

Fingerprinting FTIR-ATR Fraksi Kopi Robusta dan Arabika serta Korelasinya terhadap Aktivitas Antioksidan

[FTIR-ATR Fingerprinting of Robusta and Arabica Coffee Fraction and Its Correlation with Their Antioxidant Activity]

Masjuwina Simatupang¹⁾, Dian Herawati^{1,2)*}, dan Nancy Dewi Yuliana^{1,2)}

¹⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB University, Bogor, Indonesia

²⁾ South-East Asia Food & Agricultural Science and Technology (SEAFST) Center-LPPM, IPB University, Bogor, Indonesia

Diterima 16 Desember 2022 / Disetujui 14 April 2023

ABSTRACT

Coffee has a positive effect on health due to its high content of antioxidant compounds. The potential antioxidant activity of coffee is strongly influenced by its chemical compound profile. This study aimed to analyze the effect of different solvents on the chemical metabolites profile, antioxidant activity, and to determine the relevant chemical functional groups which positively contribute to the coffee's antioxidant activity. In this study, methanolic extract of coffee samples from robusta and arabica varieties were fractionated by liquid-liquid fractionation method using four solvents with different polarities. ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) and cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assays were applied to measure the antioxidant activity of the coffee fractions. Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) based chemometric approach was used to identify the compound functional groups as the fingerprinting profile of the coffee fractions. Correlation between the FTIR-ATR fingerprinting with the antioxidant activity of the coffee fractions was studied using multivariate data analysis, i.e. Principal Component Analysis (PCA) and Orthogonal Partial Least Squares (OPLS). From this study, a reliable PCA model to evaluate the effect of different solvents to FTIR-ATR fingerprinting profile was produced. The correlation between FTIR-ATR fingerprinting profile with the antioxidant activity and the characterization of the chemical functional groups relevant to its antioxidant activity can be analyzed by a reliable OPLS model obtained. This study suggests that the highest antioxidant potential in coffee is found in ethyl acetate fraction both in robusta and arabica coffee samples, while the relevant chemical functional groups having positive correlation to antioxidant activity of coffee were phenol, carbonyl, cyclohexane, aromatic, amide, phenyl, amino, and alkene groups.

Keywords: ABTS, chemometric, coffee antioxidant, CUPRAC, FTIR-ATR

ABSTRAK

Kopi memiliki efek positif bagi kesehatan karena kandungan senyawa antioksidan yang tinggi. Potensi aktivitas antioksidan kopi sangat dipengaruhi oleh profil senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap profil metabolit kimia dan aktivitas antioksidan yang dihasilkan serta untuk mengetahui gugus fungsi senyawa yang berkorelasi positif dengan aktivitas antioksidan kopi. Pada penelitian ini, ekstrak metanolik sampel kopi dari varietas robusta dan arabika difraksinasi bertingkat cair-cair menggunakan 4 pelarut dengan polaritas yang berbeda. ABTS dan CUPRAC assay diterapkan untuk pengukuran aktivitas antioksidan dari fraksi kopi. Pendekatan kemometrik berbasis FTIR-ATR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi senyawa sebagai profil *fingerprinting* fraksi kopi. Korelasi *fingerprinting* FTIR-ATR dengan aktivitas antioksidan fraksi kopi dipelajari dengan metode analisis data multivariat PCA dan OPLS. Hasilnya diperoleh model PCA yang terpercaya untuk mengevaluasi pengaruh perbedaan pelarut terhadap profil *fingerprinting* FTIR-ATR. Korelasi antara profil *fingerprinting* FTIR dengan aktivitas antioksidan serta karakterisasi gugus fungsi relevan terhadap aktivitas antioksidan dapat dianalisis dengan model OPLS terpercaya yang dihasilkan pada penelitian ini. Potensi antioksidan kopi paling tinggi terdapat pada fraksi etil asetat baik pada sampel kopi robusta maupun arabika, serta gugus fungsi senyawa yang relevan dan berkorelasi positif dengan aktivitas antioksidan kopi, di antaranya adalah gugus fenol, karbonil, sikloheksana, aromatik, amida, fenil, amino, dan alkena.

Kata kunci: ABTS, antioksidan kopi, CUPRAC, FTIR-ATR, kemometrik

*Penulis Korespondensi: E-mail: dian@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Kopi merupakan produk pangan yang telah lama dikonsumsi manusia dan termasuk dalam minuman yang sangat populer di dunia. Dari sekian banyak varietas kopi, *Coffea canephora* (kopi robusta) dan *Coffea arabica* (kopi arabika) merupakan kopi yang paling banyak dikembangkan secara komersial. Keduanya memiliki perbedaan fisik, karakteristik tanaman, karakteristik cita rasa, hingga komposisi kandungan senyawa kimia (Adetunji *et al.*, 2021). Beragam senyawa yang terkandung dalam kopi dapat berperan sebagai senyawa bioaktif yang berdampak positif bagi kesehatan manusia (Cano-Marquina *et al.*, 2013).

Salah satu potensi bioaktivitas yang dimiliki oleh kopi adalah antioksidan. Di antara minuman yang dikonsumsi oleh manusia, kopi merupakan minuman dengan kapasitas antioksidan total (*Total Antioxidant Capacity/TAC*) yang tertinggi (Pellegrini *et al.*, 2003). Kopi mengandung beragam jenis senyawa antioksidan. Kandungan senyawa dan profil kimia yang berbeda akan menghasilkan aktivitas antioksidan yang berbeda pula (Yashin *et al.*, 2017). Nilai TAC kopi juga sangat dipengaruhi oleh interaksi antar senyawa antioksidan yang terkandung di dalamnya (Liang *et al.*, 2016b).

Profil kandungan senyawa dalam kopi sangat dipengaruhi oleh varietas, kondisi geografis dan iklim tumbuh tanaman, metode penanganan pascapanen, metode pengolahan, prosedur penyangraian, metode penggilingan, hingga metode penyeduhan (Hameed *et al.*, 2018; Bastian *et al.*, 2021). Salah satu faktor yang banyak dipelajari pengaruhnya terhadap komposisi senyawa, profil kimia, dan aktivitas antioksidan dari kopi adalah tingkat penyangraian biji kopi (Vignoli *et al.*, 2014; Kurniawan *et al.*, 2017; Herawati *et al.*, 2019a). Selain itu, pengaruh varietas kopi (Putri *et al.*, 2019; Wonorahardjo *et al.*, 2019), metode penyeduhan (Derossi *et al.*, 2018; Sunarharum dan Farhan, 2020), dan prosedur pascapanen biji kopi (Rodriguez *et al.*, 2020; Yulianti *et al.*, 2022) juga telah dipelajari. Faktor lain yang sangat memengaruhi profil kandungan senyawa dalam kopi adalah penggunaan pelarut dalam mengikat atau memisahkan metabolit yang memiliki aktivitas antioksidan dari komponen yang tidak memiliki aktivitas antioksidan (Abubakar dan Haque, 2020). Penggunaan pelarut yang tepat akan meningkatkan efisiensi ekstraksi/pemisahan metabolit aktif dari bahan, sehingga dapat mengikat sebanyak mungkin senyawa target yang memiliki aktivitas (Sasidharan *et al.*, 2011). Penelitian sebelumnya banyak menggunakan pelarut polar seperti air dalam tahap ekstraksi kopi serta pelarut alkohol, seperti metanol dan etanol, yang menghasilkan ekstrak kasar dengan kandungan senyawa yang relatif masih kompleks. Oleh sebab itu, profil senyawa semi polar dan nonpolar yang berpo-

tensi sebagai antioksidan dalam kopi kurang banyak dieksplorasi.

Ekstrak metanolik sampel kopi varietas robusta dan arabika difraksinasi menggunakan 4 pelarut dengan polaritas yang berbeda. Profil kimia fraksi kopi dianalisis dengan mengidentifikasi keberadaan gugus fungsi senyawa yang dihasilkan berdasarkan vibrasi molekul dengan menggunakan teknik spektroskopi FTIR-ATR. Metode uji antioksidan ABTS dan CUPRAC diterapkan untuk mengukur aktivitas antioksidan dari fraksi kopi. Korelasi *fingerprinting* FTIR-ATR dengan aktivitas antioksidan fraksi kopi dipelajari dengan metode analisis data multivariat dengan pemodelan PCA dan OPLS. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh perbedaan polaritas pelarut terhadap profil metabolit kimia dan aktivitas antioksidan yang dihasilkan, serta untuk mengkarakterisasi gugus fungsi senyawa yang relevan dan berkorelasi positif pada aktivitas antioksidan kopi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah biji kopi (*green bean*) dari varietas *Coffea canephora* (kopi robusta) dan *Coffea arabica* (kopi arabika), keduanya menggunakan biji kopi *single origin* Flores dengan pengolahan basah (*full washed*) yang diperoleh dari Kemenady Coffee & Roaster (Bogor). Varietas robusta dan arabika dipilih karena keduanya merupakan kopi yang paling banyak dikembangkan secara komersil.

Preparasi sampel kopi

Sebanyak 1 kg dari masing-masing sampel biji kopi varietas robusta dan arabika disangrai dengan suhu 190-200°C selama 10 menit untuk mendapatkan kopi sangrai pada tingkat *light roasted* (*micro-roaster* William we600i, Indonesia). Masing-masing varietas kopi disangrai dengan pengulangan 3 kali. Selanjutnya 700 g sampel kopi sangrai dihaluskan hingga ukuran sekitar 500 microns (*grade 4* pada *grinder* Mahlkönig GmbH & Co.KG Type EK43/1, Germany). Sampel kopi bubuk diayak dengan *analytical sieve shaker* 30 mesh (AS 200 Control, Germany) (Herawati *et al.*, 2019a). Sampel kopi disimpan dalam kemasan *vacuum insulated pouch*.

Karakterisasi sampel kopi

Pada sampel kopi robusta dan arabika, dilakukan karakterisasi kadar air dengan menggunakan oven (Gemmy YCO-010, Taiwan) (AOAC, 2012), *water activity* dengan a_w meter (Decagon AquaLab LITE, USA) *bulk density* biji kopi dengan mengacu pada Niwagaba dan KipkoechSitienei (2019), dan indeks refraktan (parameter L^*) menggunakan

chromameter (Minolta CR-400, Japan). Penentuan warna (indeks reflaktan L^*) dilakukan untuk analisis tingkat sangrai dari sampel kopi dan tahap eliminasi sampel kopi yang akan dianalisis lebih lanjut. Selisih nilai L^* yang mendekati antara kopi robusta dan kopi arabika merepresentasikan kondisi tingkat sangrai yang saling menyerupai.

Ekstraksi dan fraksinasi sampel kopi

Tahap ekstraksi dilakukan mengacu pada Sharifi *et al.* (2017) dengan sedikit modifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah kadar pelarut metanol yang digunakan serta waktu dan banyaknya ulangan sonikasi. Sebanyak 300 g sampel kopi terpilih diekstrak dengan metanol 80% (Merck, Germany) sebanyak 2 kali volume sampel kopi, ekstraksi dilakukan dengan bantuan *ultrasonic* (Elmasonic, 37kHz, Germany) selama 30 menit pada suhu ruang (28°C). Kemudian, ekstrak disaring dengan kertas saring no.1 (Whatman, USA) pada corong Buchner. Untuk optimasi perolehan ekstrak metanolik, maka ekstraksi sonikasi dilakukan hingga 5 kali pengulangan. Filtrat yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan *rotary evaporator* (Büchi Rotavapor R-100, Büchi Labortechnik, Switzerland) pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak metanolik.

Fraksinasi ekstrak metanolik dilakukan dengan metode fraksinasi cair-cair yang mengacu pada Yuliana *et al.* (2020). Sebanyak 12 g ekstrak metanolik dilarutkan dalam 120 mL akuades. Dilakukan 4 kali penimbangan ekstrak metanolik dari masing-masing varietas, kemudian pada masing-masing ekstrak metanolik dilakukan fraksinasi bertingkat menggunakan corong pisah (Iwaki, Indonesia) dengan urutan pelarut (1:1 v/v) n-heksana (Merck, Germany), kloroform (Merck, Germany), dan etil asetat (Merck, Germany), sehingga total diperoleh total 32 fraksi sampel kopi. Fraksi kering n-heksana, kloroform, dan etil asetat diperoleh melalui penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator* (Büchi Rotavapor R-100, Büchi Labortechnik, Switzerland) pada suhu 40-50°C, sedangkan fraksi kering air diperoleh melalui pengeringan menggunakan *freeze dryer* (Biobase BK-FD10, China). Rendemen fraksi kering dari sampel kopi dihitung.

Analisis profil kimia fraksi kopi dengan FTIR-ATR

Analisis profil kimia dilakukan mengacu pada Liang *et al.* (2016a) dengan menggunakan instrumen spektrofotometer FTIR-ATR (Thermo Scientific Nicolet iS10, USA) dengan detektor *Deuterated Triglycine Sulfate* (DGTS). Sebanyak ± 2 mg fraksi ditempatkan di atas kristal ATR untuk dianalisis. *Scanning* spektrum dilakukan pada daerah inframerah, yaitu pada panjang gelombang 4000-400 cm^{-1} dengan resolusi 2 cm^{-1} . Spektra diproses dengan menggunakan Nicolet iS10 OMNIC Software Suite.

Uji aktivitas antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan fraksi kopi dilakukan dengan metode ABTS yang mengacu pada Song *et al.* (2018) dengan sedikit modifikasi. Modifikasi dilakukan pada waktu inkubasi dalam kondisi gelap sebelum dilakukan pengukuran absorbansi sampel. Larutan *phosphate buffer saline* (PBS) dibuat dari 0,2 g KCl, 8 g NaCl, 0,24 g KH_2PO_4 , 1,78 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam akuades, pH larutan disesuaikan dengan penambahan larutan NaOH 0,1M hingga mencapai pH 7,4 (pH Meter Peak Instrumen T-710, USA). Larutan PBS digunakan untuk membuat larutan $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (*po-tassium persulfate*) 2,45 mM, kemudian dicampurkan dengan larutan stok ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazone 6-sulfonate) 7 mM dan diinkubasi dalam gelap pada suhu ruang selama 16 jam. Absorbansi pengenceran larutan ABTS *working* diatur dengan etanol hingga absorbansinya sekitar 0,7 (pada $\lambda = 734$ nm). Sebanyak 2 μL fraksi sampel 1% (1 g fraksi kering/100 mL larutan) dicampurkan dengan 198 μL ABTS *working* dalam *well microplate* (Iwaki, Indonesia), kemudian dimasukkan ke dalam *microplate reader* (Thermo Scientific Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer, USA) untuk diinkubasi selama 15 menit dalam ruang gelap sebelum dilakukan pengukuran absorbansi ($\lambda = 734$ nm). Asam askorbat digunakan sebagai standar. Setiap pengujian dilakukan dalam 3 kali ulangan. Aktivitas antioksidan dihitung sebagai persen inhibisi.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_k - A_s}{A_k} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

A_k merupakan absorbansi kontrol (tanpa standar dan sampel fraksi), dan A_s merupakan absorbansi dari standar dan sampel fraksi.

Metode CUPRAC yang digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan fraksi kopi pada penelitian ini mengacu pada Osipova *et al.* (2021) dengan sedikit modifikasi. Modifikasi yang dilakukan ada pada penggunaan pelarut dalam pembuatan larutan *neocuproine* 7,5 mM. pH larutan *buffer* amonium asetat 1 M diatur hingga mencapai pH 7 dengan menggunakan NaOH 1 M, lalu dicampurkan dengan larutan CuCl_2 10 mM dalam akuades, dan larutan *neocuproine* 7,5 mM dalam etanol 96% dalam jumlah yang sama (50 μL) ke dalam *well microplate*. Kemudian ditambahkan 50 μL fraksi sampel (400 ppm dalam etanol 96%), campuran tanpa fraksi sampel digunakan sebagai blanko. *Well microplate* diinkubasi dalam *microplate reader* selama 30 menit, lalu dilakukan pengukuran absorbansi ($\lambda = 450$ nm). Larutan standar *trolox* digunakan untuk membuat kurva kalibrasi, deret konsentrasi *trolox* dibuat pada rentang 12,5–500 μM . Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam $\mu\text{mol trolox/g}$ sampel. Setiap pengujian dilakukan dalam 3 ulangan.

Seluruh reagen yang digunakan merupakan reagen *grade pro analysis* (PA) dan sebagian besar berasal dari produsen Merck (Germany), kecuali reagen ABTS, *neocuproine*, dan *trolox* yang berasal dari produsen Sigma Aldrich (Germany).

Analisis data penelitian

Preprocessing data spektra *output* dari software instrumen FTIR-ATR dilakukan dengan software The UnscramblerX ver 10.4 (CAMO Software, Norway) dan OriginPro 2021 (OriginLab, USA). Analisis multivariat PCA dan OPLS dilakukan dengan menggunakan software SIMCA ver 14.1 (Umetrics, Swedia). Pada pemodelan PCA digunakan data absorbansi gugus fungsi yang diperoleh dari analisis instrumen FTIR-ATR. Kualitas model dinilai berdasarkan kriteria akurasi model (R^2Y) dan akurasi prediksi (Q^2Y) sebagai parameter. Pemodelan PCA digunakan untuk menyederhanakan data *fingerprinting* gugus fungsi dari FTIR-ATR yang sangat kompleks ke dalam bentuk kelompok, kluster, tren, atau *outlier* di antara sampel pengamatan (Souard *et al.*, 2019). Pada pemodelan OPLS digunakan data absorbansi gugus fungsi hasil analisis instrumen FTIR-ATR sebagai variabel penduga (X) dan hasil analisis aktivitas antioksidan sebagai variabel respon (Y). Validasi model dilakukan dengan CV-ANOVA dan uji permutasi. Koefisien terkait Y (*Y-related profile*) dan nilai VIP (*Variable Influence on Projection*) digunakan untuk memilih daerah spektra FTIR yang berkorelasi dengan aktivitas antioksidan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan beberapa parameter karakterisasi sampel kopi, dipilih parameter L^* (*lightness*) sebagai parameter utama untuk pemilihan sampel kopi robusta dan arabika yang dianalisis karena nilai L^* berkaitan secara konstan dengan profil sangrai kopi (Bicho *et al.*, 2012). Pengukuran indeks refraktan L^* a^* b^* yang mengacu pada Bicho *et al.* (2012) dilakukan dalam 3 kali ulangan untuk setiap sampel kopi. Untuk mendapatkan ekstrak metanolik sampel kopi, digunakan pelarut metanol karena kemampuannya dalam mengekstrak berbagai senyawa aktif dari bahan tanaman baik yang bersifat polar, semipolar, maupun nonpolar (Zhang *et al.*, 2018; Truong *et al.*, 2019). Konsentrasi metanol 80% (campuran metanol-akuades) dipilih karena merupakan kondisi pelarut optimum untuk mengekstrak komponen antioksidan alami yang berasal dari bahan tanaman (Anwar *et al.*, 2010; Teboukeu *et al.*, 2018). Metode sonikasi dilakukan untuk meningkatkan permeabilitas dinding sel sampel kopi, dengan penerapan *ultrasound* pada frekuensi yang sangat tinggi, agar pelarut ekstraksi dapat lebih mudah berpenetrasi ke dalam matriks

sampel kopi, sehingga proses ekstraksi berjalan lebih efisien (Michail *et al.*, 2016).

Ekstrak metanolik yang dihasilkan dari proses ekstraksi bahan merupakan ekstrak kasar yang masih berupa campuran metabolit yang relatif kompleks (Sasidharan *et al.*, 2011). Fraksinasi bertingkat cair-cair dengan beberapa jenis pelarut dengan polaritas yang berbeda dilakukan untuk memisahkan ekstrak kasar menjadi beberapa fraksi/kelompok senyawa dengan kepolaran yang cenderung sama (Abubakar dan Haque, 2020). Dalam proses fraksinasi bertingkat cair-cair terjadi kontak langsung antara dua pelarut, sehingga perlu dipertimbangkan penggunaan pelarut dengan polaritas yang berbeda agar tidak saling larut dan terpisah menjadi dua fase untuk memudahkan pemisahan (Gonçalves *et al.*, 2015).

Fraksi kering dari empat pelarut berbeda yang dihasilkan dari fraksinasi ekstrak metanolik sampel kopi robusta dan arabika secara representatif dapat dilihat pada Gambar 1 (A), fraksi dari setiap pelarut memiliki bentuk yang berbeda. Gambar 1 (B) menunjukkan rata-rata rendemen, dan fraksi terbanyak adalah fraksi air, nilainya berkisar antara 57,85-63,36%. Kemudian rendemen fraksi paling sedikit diperoleh dari fraksi n-heksana dengan kisaran nilai antara 0,39-0,93%. Hal ini menunjukkan bahwa kandungan ekstrak metanolik sampel kopi robusta dan arabika didominasi oleh senyawa polar.

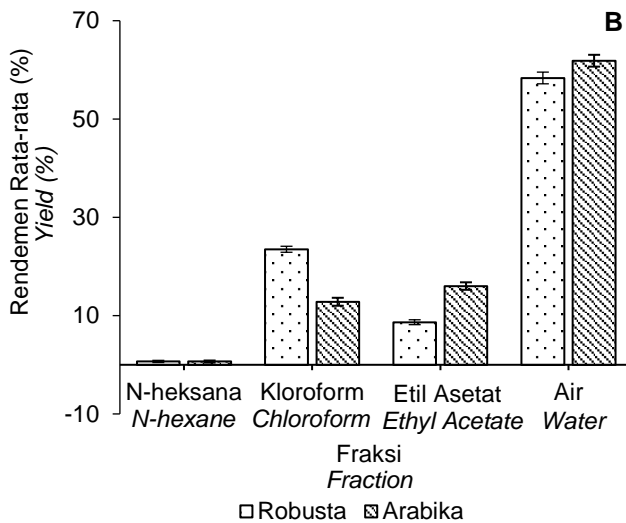
Profil kimia fraksi kopi

Spektra FTIR-ATR dari empat fraksi sampel kopi robusta dan arabika secara representatif ditunjukkan pada Gambar 2. Perbedaan varietas sampel kopi, yaitu robusta dan arabika, tidak menunjukkan adanya perbedaan nyata pada profil *fingerprinting*-nya. Namun, masing-masing fraksi kopi dengan pelarut yang berbeda memiliki profil *fingerprinting* yang khas dan berbeda satu dengan lainnya.

Pada dasarnya, daerah bilangan gelombang *mid infrared* ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) terdiri dari 4 daerah utama, yaitu daerah ikatan rangkap tiga ($2500-2000\text{ cm}^{-1}$, umumnya ikatan $C\equiv N$ dan $C\equiv C$), daerah regangan X-H ($4000-2500\text{ cm}^{-1}$, menggambarkan regangan ikatan O-H, C-H, dan N-H), daerah sidik jari, dan daerah ikatan rangkap dua ($2000-1500\text{ cm}^{-1}$, umumnya menunjukkan pita serapan C=C, C=O, dan C=N) (Nawrocka dan Lamorska, 2013). Perbedaan yang jelas terlihat dari keempat spektra tersebut, yaitu pada fraksi air dan etil asetat terdapat puncak melebar pada daerah $3350-3200\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan serapan dari gugus fungsi hidroksil atau fenol (O-H). Kemudian pada fraksi n-heksana terdapat puncak pada daerah $2950-2850\text{ cm}^{-1}$ dengan intensitas serapan yang cukup tinggi dibandingkan dengan fraksi lain, puncak tersebut merupakan serapan gugus fungsi alkana (C-H). Menurut Wang dan Lim (2012), vibrasi ulur ikatan C-H pada kopi sangrai terutama berasal dari lipid. Hal ini sejalan dengan

penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa n-heksana merupakan pelarut yang paling optimum untuk mengekstrak lipid dari kopi (Loyao *et al.*, 2018). Puncak 1730 cm^{-1} pada fraksi n-heksana juga merupakan serapan gugus karbonil (C=O) alifatik kelompok ester yang berkaitan dengan keberadaan lipid (Craig *et al.*, 2015).

1640 cm^{-1} spesifik merujuk pada gugus fungsi karbonil dari kafein. Identifikasi keberadaan senyawa secara spesifik berdasarkan gugus fungsi dengan menggunakan spektra FTIR-ATR belum dapat dilakukan secara pasti, namun data gugus fungsi yang spesifik pada setiap senyawa dapat digunakan untuk menganalisis korelasi spektra dengan sifat sampel menggunakan pendekatan kemometrik (Munyendo *et al.*, 2022). Identifikasi gugus fungsi pada fraksi kopi dengan FTIR-ATR menghasilkan spektra dengan set data yang cukup besar, untuk dapat mengimbangi kumpulan data tersebut dapat dilakukan pengolahan data dengan metode analisis data multivariat (Worley dan Powers, 2013).



Keterangan: I= Arabika, II= Robusta, H= n-heksana, K= kloroform, E= etil asetat, A= air
 Note: H= n-hexane, K= chloroform, E= ethyl acetate, A= water/distilled water

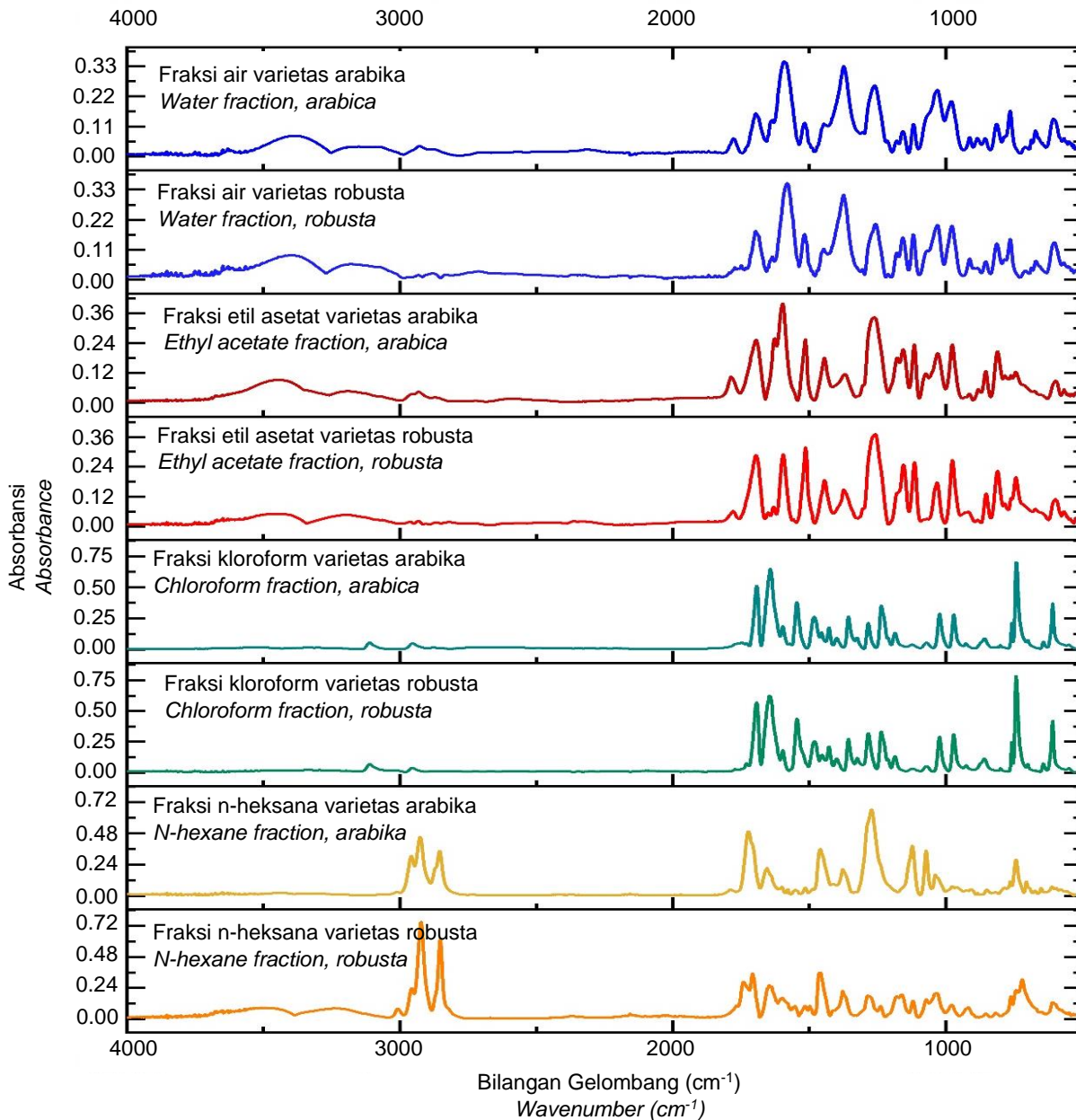
Gambar 1. Fraksi kering (A) dan % rendemen fraksi (B) sampel kopi robusta dan arabika
 Figure 1. Dried fraction (A) and % yield fraction (B) of robusta and arabica coffee samples

Perbedaan lain yang terlihat, yaitu pada fraksi kloroform terdapat dua puncak tajam berdekatan dengan intensitas serapan yang cukup tinggi pada bilangan gelombang 1700 dan 1640 cm^{-1} , sementara pada fraksi lain, hanya terdapat 1 puncak pada bilangan gelombang 1700 cm^{-1} dengan serapan medium. Kedua puncak tersebut merupakan serapan gugus fungsi karbonil (C=O), namun menurut Link *et al.* (2014) dan Craig *et al.* (2017), bilangan gelombang

Aktivitas antioksidan fraksi kopi

Pengujian aktivitas antioksidan fraksi kopi dilakukan dengan metode ABTS dan CUPRAC. Keduanya dipilih karena memiliki kelarutan yang baik dalam pelarut air dan pelarut organik, sehingga berpotensi untuk pengujian senyawa antioksidan yang bersifat lipofilik dan hidrofilik (Özyürek *et al.*, 2011). Pengukuran aktivitas antioksidan fraksi kopi dengan metode ABTS dan CUPRAC menunjukkan hasil yang bervariasi (Gambar 3). Berdasarkan fraksi sampel kopi yang diukur, metode pengujian aktivitas antioksidan ABTS dan CUPRAC menunjukkan profil yang relatif sama, aktivitas antioksidan tertinggi ada pada fraksi etil asetat, kemudian diikuti oleh fraksi air. Sementara fraksi kloroform dan n-heksana menunjukkan tingkat aktivitas antioksidan yang rendah, dengan profil yang sedikit berbeda pada metode ABTS dan CUPRAC. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari sampel kopi sangat dipengaruhi oleh komposisi dan kandungan senyawa yang cenderung polar.

Uji lanjut *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5% menunjukkan terdapat perbedaan profil aktivitas antioksidan yang terukur dengan metode ABTS dan CUPRAC. Berdasarkan varietas sampel kopi, hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS menunjukkan bahwa % inhibisi seluruh fraksi sampel kopi arabika relatif lebih besar dibandingkan dengan fraksi sampel kopi robusta. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode CUPRAC menghasilkan profil yang berbeda pada fraksi etil asetat dan air, kapasitas antioksidan fraksi etil asetat dan air dari sampel kopi robusta lebih besar dibandingkan dengan sampel kopi arabika. Nilai rata-rata persen inhibisi sampel kopi arabika adalah 94,80%. Namun pengukuran kapasitas antioksidan dengan metode CUPRAC menghasilkan nilai rata-rata kapasitas antioksidan untuk fraksi etil asetat sampel kopi robusta sebesar 5,85 mmol TE/g, yang lebih tinggi dan berbeda signifikan dibandingkan dengan sampel kopi arabika (5,57 mmol TE/g). Hal ini dapat terjadi karena metode evaluasi aktivitas antioksidan yang berbeda memiliki mekanisme aksi yang berbeda pula (Pokorná *et al.*, 2015; Anh-Dao *et al.*, 2022).



Gambar 2. Spektra FTIR-ATR fraksi n-heksana, kloroform, etil asetat, dan air dari sampel kopi robusta dan arabika

Figure 2. FTIR-ATR spectra of n-hexane, chloroform, ethyl acetate, and water fractions from robusta and arabica coffee samples

Hasil analisis data multivariat

Pada penelitian ini dihasilkan data hasil analisis metabolit dengan dimensi yang besar, untuk mengimbangi tingginya dimensi data yang diperoleh, maka digunakan metode analisis data multivariat yang dapat menganalisis kumpulan data secara menyeluruh sehingga dapat diperoleh kesimpulan yang relevan (Worley dan Powers, 2013). Pendekatan statistika dalam metode analisis data multivariat dapat dimanfaatkan untuk analisis beberapa variabel secara bersamaan (Long, 2013).

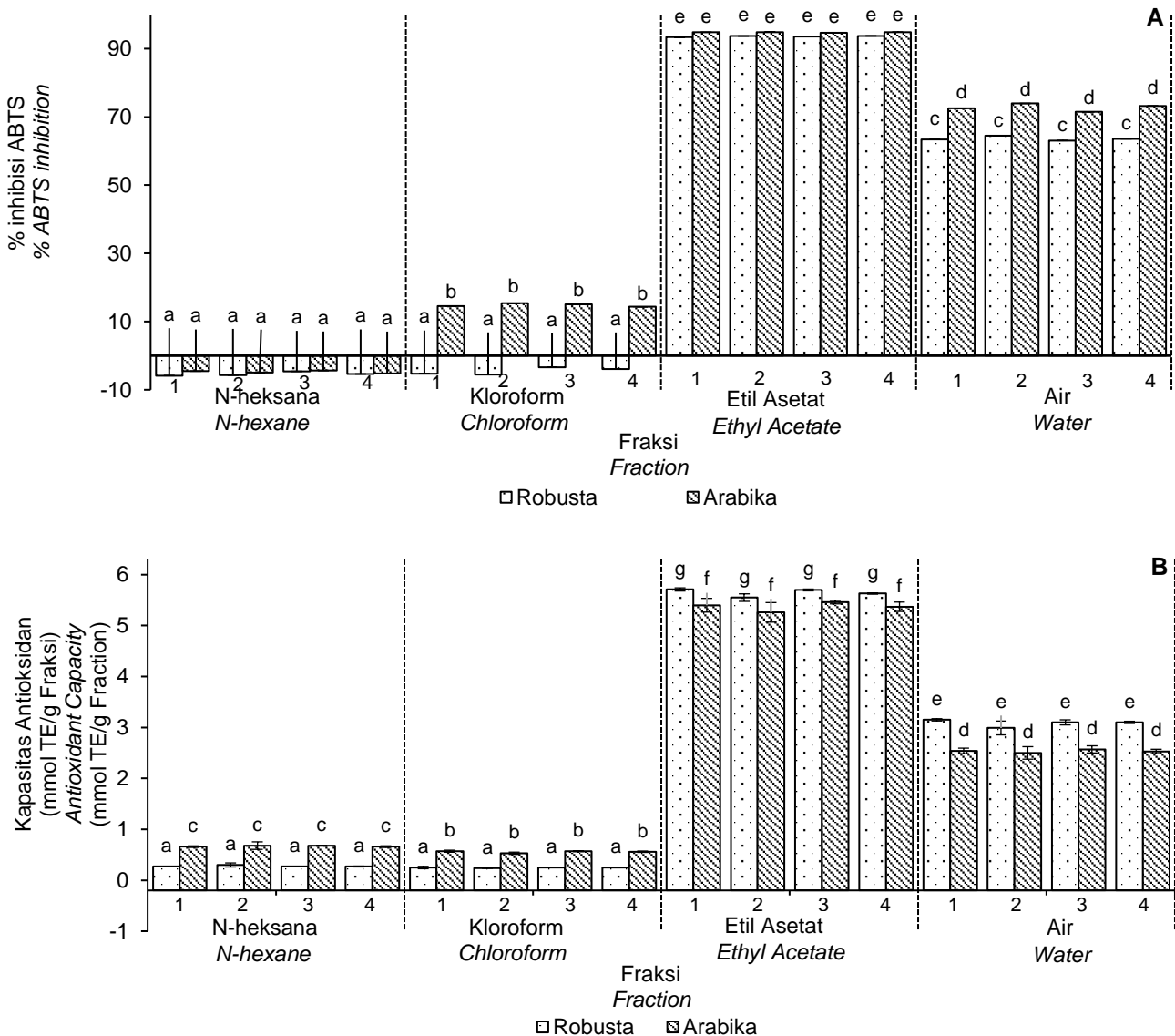
Hasil analisis PCA dari data spektra FTIR-ATR (Gambar 4A), menunjukkan bahwa tren klasifikasi berdasarkan varietas sampel kopi kurang mengelompok dengan baik, hanya ada tren pengelompokan kopi robusta dan arabika dari fraksi n-heksana. Sementara jika diklasifikasikan berdasarkan pelarut fraksinya (Gambar 4B) terdapat tren pengelompokan yang tervisualisasi dengan baik. Hal ini menjelaskan bahwa data spektra FTIR-ATR tidak dapat menjelaskan perbedaan profil kimia fraksi antara sampel kopi robusta dan arabika. Sementara jika diklasifikasikan berdasarkan pelarut fraksinya, data spektra FTIR-

ATR dapat menggambarkan adanya perbedaan profil kimia dari masing-masing fraksi sampel kopi berdasarkan pelarutnya.

Model PCA yang dihasilkan pada penelitian ini memiliki nilai R^2X (cum) dan Q^2 (cum) masing-masing sebesar 0,998 dan 0,995. Nilai R^2X mendekati 1 dan nilai Q^2 lebih besar dari 0,5 membuktikan bahwa model PCA yang dihasilkan memiliki kredibilitas yang baik. Nilai R^2X menggambarkan kemampuan model menerangkan pengaruh perlakuan terhadap pengelompokan variabel X dan nilai Q^2 menggambarkan kemampuan prediktif model terhadap perlakuan dan variabel (Blasco *et al.*, 2015; Worley dan Powers,

2016). Model PCA dari data spektra FTIR-ATR penelitian ini menghasilkan 6 komponen utama (*Principal Component/PC*) yang dapat menjelaskan 99,8% keragaman data dari total variasi. Dua PC pertama pada *score plot* PCA (Gambar 4) dapat menerangkan 89,8% ($PC1= 80,3\%$; $PC2= 9,5\%$) keragaman data dari total variasi.

Menurut Worley dan Powers (2016), kemampuan pemodelan PCA masih terbatas, yaitu hanya mampu mengungkapkan perbedaan yang menjadi kontributor utama dari total keseluruhan variabilitas, misalnya dalam penelitian ini adalah fraksi dari beberapa pelarut sebagai faktor pembedanya.

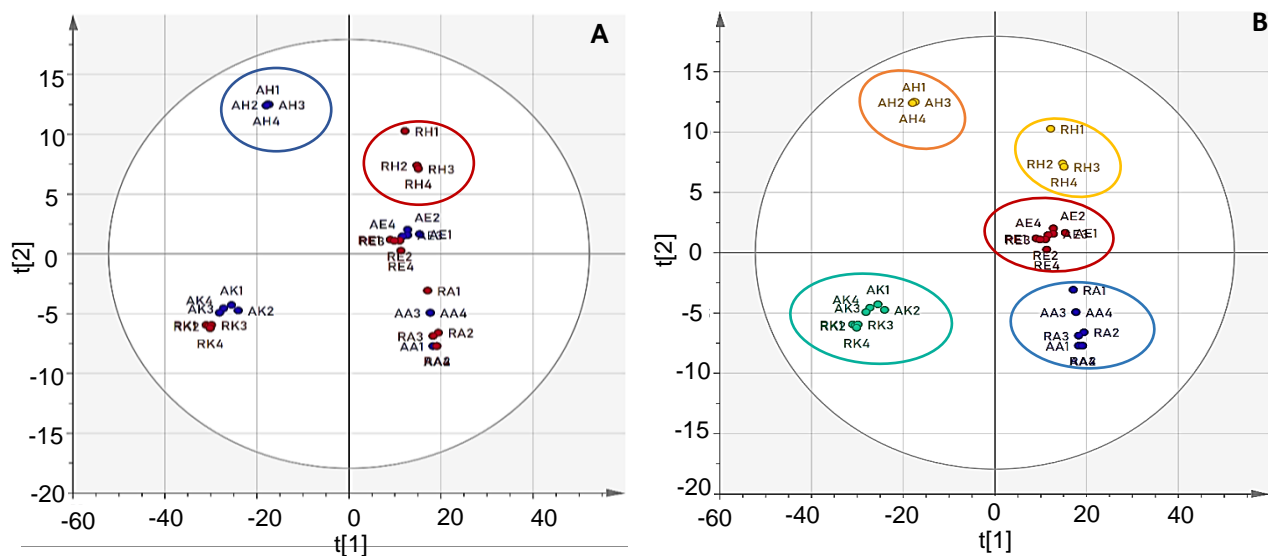


Keterangan: 1,2,3,4 = ulangan fraksinasi
 Note: 1,2,3,4 = fractionation repetition

Gambar 3. Aktivitas antioksidan fraksi kopi dengan metode ABTS (A) dan CUPRAC (B) untuk semua ulangan
 Figure 3. Antioxidant activity of coffee fraction by ABTS assay (A) and CUPRAC assay (B) for all replicates

Namun metode analisis PCA merupakan metode dasar untuk pengolahan data berdimensi tinggi, hasilnya dijadikan sebagai acuan dalam penilaian kualitas model yang dihasilkan. Jika model PCA yang dihasilkan kurang dapat diandalkan, maka analisis data multivariat lebih lanjut yang menggunakan variabel respon juga akan menghasilkan model dengan kredibilitas rendah. Analisis lebih lanjut dilakukan dengan metode analisis data multivariat *supervised Orthogonal Projection to the Least Square* (OPLS) yang dapat mereduksi dimensi data dengan mengorelasikan profil kimia dari fraksi sebagai variabel X (penduga) dengan aktivitas antioksidannya sebagai variabel Y (respon). Analisis OPLS digunakan untuk mempelajari gugus fungsi dari fraksi kopi yang memiliki korelasi positif terhadap aktivitas antioksidan dengan cara memisahkan perubahan pada variabel X menjadi dua kelompok, yaitu kelompok yang berkaitan linier dengan variabel Y dan kelompok yang tidak berkaitan dengan variabel Y (tegak lurus/orthogonal) (Vajargah *et al.*, 2014). Pada penelitian ini, dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan dua metode uji yang berbeda, yaitu ABTS dan CUPRAC, sehingga diperoleh dua set data variabel respon yang berbeda. Masing-masing set data aktivitas antioksidan dianalisis korelasinya dengan profil kimia fraksi sampel kopi menggunakan metode OPLS.

Model OPLS yang dihasilkan pada penelitian ini berhasil mereduksi dimensi data menjadi satu komponen prediktif dan dua komponen orthogonal (1+2+0). Korelasi profil kimia fraksi dengan aktivitas antioksidan yang terukur dengan metode ABTS dan metode CUPRAC dapat menghasilkan model OPLS dengan nilai R^2X (cum), R^2Y (cum), dan Q^2 (cum) yang tinggi, di atas 0,9, ini menjelaskan bahwa model OPLS yang dihasilkan memiliki kredibilitas yang baik. Validasi model dengan CV-ANOVA dan uji permutasi dengan 50 permutasi juga menunjukkan performa yang baik (Gambar 5C dan D). Hal ini dapat dilihat dari nilai p yang sangat jauh lebih kecil dari nilai maksimum yang diterima ($p < 0,05$), dan plot permutasi yang dihasilkan, yaitu nilai R^2 dan Q^2 dari model asli selalu lebih tinggi dari pada semua model hasil permutasi (Eriksson *et al.*, 2013). *Score plot* OPLS (Gambar 5A dan B) menunjukkan adanya klasifikasi yang cukup jelas antara fraksi kopi dengan aktivitas antioksidan yang tinggi, sedang, dan rendah baik pada metode ABTS maupun metode CUPRAC. Karakterisasi data gugus fungsi yang berkontribusi kepada aktivitas antioksidan dari fraksi kopi dapat diidentifikasi dengan beberapa cara, antara lain adalah dengan menggunakan nilai *Y-related profile* dan nilai VIP.

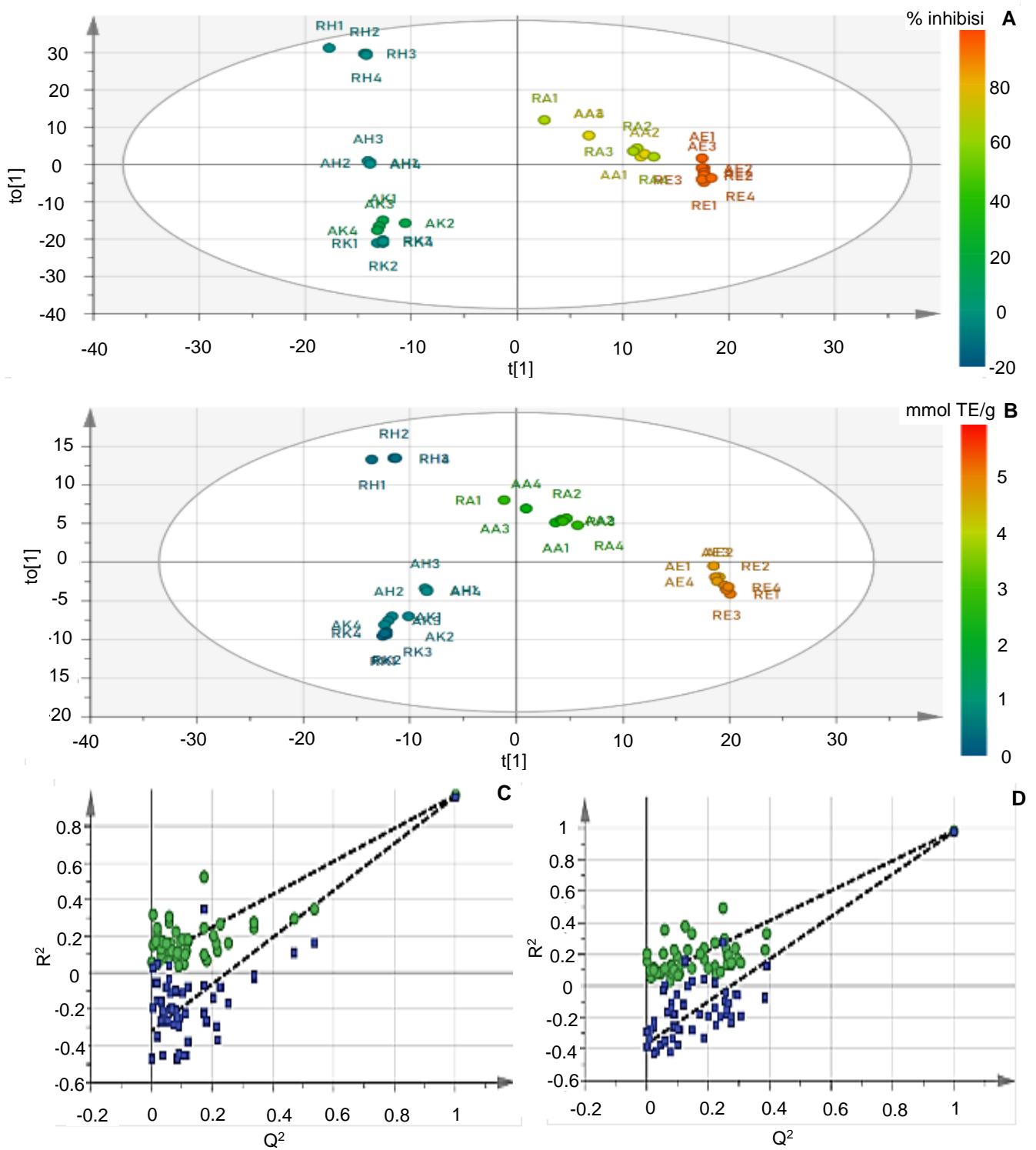


Keterangan: A pada huruf pertama = arabika, R pada huruf pertama = robusta, H, K, E, dan A pada huruf kedua menunjukkan perbedaan pelarut fraksi, H = n-heksana, K = kloroform, E = etil asetat, A = air, 1 2 3 4 = ulangan fraksinasi; PC1 = 80,3%; PC2 = 9,5%

Note: A in the first letter = arabica, R in the first letter = robusta, H, K, E, dan A in the second letter indicate different solvent fraction, H = n-hexane, K = chloroform, E = ethyl acetate, A = water, 1 2 3 4 = fractionation repetition; PC1 = 80,3%; PC2 = 9,5%

Gambar 4. *Score plot* dari PCA data spektra FTIR-ATR berdasarkan varietas sampel kopi (A) dan pelarut fraksi (B)

Figure 4. *PCA Score plot* of FTIR-ATR data spectra based on coffee sample varieties (A) and fractional solvent (B)



Keterangan: A pada huruf pertama = arabika, R pada huruf pertama = robusta, H, K, E, dan A pada huruf kedua menunjukkan perbedaan pelarut fraksi, H = n-heksana, K = kloroform, E = etil asetat, A = air, 1 2 3 4 = ulangan fraksinasi
 Note: A in the first letter = arabica, R in the first letter = robusta, H, K, E, dan A in the second letter indicate different solvent fraction, H = n-hexane, K = chloroform, E = ethyl acetate, A = water, 1 2 3 4 = fractionation repetition

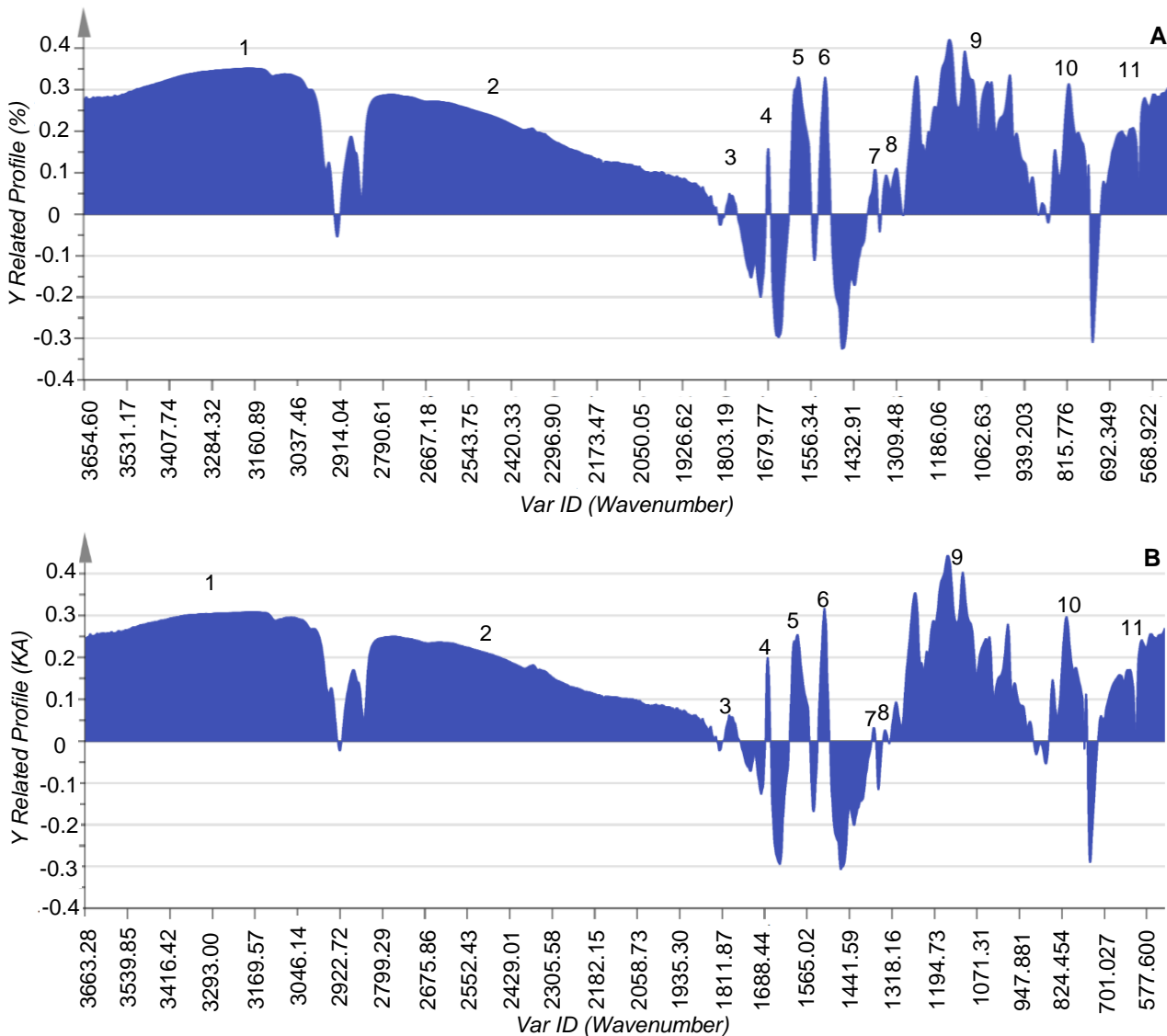
Gambar 5. Score plot OPLS x ABTS (A), score plot OPLS x CUPRAC (B), serta validasi model OPLS untuk metode uji aktivitas antioksidan ABTS (C), dan CUPRAC (B)

Figure 5. OPLS x ABTS OPLS score plot (A), OPLS x CUPRAC OPLS score plot (B), and OPLS model validation of ABTS assay (A), and CUPRAC assay (B)

Plot *Y-related profile* baik yang dihasilkan dari ABTS maupun metode CUPRAC (Gambar 6) memiliki profil yang relatif sama, terdapat 11 daerah puncak bilangan gelombang yang memiliki korelasi positif terhadap aktivitas antioksidan (nilai *Y-related profile* positif). Daerah puncak bilangan gelombang tersebut kemudian diidentifikasi berdasarkan nilai VIP untuk menganalisis relevansinya dengan aktivitas antioksidan. Nilai VIP merupakan parameter yang dapat menjelaskan seberapa penting (relevan) variabel X dalam model OPLS, semakin besar nilai VIP maka variabel akan semakin relevan. Pada umumnya, variabel dengan nilai VIP yang kurang dari 0,5 sudah dianggap tidak relevan dengan model (Galindo-Prieto *et al.*, 2014). Daerah puncak bilangan gelombang yang berkorelasi positif dengan aktivitas antioksidan (daerah nomor 1, 5, 6, 9, 10, dan 11) pada plot *Y-related profile*, dikarakterisasi lebih lanjut karena

terdapat sinyal data gugus fungsi penting sebagai penanda senyawa antioksidan. Hasil karakterisasi data gugus fungsi disajikan pada Tabel 1.

Variabel paling relevan dengan aktivitas antioksidan pada metode ABTS dan metode CUPRAC berdasarkan nilai VIP terdapat di daerah puncak bilangan gelombang nomor 9 pada plot *Y-related profile*, yaitu pada bilangan gelombang 1176-1106 cm^{-1} dan 1270-1240 cm^{-1} dengan kisaran nilai VIP masing masing 1,46-1,72 dan 0,89-1,42. Daerah tersebut merupakan serapan dari vibrasi ulur ikatan C-OH yang diturunkan dari sikloheksana C-H (Liang *et al.*, 2016a). Gugus fungsi tersebut banyak ditemukan pada isomer senyawa asam klorogenat yang merupakan senyawa fenolik utama dalam kopi dan sangat berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan kopi (Herawati *et al.*, 2019b).



Gambar 6. Plot *Y-related profile* dengan metode ABTS (A) dan metode CUPRAC (B)
Figure 6. *Y-related profile* plot ABTS assay (A) and CUPRAC assay (B)

Sejalan dengan penelitian ini, gugus fungsi sikloheksana memiliki korelasi positif dan relevansi yang sangat tinggi terhadap aktivitas antioksidan kopi. Gugus fungsi sikloheksana juga terdeteksi berkorelasi positif dengan relevansi tinggi pada daerah puncak 10, yaitu pada daerah bilangan gelombang 804-817 cm^{-1} . Variabel lain yang memiliki nilai VIP tinggi ada pada daerah nomor 1 dari plot *Y-related profile*, yaitu daerah 3660-2970 cm^{-1} dengan kisaran nilai VIP 1,16-1,46. Ini merupakan daerah khas dari gugus fungsi OH yang berkaitan erat dengan senyawa fenolik dalam kopi (Abreu *et al.*, 2020).

Daerah 2925-2908 cm^{-1} juga merupakan variabel yang penting dengan kisaran nilai VIP 0,91-1,01, bilangan gelombang tersebut berkaitan dengan gugus fungsi C=O serta gugus vibrasi ulur asimetris dan simetris C-H dari CH_2 alifatik pada asam lemak (Raba *et al.*, 2015; Sahachairungrueng *et al.*, 2022). Lipid pada kopi terdiri dari trigliserida, sterol, asam lemak dan senyawa diterpen pentasiklik *cafestol* dan *kahweol* yang memiliki sifat antioksidan (Ludwig *et al.*, 2014). Bilangan gelombang 1665-1635 cm^{-1} (gugus karbonil amida) dan 1606-1580 cm^{-1} (gugus fungsi C=C pada cincin fenil) merupakan puncak serapan gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa antioksidan *trigonelline* dan asam klorogenat (Liang *et al.*, 2016a; Belchior *et al.*, 2022). Gugus fungsi lain yang teridentifikasi memiliki nilai VIP yang tinggi dan berkorelasi positif terhadap antioksidan adalah gugus fungsi amino (N-C-CO), C-H pada cincin fenil, R-OH, dan C-H pada senyawa aromatik dan hidrokarbon tak jenuh.

Plot OPLS X-Var (Gambar 7) menunjukkan bahwa sebagian besar puncak bilangan gelombang yang memiliki relevansi tinggi jumlahnya melimpah pada fraksi dengan aktivitas antioksidan yang tinggi, yaitu fraksi etil asetat dan fraksi air, baik pada kopi robusta

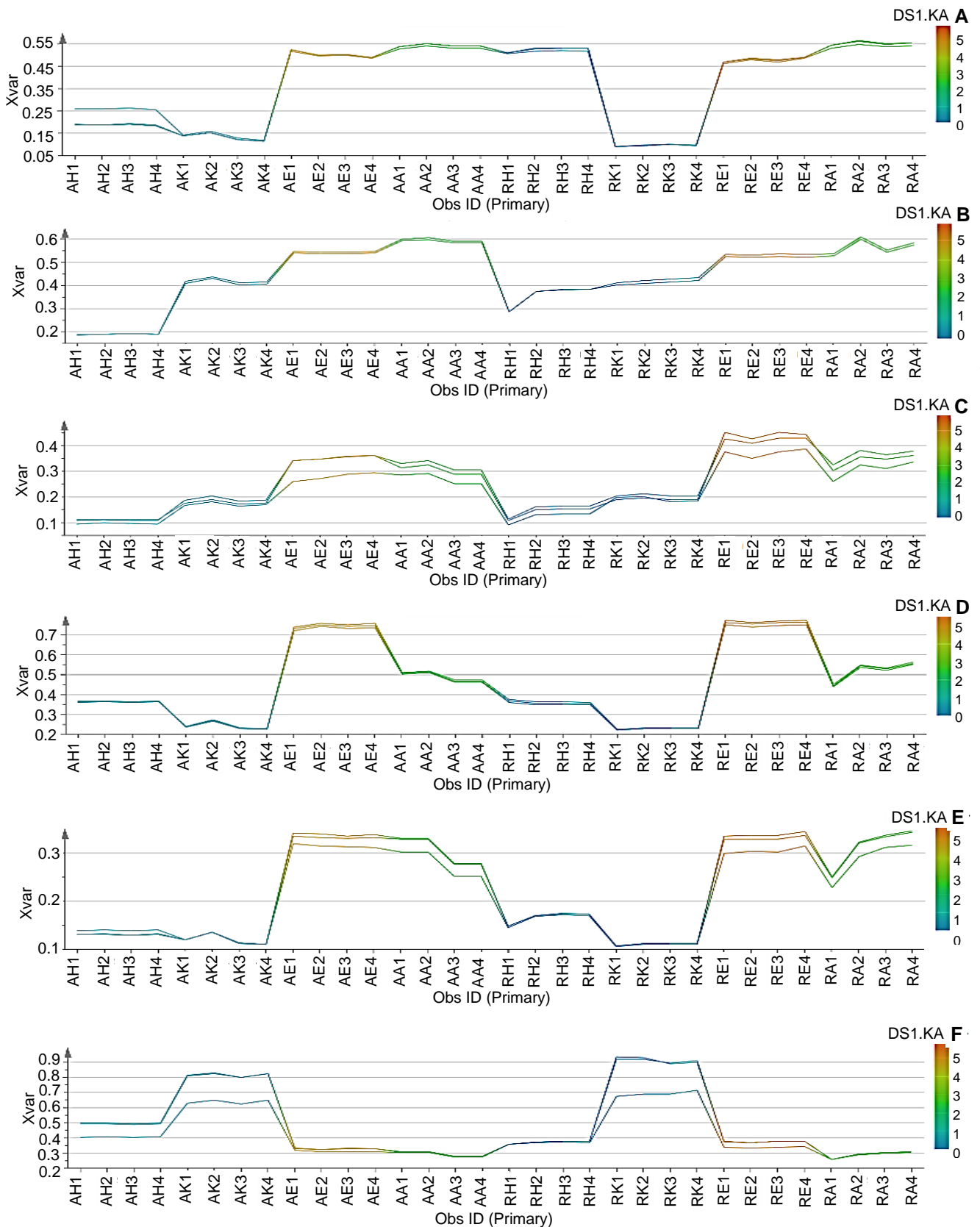
maupun arabika. Puncak bilangan gelombang dengan nilai relevansi tertinggi, yaitu pada daerah bilangan gelombang sekitar 1176-1106 cm^{-1} ditemukan sangat melimpah pada fraksi etil asetat sampel kopi robusta dan arabika (Gambar 7D). Pada puncak bilangan gelombang daerah 3660-2970 cm^{-1} , ditemukan adanya perbedaan kelimpahan pada fraksi n-heksana dari sampel kopi robusta dan arabika, puncak ini ditemukan melimpah pada fraksi n-heksana dari sampel kopi robusta, tetapi tidak pada sampel kopi arabika. Kelimpahan puncak bilangan gelombang ini juga ditemukan cukup tinggi pada fraksi etil asetat dan fraksi air sampel kopi robusta dan arabika (Gambar 7A).

Puncak bilangan gelombang 745-735 cm^{-1} memiliki pola sebaran kelimpahan yang berbeda dengan puncak bilangan gelombang lainnya. Sebagian besar puncak bilangan gelombang yang relevan terhadap aktivitas antioksidan ditemukan melimpah pada fraksi etil asetat dan fraksi air, namun puncak bilangan gelombang 745-735 cm^{-1} banyak terdapat pada fraksi kloroform sampel kopi robusta dan arabika (Gambar 7F). Hal ini mengindikasikan gugus fungsi senyawa aromatik dan alkena terdistribusi melimpah pada fraksi kloroform sampel kopi robusta dan arabika.

Dari identifikasi profil kimia dan aktivitas antioksidan fraksi kopi ini, dapat diperoleh informasi penting yang bermanfaat untuk optimasi pemanfaatan potensi antioksidan kopi. Pelarut etil asetat berhasil diidentifikasi memiliki kemampuan yang baik dan sangat efisien dalam mengekstrak senyawa antioksidan dari kopi dibandingkan dengan 3 pelarut lainnya. Hasil identifikasi jenis pelarut dan gugus fungsi senyawa relevan yang berkorelasi positif terhadap aktivitas antioksidan ini dapat dijadikan acuan untuk menghasilkan ekstrak kopi kaya antioksidan yang dapat dimanfaatkan di bidang kesehatan

Tabel 1. Karakterisasi data gugus fungsi relevan yang berkorelasi positif dengan aktivitas antioksidan
 Table 1. Characterization of relevant functional groups which are positively correlated with antioxidant activity

Daerah (Area)	Bilangan Gelombang (Wavenumbers) (cm^{-1})	Nilai VIP (VIP Value)		Gugus Fungsi (Functional Groups)	Contoh Senyawa (Example Compound)	Referensi (Reference)
		ABTS	CUPRAC			
1	3660-2970	1.16-1.46	1.17-1.45	OH (phenol, alcohol, carboxylic acid) C=O dan C-H	Phenolic compound Lipid	(Abreu <i>et al.</i> , 2020) (Sahachairungrueng <i>et al.</i> , 2022)
	2925-2908	0.91-1.01	0.91-0.97			
5	1665-1635	0.80-1.27	0.83-1.32	O=C-N (amide carbonyl) C=C phenyl ring	Alkaloid, trigonelline Chlorogenic acid	(Belchior <i>et al.</i> , 2022) (Liang <i>et al.</i> , 2016a)
	1606-1580	1.03-1.25	1.00-1.11			
6	1522-1507	0.94-1.17	0.94-1.21	N-C-CO (amino group)	Amino acid	(Wang dan Lim, 2012)
9	1270-1240	0.89-1.30	0.94-1.42	C-H phenyl ring	Chlorogenic acid	(Liang <i>et al.</i> , 2016a; Abreu <i>et al.</i> , 2020)
	1176-1106	1.46-1.53	1.46-1.72	C-OH cyclohexane		
	1064-1029	1.01-1.24	0.96-1.17	R-OH		
10	804-817	1.02-1.13	1.06-1.17	C-O cyclohexane	Chlorogenic acid	(Liang <i>et al.</i> , 2016a)
11	745-735	0.97-0.99	1.29-1.32	C-H (aromatic and alkene)	Unsaturated hydrocarbons	(Saragih <i>et al.</i> , 2021)



Gambar 7. Plot OPLS X-Var gugus fungsi relevan yang berkorelasi positif dengan aktivitas antioksidan
Figure 7. OPLS X-Var plot of relevant functional groups which are positively correlated with antioxidant activity

Selain itu, informasi gugus fungsi relevan yang berkorelasi positif pada aktivitas antioksidan kopi ini dapat dijadikan sebagai gugus fungsi *marker* untuk *process quality control* kandungan antioksidan kopi, mengingat instrumen FTIR-ATR merupakan instrumen dengan metode penyiapan sampel analisis yang sederhana, tidak merusak sampel, cepat, ekonomis dan beresolusi tinggi (Beasley *et al.*, 2014; Sulistyani dan Huda, 2018).

KESIMPULAN

Fraksi kopi robusta dan kopi arabika yang dihasilkan pada proses fraksinasi ekstrak metanolik memiliki profil kimia *fingerprinting* FTIR-ATR yang berbeda pada masing-masing pelarut fraksi. Hal ini menandakan ada pengaruh perbedaan polaritas pelarut terhadap profil *fingerprinting* senyawa kimia dari fraksi kopi. Dari keempat pelarut fraksi yang digunakan, baik pada sampel kopi robusta maupun kopi arabika, aktivitas antioksidan tertinggi ditemukan pada fraksi etil asetat dengan nilai rata-rata % inhibisi (dengan metode ABTS) sebesar 93,60% untuk kopi robusta dan 94,80% untuk kopi arabika serta kapasitas antioksidan (dengan metode CUPRAC) sebesar 5,85 mmol TE/g untuk kopi robusta dan 5,57 mmol TE/g untuk kopi arabika. Fraksi dengan antioksidan tertinggi kedua adalah fraksi air dengan nilai rata-rata %inhibisi (ABTS) sebesar 63,61% untuk kopi robusta dan 72,80% untuk kopi arabika serta kapasitas antioksidan (CUPRAC) sebesar 3,28 mmol TE/g untuk kopi robusta dan 2,74 mmol TE/g untuk kopi arabika. Kandungan senyawa yang cenderung polar memiliki pengaruh yang lebih kuat terhadap potensi aktivitas antioksidan dari sampel kopi robusta dan arabika. Berdasarkan karakterisasi data gugus fungsi berdasarkan plot *Y-related profile* dan nilai VIP, diperoleh gugus fungsi senyawa yang relevan dan berkorelasi positif terhadap aktivitas antioksidan kopi, yaitu gugus fenol, karbonil, amida, fenil, amino, aromatik, sikloheksana dan alkena. Berdasarkan plot OPLS X-Var, gugus fungsi relevan terdistribusi sangat melimpah pada fraksi etil asetat yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi. Terdapat perbedaan profil sebaran gugus fungsi pada fraksi n-heksana dari sampel kopi robusta dan arabika.

DAFTAR PUSTAKA

Abreu MB, Marcheafave GG, Bruns RE, Scarmínio IS, Zeraik ML. 2020. Spectroscopic and chromatographic fingerprints for discrimination of specialty and traditional coffees by integrated chemometric methods. *Food Anal Methods* 13: 2204–2212. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01832-1>

Abubakar AR, Haque M. 2020. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *J Pharm Bioallied Sci* 12: 1-10. <https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS.175.19>

Adetunji OA, Coker-Osiwoga TF, Okwuanalu C, Adetayo MO, Adetunji OC, Ogunbiyi BT, Amah GH, Adetunji OA. 2021. Comparative study of phytochemical constituents, caffeine levels and proximate composition of liven alkaline coffee, nescafe original coffee and nescafe original decaffeinated coffee. *EAS J Nutr Food Sci* 3: 94-99.

Anh-Dao LT, Nhon-Duc L, Cong-Hau N, Thanh-Nho N. 2022. Variability of total polyphenol contents in ground coffee products and their antioxidant capacities through different reaction mechanisms. *Biointerface Res Appl Chem* 12: 4857-4870. <https://doi.org/10.33263/BRIAC124.48574870>

Anwar F, Qayyum HMA, Hussain AI, Iqbal S. 2010. Antioxidant activity of 100% and 80% methanol extracts from barley seeds (*Hordeum vulgare* L.): Stabilization of sunflower oil. *Grasas y Aceites* 61: 237-243. <https://doi.org/10.3989/gya.087409>

[AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2012. Official methods of analysis of the AOAC international 19th edition Method 979.12. Association of Official Analytical Chemist.

Bastian F, Hutabarat OS, Dirpan A, Nainu F, Harapan H, Emran TB, Simal-Gandara J. 2021. From plantation to cup: changes in bioactive compounds during coffee processing. *Foods* 10: 2827. <https://doi.org/10.3390/foods10112827>

Beasley MM, Bartelink EJ, Taylor L, Miller RM. 2014. Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: Implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. *J Archaeol Sci* 46: 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.03.008>

Belchior V, Botelho BG, Franca AS. 2022. Comparison of spectroscopy-based methods and chemometrics to confirm classification of specialty coffees. *Foods* 11: 1655. <https://doi.org/10.3390/foods11111655>

Bicho NC, Leitão AE, Ramalho JC, Lidon FC. 2012. Use of colour parameters for roasted coffee assessment. *Ciênc Tecnol Aliment Campinas* 32: 436-442. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.12.001>

Blasco H, Błaszczczyński J, Billaut J-C, Nadal-Desbarats L, Pradat P-F, Devos D, Moreau C, Andres CR, Emond P, Corcia P, Słowiński R. 2015. Comparative analysis of targeted metabolomics: Dominance-based rough set approach versus orthogonal partial least square-discrimi-

- nant analysis. *J Biomed Inform* 53: 291-299. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.12.001>
- Cano-Marquina A, Tarín JJ, Cano A. 2013. The impact of coffee on health. *Maturitas* 75: 7–21. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.02.002>
- Craig AP, Botelho BG, Oliveira LS, Franca AS. 2017. Mid infrared spectroscopy and chemometrics as tools for the classification of roasted coffees by cup quality. *Food Chem* 245: 1052-1061. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.066>
- Craig AP, Franca AS, Oliveira LS, Irudayaraj J, Ileleji K. 2015. Fourier transform infrared spectroscopy and near infrared spectroscopy for the quantification of defects in roasted coffees. *Talanta* 134: 379-386. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.038>
- Derossi A, Ricci I, Caporizzi R, Fiore A, Severini C. 2018. How grinding level and brewing method (espresso, american, turkish) could affect the antioxidant activity and bioactive compounds in a coffee cup. *J Sci Food Agric* 98: 3198-3207. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8826>
- Eriksson L, Byrne T, Johansson E, Trygg J, Vikstrom C. 2013. *Multi-and Megavariate Data Analysis Basic Principle and Applications*. 3rd edition. 419-424. Stockholm: Umetrics Academy Publisher.
- Galindo-Prieto B, Eriksson L, Trygg J. 2014. Variable influence on projection (VIP) for orthogonal projections to latent structures (OPLS). *J Chemom* 28: 623-632. <https://doi.org/10.1002/cem.2627>
- Gonçalves D, Teschke MEE, Koshima CC, Gonçalves CB, Oliveira AL, Rodrigues CEC. 2015. Fractionation of orange essential oil using liquid-liquid extraction: Equilibrium data for model and real systems at 298.2 K. *Fluid Phase Equilib* 399: 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2015.04.022>
- Hameed A, Hussain SA, Ijaz MU, Ullah S, Pasha I, Suleria HAR. 2018. Farm to consumer: Factors affecting the organoleptic characteristics of coffee. II: Postharvest processing factors. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 17: 1184-1237. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12365>
- Herawati D, Giriwono PE, Dewi FNA, Kashiwagi T, Andarwulan N. 2019a. Critical roasting level determines bioactive content and antioxidant activity of Robusta coffee beans. *Food Sci Biotechnol* 28: 7-14. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1622562>
- Herawati D, Giriwono PE, Dewi FNA, Kashiwagi T, Andarwulan N. 2019b. Three major compounds showing significant antioxidative, α -glucosidase inhibition, and antiglycation activities in Robusta coffee brew. *Int J Food Prop* 22: 994-1010. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1622562>
- Kurniawan MF, Andarwulan N, Wulandari N, Rafi M. 2017. Metabolomic approach for understanding phenolic compounds and melanoidin roles on antioxidant activity of Indonesia robusta and arabica coffee extracts. *Food Sci Biotechnol* 26: 1475-1480. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0228-6>
- Liang N, Lu X, Hu Y, Kitts DD. 2016a. Application of attenuated total reflectance-fourier transformed infrared (ATR-FTIR) spectroscopy to determine chlorogenic acid isomer profile and antioxidant capacity of coffee beans antioxidant capacity of coffee beans. *J Agric Food Chem* 64: 681-689. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05682>
- Liang N, Xue W, Kennepohl P, Kitts DD. 2016b. Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. *Food Chem* 213: 251-259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.041>
- Link JV, Lemes ALG, Marquetti I, dos Santos Scholz MB, Bona E. 2014. Geographical and genotypic classification of arabica coffee using fourier transform infrared spectroscopy and radial-basis function networks. *Chemom Intell Lab Syst* 135: 150-156. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.04.008>
- Long FH. 2013. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery: Multivariate analysis for metabolomics and proteomics data*. 2nd edition. 395-407. Elsevier Inc, United States. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818607-7.0023-2>
- Loyao AS, Villasica SLG, Dela Peña PLL, Go AW. 2018. Extraction of lipids from spent coffee grounds with non-polar renewable solvents as alternative. *Ind Crops Prod* 119: 152-161. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.017>
- Ludwig IA, Clifford MN, Lean MEJ, Ashihara H, Crozier A. 2014. Coffee: Biochemistry and potential impact on health. *Food Funct* 5: 1695-1717. <https://doi.org/10.1039/C4FO00042K>
- Michail A, Sigala P, Grigorakis S, Makris DP. 2016. Kinetics of ultrasound-assisted polyphenol extraction from spent filter coffee using aqueous glycerol. *Chem Eng Commun* 203: 407-413. <https://doi.org/10.1080/00986445.2015.1004667>
- Munyendo L, Njoroge D, Hitzmann B. 2022. The potential of spectroscopic techniques in coffee analysis—A Review. *Processes* 10: 71. <https://doi.org/10.3390/pr10010071>

- Nawrocka A, Lamorska J. 2013. Determination of Food Quality by Using Spectroscopic Methods. *Advance in Agrophysical Research*. 347-362 IntechOpen, London. <https://doi.org/10.5772/52722>
- Niwagaba J, KipkoechSitienei W. 2019. Effect of moisture content on the physical properties of coffee beans (robusta). *IOSR J Agric Vet Sci* 12: 1-13.
- Osipova V, Polovinkina M, Gracheva Y, Shpakovsky D, Osipova A, Berberova N. 2021. Antioxidant activity of some organosulfur compounds *in vitro*. *Arab J Chem* 14: 103068. <https://doi.org/10.1016/j.arabic.2021.103068>
- Özyürek M, Güçlü K, Apak R. 2011. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC-Trends Anal Chem* 30: 652-664. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.016>
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *J Nutr* 133: 2812-2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>
- Pokorná J, Venskutonis PR, Kraujalyte V, Kraujalis P, Dvorák P, Tremlová B, Kopriva V, Oštádalová M. 2015. Comparison of different methods of antioxidant activity evaluation of green and roast *C. Arabica* and *C. Robusta* coffee beans. *Acta Aliment* 44: 454-460. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>
- Putri SP, Irifune T, Yusianto, Fukusaki E. 2019. GC/MS based metabolite profiling of Indonesian specialty coffee from different species and geographical origin. *Metabolomics* 15: 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1591-5>
- Raba DN, Poiana M-A, Borozan AB, Stef M, Radu F, Popa MV. 2015. Investigation on crude and high-temperature heated coffee oil by ATR-FTIR spectroscopy along with antioxidant and antimicrobial properties. *PLoS One* 10: 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138080>
- Rodriguez YFB, Guzman NG, Hernandez JG. 2020. Effect of the postharvest processing method on the biochemical composition and sensory analysis of arabica coffee. *Eng Agric* 40: 177-183. <https://doi.org/10.1590/1809-4430-eng.agric.v40n2p177-183/2020>
- Sahachairungrueng W, Meechan C, Veerachat N, Thompson AK, Teerachaichayut S. 2022. Assessing the levels of robusta and arabica in roasted ground coffee using NIR hyperspectral imaging and FTIR spectroscopy. *Foods* 11: 1-13. <https://doi.org/10.3390/foods11193122>
- Saragih B, Rahmawati M, Ismanto A, Saragih FM. 2021. Profile of FTIR (Fourier Transform Infra Red) and comparison of antioxidant activity of coffee with tiwai (*Eleutherine americana* merr). *Pap 6th Int Conf Food, Agric Nat Resour*. 16: 27-31. <https://doi.org/10.2991/absr.k.220101.005>
- Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY. 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 8: 93-130. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56936-4_2
- Sharifi B, Goli SAH, Maghsoudlou Y. 2017. Antioxidant activity and chemical composition of the methanolic extract and related fractions of *Dracocephalum kotschyi* leaves using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Ind Crops Prod* 104: 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.030>
- Song JL, Asare TS, Kang MY, Lee SC. 2018. Changes in bioactive compounds and antioxidant capacity of coffee under different roasting conditions. *Korean J Plant Resour* 31: 704-713.
- Souard F, Delporte C, Stoffelen P, Thévenot EA, Noret N, Dauvergne B, Kauffmann JM, Van Antwerpen P, Stévigny C. 2019. Metabolomics fingerprint of coffee species determined by untargeted-profiling study using LC-HRMS. *Food Chem* 245: 603-612. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.022>
- Sulistiyani M, Huda N. 2018. Perbandingan metode transmisi dan reflektansi pada pengukuran polistirena menggunakan instrumentasi spektroskopi fourier transform infrared. *Indo J Chem Sci* 7: 195-198.
- Sunarharum WB, Farhan M. 2020. Effect of manual brewing techniques on the sensory profiles of arabica coffees (aceh gayo wine process and bali kintamani honey process). *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 454: 012099. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/454/1/012099>
- Teboukeu GB, Djikeng FT, Klang MJ, Karuna MSL, Womeni HM. 2018. Optimization of the extraction of natural antioxidants from *Coffea robusta* leaves and evaluation of their ability to preserve palm olein from oxidation during accelerated storage. *Food Sci Nutr* 6: 1751-1761. <https://doi.org/10.1002/fsn3.702>
- Truong DH, Nguyen DH, Ta NTA, Bui AV, Do TH, Nguyen HC. 2019. Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and *in vitro* anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *J Food Qual* 2019: 8178294. <https://doi.org/10.1155/2019/8178294>

- Vajargah KF, Mehdizadeh R, Sadeghi-Bazargani H. 2014. Applications of OPLS statistical method in medicine. *J Math Comput Sci* 8: 411-422. <https://doi.org/10.22436/jmcs.08.04.09>
- Vignoli JA, Viegas MC, Bassoli DG, de Toledo Benassi M. 2014. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *Food Res Int* 61: 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.006>
- Wang N, Lim L-T. 2012. Fourier transform infrared and physicochemical analyses of roasted coffee. *J Agric Food Chem* 60: 5446-5453. <https://doi.org/10.1021/jf300348e>
- Wonorahardjo S, Yuniawati N, Molo ADP, Rusdi HO, Purnomo H. 2019. Different Chemical Compound Profiles of Indonesian Coffee Beans as Studied Chromatography/Mass Spectrometry. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 276: 012065. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/276/1/012065>
- Worley B, Powers R. 2013. Multivariate analysis in metabolomics. *Curr Metabolomics* 1: 92-107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092>
- Worley B, Powers R. 2016. PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. *Curr Metabolomics* 4: 97-103. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092>
- Yashin A, Yashin Y, Xia X, Nemzer B. 2017. Antioxidant activity of spices and their impact on human health: A review. *Antioxidants* 6: 70. <https://doi.org/10.3390/antiox6030070>
- Yuliana ND, Arifin AS, Rafi M. 2020. Multiple spectroscopic fingerprinting platforms for rapid characterization of α -glucosidase inhibitors and antioxidants from some commonly consumed Indonesian vegetables and spices. *J Food Meas Charact* 14: 1699-1707. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00418-z>
- Yulianti Y, Andarwulan N, Adawiyah DR, Herawati D, Indrasti D. 2022. Physicochemical characteristics and bioactive compound profiles of Arabica Kalosi Enrekang with different postharvest processing. *Food Sci Technol Campinas* 42: 1-10. <https://doi.org/10.1590/fst.67622>
- Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Med* 13: 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>