

## Daya Hambat Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Pertumbuhan *Fusobacterium nucleatum*

(Antibacterial Activity of Robusta Coffee Bean Extract (*Coffea canephora*) on The Growth of *Fusobacterium nucleatum*)

Anisa Nur Hakima<sup>1</sup>, Tantin Ermawati<sup>2</sup>, Happy Harmono<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

<sup>2</sup> Bagian Ilmu Kesehatan Gigi Masyarakat, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

### Abstrak

*Fusobacterium nucleatum* adalah bakteri yang terdapat pada flora normal rongga mulut yang berperan dalam terjadinya penyakit periodontal. Prevalensi penyakit periodontal di Indonesia mencapai 70%. Salah satu pengobatan dengan menggunakan tanaman obat adalah biji kopi robusta. Biji kopi robusta mengandung asam volatil, asam klorogenat, asam kafein, fenol, dan kafein yang diduga bersifat antibakteri. Tujuannya untuk mengetahui daya hambat ekstrak kopi robusta terhadap pertumbuhan *Fusobacterium nucleatum*. Penelitian ini menggunakan metode difusi cakram dengan 4 sampel pada setiap kelompok penelitian. Kelompok penelitian terdiri dari 6 kelompok perlakuan (ekstrak kopi robusta 12,5%, 25%, 50% dan 100%), kelompok kontrol positif (chlorhexidine gluconate 0,2%), dan kelompok kontrol negatif (aquades steril). Data dianalisis menggunakan uji One Way Anova dan uji LSD (Least Significant Difference). Ekstrak kopi robusta memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan *Fusobacterium nucleatum*. Konsentrasi ekstrak kopi robusta 100%, 50%, 25%, 12,5% memiliki kemampuan yang sama dalam menghambat pertumbuhan *Fusobacterium nucleatum*.

**Kata kunci:** Aktivitas antibakteri, Ekstrak biji kopi robusta, *Fusobacterium nucleatum*, metode difusi cakram

### Abstract

*Fusobacterium nucleatum* is a bacteria found in normal flora of the oral cavity that plays a role in the occurrence of periodontal disease. The prevalence of periodontal disease in Indonesia reaches 70%. One treatment by using medicinal plants is robusta coffee beans. Robusta coffee beans contain volatile acids, chlorogenic acids, caffeine acids, phenols and caffeine suspected to be antibacterial. The aim was to determine the inhibition of coffee robusta extract on growth of *Fusobacterium nucleatum*. This study used disc diffusion method with 4 samples in each study group. The study group consisted of 6 treatment groups (12,5%, 25%, 50% and 100% coffee robusta extract), positive control group (chlorhexidine gluconate 0,2%), and negative control group (sterile aquades). Data were analyzed using One Way Anova test and LSD (Least Significant Difference) test. Coffee robusta extract has the ability to inhibit the growth of *Fusobacterium nucleatum*. The concentration of coffee robusta extract 100%, 50%, 25%, 12,5% have same ability to inhibit the growth of *Fusobacterium nucleatum*.

**Keyword :** Antibacterial activity, coffee robusta bean extract, Disc diffusion method, *Fusobacterium nucleatum*

**Korespondensi (correspondence) :** Annisa Nur Hakima . Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember. Jln. Kalimantan No.37, Kampus Tegalboto, Jember 68121. Email. [anisahakima@yahoo.co.id](mailto:anisahakima@yahoo.co.id)

Penyakit gigi dan mulut adalah suatu penyakit yang tidak kalah pentingnya dengan penyakit lain yang dapat mengganggu aktivitas seseorang dalam melaksanakan tugas sehari-hari. Penyakit periodontal merupakan contoh dari kelainan rongga mulut yang disebabkan karena akumulasi plak pada rongga mulut.<sup>1</sup> Di Indonesia, penyakit periodontal menduduki urutan kedua setelah karies yaitu mencapai 70%. Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2013 masalah gigi dan mulut mencapai 25,9%.<sup>2</sup> Salah satu penyakit jaringan periodontal yang umumnya dijumpai adalah periodontitis. Periodontitis merupakan salah satu penyakit periodontal yang dapat menimbulkan suatu infeksi kronis yang secara perlahan menyerang dan merusak gingiva dan tulang penyangga gigi. Periodontitis disebabkan lebih dari 200 spesies bakteri, salah satunya yaitu *Fusobacterium nucleatum*.<sup>1</sup>

*F. nucleatum* adalah salah satu jenis bakteri yang berperan penting pada proses perkembangan terjadinya penyakit periodontal. *F. nucleatum* adalah bakteri

Gram negatif anaerob yang ditemukan pada flora normal rongga mulut yang berperan dalam terjadinya suatu penyakit periodontal.<sup>3</sup> Salah satu faktor penting terjadinya penyakit periodontal adalah produksi berbagai zat toksik dari bakteri. Butirat, ion propionat, dan ammonium yang diproduksi oleh *F. nucleatum* dapat menghambat proliferasi fibroblast gingiva, memiliki kemampuan untuk menembus epitel gingiva serta ada dalam plak yang berhubungan dengan periodontitis.<sup>4</sup> *F. nucleatum* merupakan spesies yang paling banyak ditemukan di rongga mulut di antara genus *Fusobacterium*. Bakteri ini jumlahnya mendominasi spesies Gram negatif pada plak yang *mature*.<sup>5</sup>

Salah satu upaya untuk mengurangi terbentuknya plak maka dilakukan dengan cara berkumur dengan menggunakan obat kumur. *Chlorhexidine* diakui sebagai standar emas antimikroba dalam menjaga kebersihan rongga mulut.<sup>6</sup> Bahan ini sangat potensial dalam menghambat pembentukan plak dan bertahan dalam saliva selama 7 jam. Efek

antibakteri dari *chlorhexidine* adalah dengan berinteraksi dengan membran sel bakteri dan menambah permeabilitas sehingga terjadi kebocoran.<sup>7</sup> *Chlorhexidine* mempunyai beberapa efek samping yaitu perubahan dalam sensasi rasa, peningkatan pembentukan kalkulus, pewarnaan gigi dan deskuamasi mukosa mulut serta pembengkakan parotis. Efek samping lokal yang paling jelas dan penting adalah perubahan warna coklat pada gigi, bahan restoratif, dorsum lidah dan pembentukan kalkulus supragingiva.<sup>8</sup>

Alternatif yang dapat ditempuh untuk meminimalkan efek samping dari penggunaan *chlorhexidin* adalah memanfaatkan zat aktif yang terkandung dalam tanaman obat sebagai pembunuh bakteri. Sejak beberapa tahun terakhir ini banyak penelitian tanaman obat dilakukan terutama di perguruan tinggi dalam rangka memberikan informasi mengenai penelitian tanaman obat. Pemanfaatan tanaman obat tersebut sangat diperlukan dalam menunjang pemeliharaan kesehatan gigi dan mulut.<sup>9</sup> Salah satu tanaman yang secara empiris digunakan sebagai obat antibakteri adalah kopi.<sup>10</sup>

Indonesia merupakan negara penghasil kopi terbesar ke-3 di dunia setelah Brazil dan Vietnam pada tahun 2013.<sup>11</sup> Kopi memiliki banyak manfaat bagi kesehatan diantaranya sebagai antioksidan, antiinflamasi dan juga antibakteri.<sup>12</sup> Sebagai antibakteri kopi mengandung zat aktif seperti kafein, fenol, trigoneline, asam klorogenik.<sup>13</sup> Pada biji kopi robusta zat antibakteri seperti kafein dan asam klorogenik yang terkandung lebih besar dibanding biji kopi arabika.<sup>14</sup>

Berdasarkan latar belakang tersebut, penulis bermaksud untuk melakukan penelitian tentang daya antibakteri ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap pertumbuhan *F. nucleatum* dengan menggunakan konsentrasi 12,5%, 25%, 50% dan 100%.

## METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian *experimental laboratoris* dengan menggunakan rancangan *the post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2017 sampai Januari 2018 di Laboratorium Mikrobiologi bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember, dan Laboratorium Tanaman Fakultas Pertanian Politeknik Negeri Jember. Jumlah sampel pada penelitian ini adalah 4 buah untuk setiap kelompok perlakuan yang telah memenuhi hasil perhitungan jumlah sampel minimal menurut Federer.

Cara pembuatan ekstrak biji kopi robusta yaitu sampel kopi robusta sebanyak 500 gram kemudian selanjutnya dibawa ke laboratorium. Biji kopi yang telah dikumpulkan

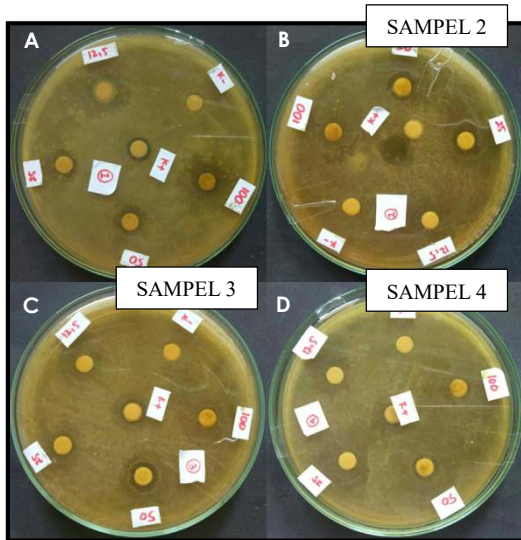
dibersihkan dari pengotor, selanjutnya dicuci di bawah air mengalir sampai bersih, ditiriskan, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Sampel yang telah kering diserbukkan dengan menggunakan blender, serbuk yang dihasilkan diayak menggunakan ayakan mesh 65 hingga diperoleh serbuk yang halus dan seragam. Hasilnya dimasukkan ke dalam wadah gelas tertutup. Ekstraksi biji kopi robusta dilakukan dengan metode maserasi. Sebanyak 470 gram serbuk simplisia biji kopi dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian direndam dengan larutan etanol 96% dengan perbandingan 1:4 yaitu sebanyak 1880 mL, ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 5 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari, sampel yang direndam tersebut disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat dan ampas. Filtrat lalu dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak biji kopi robusta. Ekstrak kental yang dihasilkan dibiarkan pada suhu ruangan hingga seluruh pelarut etanol menguap. Ekstrak ditimbang dan diperoleh sebanyak 46,24 gram dan disimpan dalam wadah gelas tertutup sebelum digunakan untuk pengujian.<sup>10</sup>

Jumlah keseluruhan sampel penelitian yang digunakan sebanyak 24 sampel; terdiri dari 6 kelompok penelitian yaitu ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, 100%, *chlorhexidine* (kontrol positif) dan aquades steril (kontrol negatif) dengan besar sampel sebanyak 4 untuk setiap kelompok penelitian. Metode uji antibakteri yang digunakan adalah disk difusi. Masing-masing kelompok perlakuan, kontrol positif, dan kontrol negatif diteteskan pada *blank paper disk* sebanyak 20µL dengan menggunakan mikropipet. Kemudian disk diletakkan pada media BHI-A (*Brain Heart Infusion-Agar*) yang telah diinokulasi suspensi bakteri dengan menggunakan pinset steril. Hal tersebut diulangi pada petridish ke-2, 3 dan 4. Semua petridish dimasukkan dalam desikator dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menggunakan inkubator. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dan data dicatat dalam satuan milimeter.

Data hasil penelitian kemudian di tabulasi dan dilakukan analisis secara statistik. Uji Normalitas dengan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* dan Uji Homogenitas dengan menggunakan *Levene's test*. Apabila hasil menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen ( $p > 0,05$ ) maka dilakukan uji statistik parametrik *One Way Anova* dilanjutkan dengan *LSD (Least Significant Differences)*. Apabila hasil uji menunjukkan data tidak terdistribusi normal dan/atau tidak homogen maka dapat dilakukan uji statistik nonparametrik *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan *Mann-Whitney*.

## HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian mengenai daya hambat ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap pertumbuhan *Fusobacterium nucleatum* (gambar 1).



**Gambar 1.** Zona inhibisi kelompok penelitian

Pada Gambar 1 dapat dilihat adanya daerah bening yang melingkar di sekitar cakram kertas disebut zona hambat. Zona hambat yang terbentuk menunjukkan adanya hambatan pada pertumbuhan *F. Nucleatum*. Zona hambat tersebut diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong digital. Hasil perhitungan nilai diameter zona hambat terhadap pertumbuhan *F. nucleatum* disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Kemampuan daya hambat ekstrak biji kopi robusta terhadap pertumbuhan *F. nucleatum* (n=4)

Kelompok	Zona inhibisi (mm)
K-	0.00 ± 0.00
K+	9.45 ± 0.78
R12,5	7.75 ± 0.49
R25	8.33 ± 0.76
R50	9.17 ± 0.83
R100	8.40 ± 0.38

n, Jumlah sampel; K- : Kontrol negatif (aquadest steril); K+ : Kontrol positif (*chlorhexidine gluconate* 0,2%); R12,5: Ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 12,5%; R25: Ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 25%; R50: Ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 50%; R100: Ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 100%

Berdasarkan Tabel 1 menunjukkan nilai rata-rata diameter zona hambat terbesar terdapat pada kelompok K(+), yaitu sebesar 9,45 mm, kemudian berturut-turut diikuti dengan kelompok R100 sebesar 8,40 mm, kelompok R50 sebesar 9,17 mm, kelompok R25 sebesar 8,33 mm, dan kelompok R12,5 sebesar 7,75 mm. Kelompok K(-) tidak memiliki daya hambat karena nilai rata-rata diameter zona hambatnya sama dengan diameter kertas cakram yang nilainya 0 mm.

Data nilai rata-rata diameter zona hambat pada masing-masing kelompok sampel selanjutnya dianalisis secara statistik untuk mengetahui apakah data pada masing-masing kelompok sampel berdistribusi normal atau tidak dengan menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk*. Hasil uji *Shapiro-wilk* diperoleh nilai signifikansi (p) lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal. Setelah data diketahui berdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan *Levene's test*. Hasil uji *Levene's test* menunjukkan nilai signifikansi (p) lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa data homogen.

Berdasarkan hasil uji *Shapiro-wilk* dan uji *Levene's test* maka didapatkan data hasil penelitian berdistribusi normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai signifikansi (p) lebih kecil dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada seluruh kelompok penelitian. Uji statistik dilanjutkan dengan uji *LSD (Least Significant Difference)* untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna antar kelompok penelitian. Hasil uji *LSD* menunjukkan bahwa kelompok yang memiliki perbedaan bermakna yaitu K- dengan seluruh kelompok sampel yang lain; K+ dengan R12,5, R25 dan R100; R12,5 dengan R50.

## PEMBAHASAN

Hasil uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 12,5%, 25%, 50% dan 100%. Zona hambat ekstrak biji kopi robusta semua konsentrasi lebih besar daripada zona hambat kontrol negatif. Artinya ekstrak biji kopi robusta mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan *F. nucleatum*. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya senyawa antibakteri pada biji kopi robusta yaitu asam volatil, asam klorogenik, asam kafeik, fenol, dan kafein.<sup>9,13</sup>

Mekanisme kerja senyawa antibakteri asam volatil yaitu memiliki aktivitas meningkatkan daya hambat pertumbuhan bakteri, karena lebih mampu menembus dinding sel bakteri daripada asam lemak rantai panjang. Asam klorogenik dan asam kafeik memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri yaitu dengan cara masuk ke dalam sel dan merusak struktur dinding sel bakteri sehingga mampu mencegah pertumbuhan bakteri Gram positif dan negatif.<sup>9</sup>

Fenol adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang menempel pada cincin aromatik. Mekanisme kerja fenol yaitu berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen kemudian merusak membran sitoplasma sehingga menyebabkan kebocoran inti sel pada bakteri.<sup>15</sup> Fenol juga mempunyai mekanisme penghambatan

dengan cara meracuni protoplasma sel dan merusak dinding sel serta mengendapkan protein sel mikroba.<sup>9</sup> Fenol merupakan senyawa flavonoid yang memiliki aktifitas biologis dengan merusak dinding sel bakteri, melalui perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri.<sup>13</sup>

Kafein merupakan senyawa alkaloid yang berwujud kristal berwarna putih. Kemampuan senyawa alkaloid sangat dipengaruhi oleh keaktifan biologis senyawa tersebut, yang disebabkan oleh adanya gugus basa yang mengandung nitrogen. Adanya gugus basa ini apabila mengalami kontak dengan bakteri akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel dan DNA bakteri yang merupakan penyusun utama inti sel, dimana merupakan pusat pengaturan segala kegiatan sel. Maka akan terjadi kerusakan DNA pada inti sel bakteri ini juga akan mendorong terjadinya lisis pada inti sel bakteri.<sup>13</sup>

Hasil penelitian ini didapatkan adanya perbedaan bermakna pada kelompok ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 12,5% dengan konsentrasi 50%, tetapi antara kelompok konsentrasi 12,5%, 25% dan 100% tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Begitu juga pada konsentrasi 25% dengan konsentrasi 50% dan 100% serta konsentrasi 50% dengan konsentrasi 100%. Jadi dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 12,5%, 25%, 50% dan 100% mempunyai kemampuan yang sama dalam menghambat pertumbuhan *F. nucleatum*.

Hasil ini tidak sesuai dengan hipotesis yang mengatakan bahwa konsentrasi 100% merupakan konsentrasi optimal yang dapat menghambat pertumbuhan *F. nucleatum*. Menurut David dan Stout dalam Dewi (2010) kemungkinan hal ini dapat terjadi karena perbedaan kecepatan difusi senyawa antimikroba pada media agar. Pada konsentrasi 100% kemampuan difusinya rendah disebabkan oleh kepekatkan ekstrak sehingga akan menyebabkan ekstrak tidak dapat berdifusi secara maksimal ke dalam media agar yang telah diinokulasi oleh bakteri.<sup>16</sup> Semakin tinggi konsentrasi maka pembentukan senyawa berukuran lebih besar menjadi lebih banyak sehingga menyebabkan senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak berukuran lebih besar. Molekul berukuran besar ini tidak mampu menembus pori-pori medium agar dan menyebabkan tidak terjadi kontak langsung antara senyawa aktif dengan bakteri, sehingga tidak terjadi kerusakan pada sel bakteri oleh senyawa aktif. Kemampuan difusi bahan dan kepekatkan ekstrak juga dapat mempengaruhi terjadinya penurunan zona hambat pada konsentrasi yang lebih tinggi.<sup>17</sup>

Menurut Davis dalam Tanauma (2016), kriteria kekuatan daya antibakteri dikelompokkan menjadi menjadi 4 yaitu

lemah, sedang, kuat dan sangat kuat. Berdasarkan kriteria tersebut ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50% dan 100% memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *F. nucleatum* dengan kategori sedang. Pada kontrol positif yaitu *chlorhexidine gluconate* 0,2% juga termasuk dalam kategori sedang menurut klasifikasi kekuatan daya antibakteri.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Fusobacterium nucleatum*. Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) konsentrasi 100%, 50%, 25% dan 12,5% memiliki kemampuan yang sama dalam menghambat pertumbuhan *Fusobacterium nucleatum*

Saran yang dapat diberikan yaitu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai daya hambat ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap mikroflora lain pada rongga mulut serta agar mengetahui konsentrasi optimal ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang dapat diterima tubuh, dan uji biokompabilitas ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap jaringan rongga mulut sebelum diaplikasikan sebagai alternatif obat kumur.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Nasutianto H. Bakteri penyebab penyakit periodontal. *Interdental*, 2006; 5 (3): 10-3.
2. Kementerian Kesehatan RI. *Survei Kesehatan Rumah Tangga*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013.
3. Junior J., Maria C., Mario J. *Virulence of Oral Fusobacterium nucleatum from Humans and Non-Human Primates in Mice*. Sao Paulo: Departement Ed Microbiologia, Institut ode Ciencias Biomedicas, University de Sao Paulo. 2000.
4. Bolstad, Al., Jensen H.B., Bakken V. 1996. Clinical microbiology review: Taxonomy, Biology, and Periodontal aspect of *Fusobacterium nucleatum*. *American Society for Microbiology*. 1996; 9(1): 55-71.
5. Haraldsson G.. *Oral Commensal Prevotella spesies and Fusobacterium nucleatum: Identification and Potential Pathogenic Role*. Helsinki: Faculty of Medicine of The University of Helsinki. 2005.
6. Kaplowitz GJ., Cortell M. *Chlorhexidine: a multi-functional antimicrobial drug*. 2008. Available from <https://www.dentalacademyofce.com/courses/1423/PDF/Chlorhexidine.pdf>. [Diakses 25 Oktober 2017]
7. Pristyhari A. Daya Hambat Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum* Linn) Terhadap Pertumbuhan *Fusobacterium*

- nucleatum*. Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Kedokteran Gigi Universitas Jember. 2016.
8. Dutt P., Rathore PK., Khurana D. Chlorhexidine - An antiseptic in periodontics. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 2014; 13(9) : 85-8.
  9. Chamidah S. Daya Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) Terhadap Pertumbuhan *Porphyromonas Gingivalis*. Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Kedokteran Gigi Universitas Jember. 2012.
  10. Tanauma HA., Citraningtyas G., Lolo WA. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) Terhadap Bakteri *Escherichia Coli*. *Jurnal Ilmiah Farmasi UNSRAT*, 2016; 5: 1-9.
  11. Kementerian Perdagangan RI. *Analisis Komoditas Kopi dan Karet Indonesia*. Jakarta : Kementerian Perdagangan Republik Indonesia. 2014.
  12. Yashin A., Yakov Y., Jing YW., Boris N. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Antioxidant*, 2013; (2) : 230-45.
  13. Yaqin MA dan Nurmilawati. *Ekstrak Coffea robusta Sebagai Penghambat Pertumbuhan Staphylococcus aureus*. Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS. 2015.
  14. Chu Yi-Fang. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. Blackwell Publishing Ltd. 2012.
  15. Tilaar VAM., Kaseke MM., Juliatri. Uji daya hambat ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap pertumbuhan *Enterococcus Faecalis* secara in vitro. *Jurnal e-GiGi*. 2016; 4(2): 1-4.
  16. Dewi FK. Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. Skripsi. Surakarta: Universitas Sebelas Maret. 2010.
  17. Fitriani A. Aktivitas Alkaloid *Ageratum conyzoides L.* Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. Skripsi. Jakarta: Universitas Pendidikan Indonesia. 2014