

AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 PENYEBAB INFEKSI NOSOKOMIAL

Putu Ayu Melati Widyasari¹, IGM Aman², Agung Nova Mahendra²

¹Program Studi Sarjana Kedokteran dan Profesi Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana

²Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana

Koresponding : Putu Ayu Melati Widyasari

Email:melatiwidyasari1@gmail.com

Abstrak

Infeksi nosokomial merupakan infeksi yang terjadi dikarenakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang menyerang persendian dan pembuluh darah serta timbulnya pembengkakan atau abses, infeksi terlokalisasi pada kulit, saluran kemih, dan organ ginjal. Terdapat penelitian mengenai bakteri *Staphylococcus epidermidis* resisten terhadap antibiotika yaitu karbanesilin, sefuroksim, metronidazol dan sulfametoksazol/trimetasprim. Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki senyawa dengan efek antibakteri dan antioksidan yaitu kafein, asam klorogenat dan flavanoid. Tujuan penelitian ini yaitu untuk membuktikan biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang telah diekstrak dengan etanol dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro* dengan desain penelitian *true experimental post test only control group design*. Sampel dikelompok menjadi 5, yakni kelompok kontrol positif, kontrol negatif serta kelompok perlakuan dengan konsentrasi 10%, 50%, dan 100%. Dari penelitian diketahui bahwa ekstrak etanol dari biji kopi robusta (*Coffea canephora*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 pada konsentrasi 50% dan 100% dengan rerata diameter zona hambat 6,8 mm sampai 9 mm. Sehingga disimpulkan bahwa ekstrak etanol dari biji kopi robusta menghambat pertumbuhan bakteri ini namun daya hambatnya lebih rendah dibandingkan kontrol positif.

Kata Kunci: Kopi Robusta, infeksi nosokomial, *Staphylococcus epidermidis*

Abstract

Nosocomial infection is an infection caused by the bacterium *Staphylococcus epidermidis* which attacks joints and blood vessels and can cause swelling or abscesses such as zits, skin infections, urinary tract infections, and kidney infections. There is a study of 100% *Staphylococcus epidermidis* bacteria against carbanesilin, cefuroxime, metronidazole and sulfamethoxazole / trimetasprim. Robusta coffee extract (*Coffea canephora*) has compounds with antibacterial and antioxidant effects, namely caffeine, chlorogenic acid and flavonoids. The purposes of the study was to prove the ethanol extract from beans of Robusta coffee (*Coffea canephora*) can inhibit the growth of *Staphylococcus epidermidis* bacteria. This study was a laboratory experimental study *in vitro* using the true experimental method posttest only control group design. The sample was divided into 5 groups namely positive control group, negative control and treatment group with concentrations of 10%, 50%, and 100%. From the research it was known that the ethanol extract of robusta coffee beans (*Coffea canephora*) was able to inhibit the growth of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 at concentrations of 50% and 100% with the average diameter of inhibition zones of 6.8 mm to 9 mm. The conclusion was the ethanol extract of robusta coffee beans can inhibit the growth of this bacterium but its inhibitory power was lower than positive control.

Keywords: Robusta coffee, nosocomial infection, *Staphylococcus epidermidis*

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi saat ini menjadi kasus dengan urutan teratas dibandingkan dengan kasus non-infeksi sebagai penyebab kematian khususnya di Indonesia. Penurunan kinerja dan produktivitas pun juga disebabkan oleh kasus penyakit infeksi. Infeksi nosokomial yaitu infeksi yang didapatkan di rumah sakit. Infeksi ini tak hanya menjangkit penderita yang sedang di rawat di rumah sakit, para petugas RS, keluarga penderita, serta pengunjung rumah sakit. Infeksi ini terjadi di seluruh dunia dengan termasuk kasus terbanyak dinegara miskin dan negara berkembang. Infeksi nosokomial yang paling umum terjadi yaitu infeksi luka operasi (ILO).¹ Infeksi nosokomial adalah jenis infeksi yang paling sering terjadi yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

Staphylococcus epidermidis adalah anggota kelompok *staphylococci* koagulase negatif yang paling sering terisolasi. Kelompok ini secara diagnostik dibedakan dari *Staphylococcus aureus* karena ketidakmampuannya untuk dihasilkannya koagulase. Bersamaan dengan *staphylococci* koagulase yang lebih jarang ditemukan, bakteri *Staphylococcus epidermidis* berkolonisasi di kulit serta selaput lendir tubuh manusia dan merupakan bagian utama dari flora normal.² Berbagai zat dari bahan herbal yang telah diteliti oleh berbagai penelitian yang berpotensi atau dapat mengeradikasi beberapa jenis bakteri yang sudah resisten terhadap beberapa antibiotik. Maka dari itu, diperlukannya inovasi dari bahan herbal untuk pengobatan alternatif dari bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Kopi yaitu salah satu jenis tanaman perkebunan yang sudah dibudidayakan. Kopi memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Di Indonesia, spesies kopi yang sudah dikembangkan diantaranya kopi arabika, robusta, toraja, toraja kalosi dan kopi luwak. Sejatinnya, peminat kopi robusta sangat tinggi hingga menguasai pasar Nasional. Berbagai macam kopi yang paling banyak dibudidayakan di Indonesia yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*), kopi liberika (*Coffea liberica*) dan kopi robusta (*Coffea robusta*).³

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol dari biji kopi robusta (*Coffea canephora*) pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 pada konsentrasi 10%, 50% dan 100%.

BAHAN DAN METODE

Alat-alat yang dibutuhkan: inkubator, ose, lampu spritus 500 ml, labu Erlenmeyer, autoclave. batang pengaduk, micro pipet, jangka sorong, korek api, kaca preparat, pinset/ penjepit dan water bath. Bahan yang dibutuhkan: Agar *Mueller-Hinton* (MH), ekstrak biji kopi robusta, bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *vancomycin* 20 µg, lugol,

safranin, kristal violet, lidi kapas steril, minyak emersi, akuades, alkohol 95%, larutan McFarland 0,5, swab kapas steril, *blank disc*, etanol 96%, dan cawan petri.

Pengambilan dan perlakuan sampel dimulai dari biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang dipanen dari perkebunan kopi di Banjar Yeh Kayu, Desa Mundeh, Kecamatan Selemadeg Barat, Kabupaten Tabanan masing-masing sebanyak 3 kg. Biji kopi yang digunakan yaitu biji kopi yang sudah matang di pohon dan berwarna merah, kemudian biji kopi robusta dicuci dan dilakukan sortasi untuk memisahkan biji superior dan inferior sebagai penanda kualitas kopi.⁹ Selanjutnya biji kopi dijemur dibawah sinar matahari langsung selama 2 minggu sampai kadar air dalam biji kopi dapat tercapai 15 %. Biji kopi yang sudah kering dikupas dengan mesin *huller*. Setelah biji kopi robusta sudah dikupas, dilakukan sortasi untuk memilah residu dari kulit buah, kulit tanduk biji pecah serta kotoran lainnya. Biji kopi robusta yang sudah siap digunakan kemudian digiling untuk didapatkan bubuk simplisias kopi.

Proses pembuatan ekstrak etanol dari biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dikerjakan dengan metode maserasi. Pada labu enlenmeyer, dimasukkan 120 g serbuk simplisias biji kopi robusta yang kemudian akan disatukan dengan larutan etanol 95% sejumlah 225 mL, selanjutnya difiksasi dengan tutup dari aluminium foil dan disimpan selama 5 hari. Setelah itu dilanjutkan dengan proses disaring menggunakan kertas saring secukupnya dan akan didapatkan hasil, filtrat 1 dan ampas 1. Ampas ini kemudian dimaserasi dengan 75mL larutan etanol 96%, kemudian ditutup kembali menggunakan aluminium foil steril dan didiamkan selama 2 hari sambil sesekali diaduk. Tahap selanjutnya, sampel ini kembali disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 2 dan ampas 2. Filtrat 1 dan 2 digabungkan, lalu dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Hasil yang diperoleh yakni ekstrak kental yang dihasilkan dibiarkan pada suhu ruangan hingga seluruh pelarut etanol menguap. Ekstrak ditimbang dan disimpan dalam wadah gelas tertutup yang siap digunakan untuk proses uji antibakteri. Ekstrak kental ini akan diencerkan kembali dengan normal salin untuk membuat konsentrasi yang sesuai dengan konsentrasi penelitian ini yakni 10%, 50% dan 100%.

Pembuatan media agar diawali dengan melarutkan *Blood Agar* (BA) seberat 0,56 g pada 20 mL etanol (28 g/1000 mL) dengan menggunakan labu erlenmeyer. Setelah proses tersebut, larutan akan dihomogenkan dengan alat stirrer. BA selanjutnya akan disterilkan dengan suhu 121°C selama 15

menit. BA ini berfungsi untuk tempat inokulasi bakteri yang digunakan pada penelitian ini. Media dasar dibuat dengan cara ditimbang BA seberat 2,3g lalu dilarutkan dengan 100 mL etanol (23g / 1000mL) dengan menggunakan labu erlenmeyer steril. Sedangkan media pembenihan dibuat dengan cara ditimbang seberat 5,75g BA, dilanjutkan proses pelarutan dalam 250mL etanol (23g / 1000 mL). Proses selanjutnya yakni media tersebut dihomogenkan dengan stirrer di atas penangas air sampai mendidih. Jika sudah homogen selanjutnya disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Media dasar dan media pembenihan digunakan dalam pembuatan media pengujian sebagai lapisan dasar dan lapisan kedua. Diamkan media yang telah siap, kemudian langkah selanjutnya adalah menyiapkan bakteri yang akan di inokulasi di BA. Sebelum itu, dilaksanakan identifikasi bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Identifikasi bakteri *Staphylococcus epidermidis*

dilakukan terhadap sampel bakteri *Staphylococcus epidermidis* untuk memastikan sampel bakteri tersebut adalah murni bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Uji identifikasi yang dilakukan adalah pewarnaan gram dan pemeriksaan mikroskopis. Kemudian disiapkan preparat sampel dalam bentuk suspensi diatas kaca objek dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan atau diletakkan di dekat api. Sterilisasi di atas api sebanyak tiga kali kemudian preparat ditetesi dengan zat warna kristal violet. Setelah didiamkan selama 30 detik lalu dibilas, selanjutnya ditambahkan zat pematik lugol selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air. Bilas preparat dengan alkohol 96% selama 2 detik hingga zat warna larut kemudian dibilas dengan akuades. Selanjutnya preparat ditetesi dengan pewarna kedua dan didiamkan selama 30 detik. Kelebihan zat warna akan dibuang dan dibilas menggunakan akuades. Terakhir dikeringkan dan diberi satu tetes minyak imersi untuk menghindarkan perbedaan indek bias. Preparat dapat dilihat di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali dengan minyak emersi dan pencatatan hasil pengamatan.

Ekstrak etanol dari biji kopi robusta diuji pada bakteri *Staphylococcus epidermidis* diawali dengan menyiapkan 5 cawan petri yang telah berisi media agar dan diberi penandaan untuk masing-masing konsentrasi dan kontrol positif maupun negatif. Masukkan 5 lembar *paper disc* ke dalam masing-masing larutan uji dan tunggu hingga menyerap. Selanjutnya suspensi bakteri diratakan pada media agardengan cara dioles. Letakkan *paper disc* pada cawan petri sesuai penandaan konsentrasi dan kontrol. Inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Daya hambat bakteri diamati dengan mengukur diameter hambat setelah periode inkubasi.

Analisis data berasal dari data hasil penelitian dianalisis dengan bantuan komputer, diawali dengan melakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas dengan *Levene Test*. Karena datanya tidak terdistribusi normal dan/atau tidak homogen dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$), dan dilanjutkan dengan uji statistik Mann-Whitney ($p < 0,05$). Penelitian ini telah mendapat Keterangan Kelaikan Etik (*Ethical Clearance*) dengan nomor: 951/UN14.2.2/PD/KEP/2018

HASIL

Diameter zona hambat yang terlihat di sekitar kontrol dan perlakuan kelompok konsentrasi diukur dengan menghitung diameter zona bening keseluruhan yang mengitari satu perlakuan dan didapatkan hasil pada tabel 1 sebagai berikut.

Tabel 1. Diameter zona hambat Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

Jenis Perlakuan	Diameter zona hambat (mm)					Rerata (mm)
	I	II	III	IV	V	
Ekstrak 10%	0	0	0	0	0	0
Ekstrak 50%	8	7	9	5	5	6,8
Ekstrak 100%	10	10	7	10	8	9
Kontrol (+)	21	21	21	21	22	21,2
Kontrol (-)	0	0	0	0	0	0

Pada tabel 1 didapatkan adanya diameter zona hambat dengan variasi diameter dalam setiap pengulangannya. Terlihat semakin besar konsentrasi ekstrak etanol biji kopi robusta maka diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 yang terbentuk juga semakin besar. Rerata diameter zona hambat terbesar didapatkan pada konsentrasi ekstrak etanol biji kopi robusta 100%, hal ini dapat ditandai adanya penghambatan pertumbuhan bakteri yang tergantung pada konsentrasi ekstrak etanol biji kopi robusta yang telah diberikan.

Pada hasil penelitian ini didapatkan adanya variasi antar pengulangan pada konsentrasi ekstrak etanol biji kopi robusta 50% dan 100%. Pada konsentrasi 50% didapatkan diameter zona hambat terbesar yaitu 9 mm sedangkan diameter zona hambat terkecilnya pada pengulangan ke IV dan V yaitu 5 mm. Di sisi lain pada konsentrasi 100% terlihat diameter zona hambat terbesar pada pengulangan I,II dan IV sebesar 10 mm dan diameter terkecilnya yaitu 7 mm.

Perbedaan diameter zona hambat pada masing- masing konsentrasi di setiap perlakuan bisa

disebabkan oleh beberapa faktor yang terdiri dari media kultur, kepekaan bakteri, kondisi inkubasi yang dilihat dari suhu, pH dan waktu, komposisi media, konsentrasi bakteri dan kecepatan zat berdifusi dalam agar.

Uji statistik efektivitas ekstrak etanol biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 menggunakan bantuan komputer. Data ini memiliki lebih dari dua kelompok dan berpasangan sehingga *One way ANOVA* dapat digunakan sebagai uji kebermaknaan.

Langkah pertama yang dilakukan yaitu menganalisis normalitas dan homogenitas varian terlebih dahulu dengan *Shapiro Wilk* sebagai uji normalitas. Pada uji normalitas didapatkan bahwa distribusi data tidak normal karena diperoleh nilai signifikansi 0,042 ($p < 0,05$) pada konsentrasi 100% dan begitu pula pada kontrol positif. Kemudian *Levene Test* digunakan untuk menunjukkan hasil uji homogenitas. Didapatkan nilai signifikansi 0,029 ($p < 0,05$) sehingga terdapat varian data yang tidak homogen. Dikarenakan hasil uji statistik tidak berdistribusi normal. Serta varian data tidak homogen maka tidak dapat dilakukan uji *One Way ANOVA*. Maka analisis selanjutnya menggunakan uji non-parametrik *Kruskal Wallis* untuk mengetahui apakah masing-masing ekstrak etanol biji kopi robusta memiliki perbedaan yang signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

PEMBAHASAN

Data hasil pengamatan yang telah tercatat pada tabel 1 selanjutnya data dibandingkan dengan kategori daya hambat rerata diameter (mm) pada penelitian yang dilakukan oleh Tanauma yaitu pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Dalam penelitian dinyatakan bahwa pada konsentrasi ekstrak 10 % terdapat perbesaran diameter kadar hambat dengan rerata 22,5 mm. Pada konsentrasi ekstrak 50% ditemukan diameter zona hambat dengan rerata sebesar 24 mm, selanjutnya pada konsentrasi ekstrak 100% didapatkan perbesaran diameter zona hambat dengan diameter rerata sebesar 27 mm.

Penelitian yang dilakukan Tanauma mengujikan ekstrak etanol biji kopi robusta pada bakteri *Escherichia coli* dengan tetrasiklin sebagai kontrol positif. Bakteri *Escherichia coli* yaitu bakteri gram negatif. Bakteri *Escherichia coli* meliputi flora normal tubuh yang berwujud batang pendek (kokobasil) berukuran 0,4-0,7 μm . Bakteri ini termasuk bakteri anaerob fakultatif, hal ini didapatkan bahwa bakteri ini mampu hidup dalam kondisi aerob maupun anaerob. Sedangkan bakteri *Staphylococcus epidermidis* termasuk bakteri gram positif, kokus berkelompok irregular/ tidak teratur, koloni berwarna putih dan mampu tumbuh cepat

pada suhu 37°C. Secara keseluruhan hal ini didapatkan bahwa pertumbuhan bakteri yang bersifat gram negatif maupun gram positif dapat dihambat oleh ekstrak etanol biji kopi robusta dengan konsentrasi yang serupa yaitu 10%, 50% dan 100%.⁴

Pada konsentrasi yang berbeda dilakukan oleh Yaqin yaitu ekstrak etanol biji kopi robusta yang diujikan pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50% dan 100 %. Bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu bakteri yang berbentuk batang (*coccus*) yang bersifat gram positif. Penelitian ini didapatkan daya hambat terbesar pada konsentrasi 100% dari ekstrak biji kopi robusta, namun pada dosis terkecil pun pertumbuhan bakteri dapat dihambat walaupun tidak seefektif pada konsentrasi 100%.³ Terdapat pula penelitian lain yang menguji daya hambat ekstrak biji kopi robusta pada bakteri yang berbeda yaitu bakteri *Enterococcus faecalis*. Penelitian ini hanya menggunakan ekstrak murni biji kopi robusta dengan kontrol negatif akuades dan kontrol positif *chlorhexidine* 2%. Bakteri *Enterococcus faecalis* adalah mikroorganisme normal yang biasa ditemukan pada saluran gigi. Bakteri *Enterococcus faecalis* adalah bakteri yang berbentuk bulat (gram positif) dan non-motil. Hasil dari penelitian ini ditemukan ekstrak murni biji kopi robusta mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. Beberapa penelitian sudah ditemukan yakni bakteri gram positif dapat dihambat oleh ekstrak etanol biji kopi robusta.⁵

Pada biji kopi robusta terdapat senyawa antioksidan dan senyawa antibakteri. Kafein yang terdapat pada biji kopi memiliki kandungan sebesar 1,6%-2,4%. Senyawa pada kafein berperan pada tubuh sebagai antioksidan dalam menangkal radikal bebas dan juga melindungi sel imun dari kerusakan jangka panjang serta dapat meningkatkan aktivitas sel imun dan memperkuat aktivitas lisozim.⁶ Di sisi lain kafein yang merupakan senyawa alkaloid *xantine* yang berbentuk kristal dapat juga berefek sebagai antibakteri. Aktivitas antibakteri senyawa alkaloid yang bekerja dengan cara menghambat sintesis dinding sel kemudian menyebabkan lisis sel yang selanjutnya akan terjadi kematian dari sel itu sendiri.¹⁰ Senyawa lainnya yaitu asam klorogenat. Asam klorogenat merupakan komponen terbanyak dalam kopi yang mampu menetralkan bahan yang bersifat radikal bebas di dalam tubuh dengan cara mempertahankan struktur normal sel dan fungsinya. Asam klorogenat bekerja yakni dengan mekanisme masuk ke dalam inti sel bakteri dan merusak struktur dinding sel tersebut.⁷

Selain kafein dan asam klorogenat yang memiliki aktivitas antibakteri yaitu senyawa fenol. Senyawa fenol merupakan flavanoid yang bekerja dirusakannya dinding sel bakteri, melewati perbedaan kepolaran antara gugus alkohol pada senyawa flavonoid dengan lipid penyusun DNA

sehingga merusak dinding sel dan masuk ke dalam intisel bakteri. Berbeda dengan senyawa alkaloid, senyawa flavonoid ketika merusak sel bakteri akan memanfaatkan perbedaan kepolaran antar lipid penyusun sel bakteri dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid.⁸

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji kopi robusta terbukti (*Coffea canephora*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 dengan konsentrasi hambat minimum (KHM) pada konsentrasi 50% dan diameter zona hambat terbesar pada konsentrasi 100%. Pada penelitian ini pun didapatkan adanya perbedaan yang bermakna di antara masing-masing konsentrasi ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Peneliti menyarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji kandungan fitokimia dari biji kopi robusta sehingga dapat mengetahui bahan aktif yang memiliki peranan antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Penelitian lanjutan akan dapat digunakan untuk menambahkan bukti dan validitas dari ekstrak biji kopi robusta terhadap pertumbuhan mikroorganisme lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Musadad A., Lubis A., Kejadian Infeksi Nosokomial Saluran Pencernaan di Rumah Sakit di DKI Jakarta. *Buletin Peneliti Kesehatan*;1992; 20(2): 79–84.
2. Pinheiro L., Brito, C.I., de Oliveira, A., Martins, P.Y.F., Pereira, V.C., da Cunha, M. de L.R. de S., *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* Molecular detection of cytotoxin and enterotoxin genes. *Toxins (Basel)*;2015;7:3688–3699.
3. Yaqin M.A. Nurmilawati M., Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta (*Coffea robusta*) sebagai Penghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Biologi, Sains, Lingkungan dan Pembelajarannya*;2015;867.
4. Tanauma H.A., Citraningtyas, G., Lolo, W.A., Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*; *Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*: 2016;5(4);243–251.
5. Kaseke, M.M., Uji daya hambat ekstrak biji kopi robusta (*Coffea robusta*) terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis* secara in vitro. *Jurnal e-GiGi(eG)*:2016;4(2);4–7.
6. Widyotomo, S., Sri-Mulato, Senyawa Penting Pada Biji Kopi. *War. Pus. Penelit. Kopi dan Kakao Indones*:2007;23(1);44–50.
7. Farhaty, N., Tinjauan Kimia dan Aspek Farmakologi Senyawa Asam Klorogenat Pada Biji Kopi: *Review. Farmaka*:2017;4(3); 1–19.
8. Purwantiningsih, T.I., Suranindyah, Yuni Y., Aktivitas senyawa fenol dalam buah mengkudu: *Buletin Peternakan*;2014;38(1);59–64.
9. Dani, Tresnawati C, Randraini E, Seleksi Genotipe Unggul Kopi Robusta Spesifik Lokasi: *Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar*;2013;139-44.
10. Kuncoro S, Sutiarto L, Nugroho J, Masithoh R. Kinetika Reaksi Penurunan Kafein dan Asam Klorogenat Biji Kopi Robusta melalui Pengukusan Sistem Tertutup: *Agritech*; 2018.;8(1):105–11.