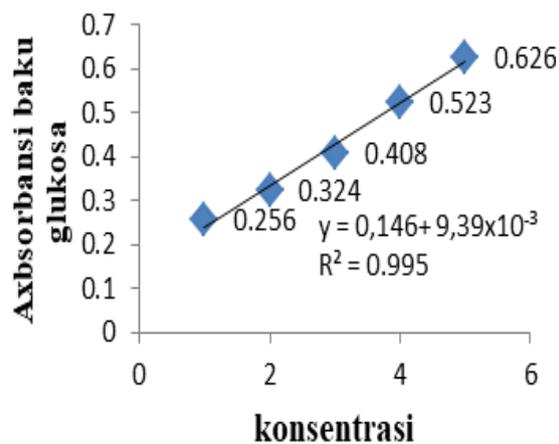
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
10	0.256
20	0.324
30	0.408
40	0.523
50	0.626

Tabel 4. Hasil Uji Penurunan Kadar Glukosa

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Rata-rata \pm SD	Kadar	%Penurunan
EBKHA terpurifikasi etil asetat	10	0,535 \pm 5,77x10 ⁻³	41,43	2.72
	20	0.478 \pm 0.02	35,36	16.97
	30	0.409 \pm 3.78x10 ⁻³	28,01	34.23
	40	0.367 \pm 8.36x10 ⁻³	23,54	44.73
	50	0.329 \pm 6.42x10 ⁻³	19,49	54.23
	60	0.276 \pm 2.64x10 ⁻³	13,84	67.50

Keterangan :

EBKHA = Ekstrak Biji Kopi Hijau Arabika



Gambar 1. Kurva standar glukosa

Pembuatan kurva kalibrasi dilakukan dengan membuat deret konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Persamaan linear yang didapatkan adalah $y = 0,146x + 0,0093$ dengan nilai koefisien korelasi $r = 0,995$. Persamaan regresi linier berfungsi untuk mengetahui pengaruh antara satu buah variabel bebas terhadap satu buah variabel terikat.

Pengukuran kadar glukosa didahului dengan pengukuran konsentrasi awal larutan glukosa untuk mengetahui konsentrasi glukosa secara kuantitatif yang digunakan sebelum ditambahkan dengan sampel. Konsentrasi ekstrak kopi hijau arabika yang digunakan adalah 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm. Hasil persen penurunan kadar glukosa ekstrak purifikasi etil asetat kopi hijau arabika sebesar 67,50%. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak terpurifikasi etil asetat kopi hijau arabika dapat memberikan penurunan kadar glukosa secara *in vitro*.

KESIMPULAN

Ekstrak terpurifikasi kopi hijau arabika mempunyai kandungan metabolit sekunder yaitu, flavonoid, alkaloid, tanin dan terpenoid. Ekstrak biji kopi hijau arabika (*Coffea arabica* L.) memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan metode ABTS. Nilai IC_{50} pada purifikasi etil asetat sebesar 69,95 ppm (kuat). Aktivitas menurunkan kadar glukosa secara optimal pada konsentrasi 60 ppm purifikasi etil asetat sebesar 67,50%. Kandungan flavonoid pada ekstrak kopi hijau arabika memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan mampu menurunkan kadar glukosa secara *in vitro*.

DAFTAR RUJUKAN

- Affonso, R.C.L., Voytena, A.P.L., Fanan, S., Pitz, H., Coelho, D.S., Horstmann, A.L., Pereira, A., Uarrota, V.G., Hillmann, M.C., Varela, L.A.C. and Ribeiro-do-Valle, R.M., (2016). Phytochemical composition, antioxidant activity, and the effect of the aqueous extract of coffee (*Coffea arabica* L.) bean residual press cake on the skin wound healing. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, PMC5124758.
- Fidrianny, I., Annisa., dan Ruslan, K. (2016). Antioxidant activities of arabica green coffee from three regions using ABTS and DPPH. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 9(2):189–193.
- 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.
- Idrus, H. H., Yuniarti, L., Fadilah, A. M., Mangarengi, Y., & Sodikah, Y. (2018). Efektifitas Ekstrak Buah Sawo Manila (*Achras zapota* L.) terhadap *Salmonella typhi* dengan Metode Agar Difusi. *UMI Medical Journal*, 4(01), 1-10.
- Mistriyani., Riyanto, S., dan Rohman, A. (2018). Antioxidant activities of Rambutan (*Nephelium lappaceum* L) peel in vitro. *Food Research*. 2(1):19–123.
- Nugroho, A. E., Malik, A., & Pramono, S. (2013). Total phenolic and flavonoid contents, and in vitro antihypertension activity of purified extract of Indonesian cashew leaves (*Anacardium occidentale* L.). *International food research journal*, 20(1).
- Pramono, S., & Puspitasari, A. D. (2015). Comparison Of Methods Of Producing Bee Propolis Purified Extract Based On Total Flavonoid Content Using Rutin As Standard. *Majalah Obat Tradisional*, 20(2), 81-86.
- Pratiwi, P., Amatiria, G., & Yamin, M. (2016). Pengaruh Stress Terhadap Kadar Gula Darah Sewaktu Pada Pasien Diabetes Melitus Yang Menjalani Hemodialisa. *Jurnal Kesehatan*, 5(1).
- Rohman, A., Riyanto, S., Yuniarti, N., Saputra, W. R., Utami, R., & Mulatsih, W. (2010). Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts and fractions

- of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam). *International Food Research Journal*, 17(1), 97-106.
- Romadanu, R., Hanggita, S., & Lestari, S. D. (2014). Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Jurnal Fishtech*, 3(1), 1-7.
- Salim, M., Sulistyaningrum, N., Isnawati, A., Sitorus, H., Yahya, Y., & Ni'mah, T. (2016). Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Kulit Buah Duku (*Lansium domesticum* Corr) dari Provinsi Sumatera Selatan dan Jambi. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 6(2), 117-128.
- Sami, F. J., & Rahimah, S. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga Brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) dengan Metode DPPH (2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan Metode ABTS (2, 2 azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 2(2), 107-110.
- Serlahwaty, D., & Seviaan, A. N. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Kombinasi Buah Strawberry Dan Tomat Dengan Metode ABTS. *In Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences* (Vol. 3, pp. 322-330).
- Srijanto, B., Olivia, B.P., Lely, K., Eriawan, R., dan Sriningsih. (2012). Pemurnian Ekstrak Etanol Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Ness) dengan Teknik Ekstraksi Cair-Cair. *Prosiding InSINas 2012*, 26-29.
- Wahyuono, S., Widyarini, S., & Yuswanto, Y. (2017). Aktivitas Antioksidan Buah Kopi Hijau Merapi. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 2(2), 130-136.
- Zainab, G. F., Witasari, H. A., Edityaningrum, C. A., & Mustofa, M. M. (2016). Penetapan parameter standarisasi non spesifik ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Jakarta (ID) *Prosiding Rakernas dan Pertemuan Ilmiah Tahunan Ikatan Apoteker Indonesia*.210-214.