

UJI AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% BIJI HIJAU KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora P.*) TERHADAP BAKTERI *Shigella dysenteriae* DAN *Salmonella typhimurium*

Yuliani Fatimah, Oom Komala dan Novi Fajar Utami
Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA – Universitas Pakuan
Departemen Biologi, Fakultas MIPA – Institut Pertanian Bogor
Email : yulianifatimah275@gmail.com

ABSTRAK

Diare merupakan penyebab utama kesakitan dan kematian pada anak di negara berkembang, termasuk di Indonesia. Infeksi ini umumnya disebabkan oleh bakteri dari golongan *Enterobacteriaceae*. Salah satu penyebabnya adalah bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhimurium*. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antibakteri adalah kopi (*Coffea canephora P.*) dan telah dilakukan penelitian dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi ekstrak biji hijau kopi robusta yang paling optimal sebagai antibakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhimurium*. Ekstraksi biji hijau kopi robusta dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, pengujian antibakteri dari biji hijau kopi robusta dengan metode dilusi agar digunakan untuk menentukan KHM dan difusi kertas cakram untuk menentukan LDH dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%. Kontrol positif menggunakan kloramfenikol 10 ppm dan kontrol negatif menggunakan aquadest. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak biji hijau kopi robusta paling efektif terhadap *Salmonella typhimurium* didapatkan pada konsentrasi 75% yaitu dengan lebar daya hambat paling besar 10 mm. Sedangkan terhadap *Shigella dysenteriae* ekstrak biji hijau kopi robusta dengan konsentrasi 75% dengan lebar daya hambat sebesar 9,5 mm.

Kata Kunci : *Coffea canephora*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*

ABSTRACT

Diarrhea is a major cause of pain and death case in children in developing countries, including in Indonesia. This infection is generally caused by bacteria from the *Enterobacteriaceae* class. One of the causes is *Shigella dysenteriae* and *Salmonella typhimurium*. One of the plants that has the potential as an antibacterial is coffee (*Coffea canephora P.*). Based of the Research who has been conducted, coffee can to inhibit *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. This study aims to determine the extract concentration of robusta coffee green seed which is the most optimal as an antibacterial to *Shigella dysenteriae* and *Salmonella typhimurium*. Extraction of robusta coffee green seed was carried out by maceration method using 96% ethanol solvent and antibacterial testing of robusta coffee green seed with dilution method to be used to determine minimum inhibitory concentration and paper diffusion to determine inhibitory area width with a concentration of 25%, 50%, 75%. Positive control using chloramphenicol 10 ppm and negative control using aquadest. The results showed that the most effective of extraction of robusta coffee green seed against *Salmonella typhimurium* was obtained at a concentration of 75% with a maximum inhibitory width of 10 mm, while for *Shigella dysenteriae* can be effective if extraction of robusta coffee green seed with a concentration of 75% with a width of inhibition of 9.5 mm.

Keywords: *Coffea canephora*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*

PENDAHULUAN

Infeksi ini umumnya disebabkan oleh bakteri dari golongan *Enterobacteriaceae* adalah bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhimurium*. *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhimurium* merupakan bakteri patogen, yaitu bakteri yang memiliki kemampuan menimbulkan penyakit pada manusia yang dapat mengakibatkan ketidak-seimbangan mikro flora dalam usus (Rahmawati, 2015).

Masyarakat pada umumnya meminum kopi secara empiris ketika terkena diare dapat sembuh. Penelitian yang dilakukan oleh Utami (2018) menyatakan bahwa dalam biji kopi robusta terdapat kandungan diantaranya alkaloid, tanin, saponin dan flavonoid. Kandungan Senyawa fenolik yang paling tinggi terdapat pada kopi ialah asam klorogenik yang merupakan asam organik non-volatil mampu mencegah pertumbuhan bakteri gram positif dan negatif, senyawa antibakteri tersebut bekerja dengan cara masuk ke dalam sel dan merusak struktur dinding sel bakteri (Fardiaz, 1995). Kopi mengandung senyawa antioksidan yang berperan terhadap manfaat kesehatan, termasuk perlindungan dari berbagai penyakit, seperti penyakit jaringan lunak yang terjadi karena adanya invasi bakteri, virus, antigen, dan lain-lain. Senyawa antioksidan tersebut antara lain adalah kafein, fenol dan asam klorogenat (Winarsi, 2007). Kopi robusta dikenal sebagai kopi yang tahan terhadap berbagai penyakit. Suhu yang cocok untuk pertumbuhan tanaman kopi robusta adalah 21-24° C (Karya, 2018).

Untuk menarik suatu senyawa dalam suatu tanaman perlu dilakukan dengan metode ekstraksi, metode yang digunakan adalah metode ekstraksi maserasi. Penelitian yang telah dilakukan oleh Tanauma *et al* (2016) menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% biji kopi robusta memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri terhadap

Bakteri *E.coli* dengan konsentrasi 10% (22,5 mm), 50% (24 mm), 100% (27 mm). Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Yaqin dan Nurmilawati (2015) Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* terhambat setelah pemberian ekstrak etanol 96% kopi robusta dengan konsentrasi 100% (7.95 mm), 50% (5.68 mm), 25% (4.14 mm) dan 12,5% (3.69 mm). Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas biji kopi robusta terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhimurium*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan Maret 2019 di Laboratorium Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Bogor dan Departemen Biologi Institut Pertanian Bogor Dramaga.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah Alat-alat gelas, inkubator, pengayak mesh 40, krus, cawan petri (Pyrex®), oven (Mettler®), botol kaca warna coklat, *rotary evaporator* (Ika® hb 10 basic), grinder (Philips®), autoklaf, kain batis, lemari pendingin, kertas cakram, ose, bunsen, *waterbath* (Eyela®), pinset, tanur (Ney®), neraca analitik (Lab pro®), LAF (*laminar air flow*), *Vortex Mixer*, desikator.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kopi robusta (*Coffea canephora P*), Kultur Murni *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhimurium*, etanol 96%, media *Nutrient Agar* (NA), *aquadest*, asam klorida 2N, pereaksi bouchardat, dragendorf, Mayer, Serbuk magnesium (Mg) dan larutan besi (III) klorida, kloramfenikol 10 ppm, NaCl 0,9%.

Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta

Biji kopi hijau atau *green bean coffee* masing-masing disortir dan dibersihkan dari kotoran. Setelah itu biji kopi di grinder

hingga menjadi simplisia serbuk kasar. Lalu, diayak dengan ayakan mesh 40 dan ditimbang untuk mendapatkan bobot akhir serbuk simplisia. Disimpan didalam wadah yang kering, bersih dan kedap udara.

Metode maserasi dilakukan dengan merendam serbuk biji kopi robusta sebanyak 500 g dalam 5.000 ml pelarut etanol 96% (1:10), kemudian dilakukan pengocokan setiap 6 jam sekali dalam waktu 24 jam, lalu disaring untuk memisahkan ampas dan filtrat, kemudian ampas tersebut dimaserasi menggunakan etanol 96%, proses maserasi dilakukan selama 3 hari, kemudian hasil masing-masing filtrat disatukan dan dievaporasi menggunakan *Rotary Evaporator* pada suhu 45° C kemudian dikentalkan menggunakan *waterbath* pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1986).

Uji Fitokimia

Pada uji fitokimia, dilakukan dengan cara kualitatif pada ekstrak dan serbuk biji kopi robusta yang bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu tanin, saponin, flavonoid, dan alkaloid.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri ekstrak biji kopi hijau terlebih dahulu dilakukan dengan cara mensterilkan alat dan bahan, penyiapan media agar, penyiapan bakteri uji, peremajaan bakteri, dan penentuan aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram.

Penetapan Konsentrasi Hambat Minimum

Penentuan konsentrasi hambat minimum dilakukan dengan cara metode dilusi agar.

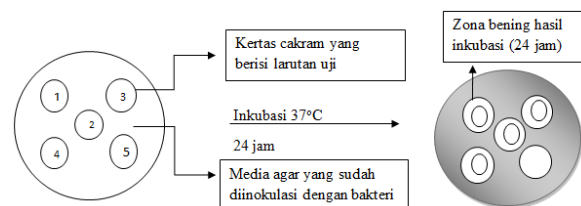
1. Media agar didinginkan kemudian dimasukkan kedalam cawan petri masing-masing sebanyak 20 mL
2. Bakteri uji disiapkan, dibuat konsentrasi 10⁶ sebanyak 0,2 ml, pada masing-masing konsentrasi disebar diatas permukaan agar

dan ekstrak biji kopi hijau dari masing-masing konsentrasi 4%, 10%, 17%, dan 2,5%. Sebanyak 1 ml dimasukkan kedalam masing-masing cawan petri tersebut kemudian homogenkan. Selanjutnya, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

3. Setelah diinkubasi dilihat dan diamati adanya pertumbuhan koloni bakteri atau tidak. Konsentrasi terendah dari antibakteri yang tidak terjadi pertumbuhan bakteri pada cawan petri merupakan konsentrasi hambat minimum (KHM).

Penetapan Lebar Daerah Hambat

Pengujian aktivitas ekstrak biji kopi hijau bertujuan untuk mengetahui besarnya daerah hambatan akibat ekstrak biji kopi hijau terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhimurium* dengan metode difusi kertas cakram. Pengujiannya dengan cara mencampur 0,2 ml suspensi bakteri dengan konsentrasi 10⁶ hasil pengenceran dan ± 15 ml media *nutrient agar* dimasukkan kedalam cawan petri, kemudian digerakkan melingkar untuk menyebarkan bakteri secara merata. Setelah agak memadat, diatasnya diletakkan kertas cakram yang mengandung ekstrak biji kopi hijau. Konsentrasi yang digunakan yaitu : 25%, 50%, 75%. *Aquadest* sebagai kontrol negatif dan Kloramfenikol 10 ppm sebagai kontrol positif, kemudian cawan petri tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Pengujian aktivitas ini dilakukan untuk masing-masing perlakuan dengan 4 kali pengulangan. Setelah diinkubasi diamati dan diukur lebar daya hambat.



Gambar 1. Kertas Cakram pada media *Nutrient Agar* (NA)

Keterangan

- 1,2,3 = Kertas cakram yang mengandung ekstrak biji hijau kopi robusta dalam %
3 = Kloramfenikol (Kontrol Positif)
4 = Aquadest (Kontrol Negatif)

Parameter Penelitian

- Penetapan kadar air dan kadar abu simplisia dan ekstrak
- Identifikasi senyawa fitokimia meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin secara kualitatif pada ekstrak etanol 96%
- Penentuan (KHM) ekstrak etanol 96% biji hijau kopi robusta terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* & *Salmonella typhimurium*
- pengukuran (LDH) ekstrak etanol 96% biji hijau kopi robusta dengan cara mengukur diameter zona hambat yang terbentuk terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* & *Salmonella typhimurium*

Analisis Data

Data LDH yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan 3 kali pengulangan sidik ragam (Analysis Varian/ANOVA) Rancangan Acak Lengkap kemudian analisis dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan masing-masing konsentrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji organoleptik dari serbuk biji kopi robusta yaitu berwarna hijau, bau aromatik khas dan memiliki rasa yang pahit. Pelarut yang digunakan adalah pelarut etanol 96%, karena etanol 96% bersifat seperti cairan sel yang dapat mengikat semua komponen kimia yang terdapat dalam biji kopi robusta. Hasil ekstraksi biji kopi robusta dengan maserasi menggunakan pelarut 96% menghasilkan ekstrak kental 42,74 g.



Gambar 2. Simplisia (A) dan Ekstrak (B) Biji Hijau Kopi Robusta

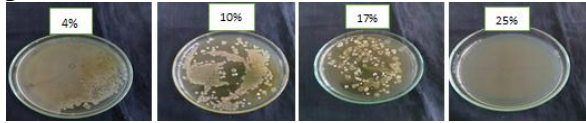
Randemen yang diperoleh pada ekstrak biji hijau kopi robusta adalah sebesar 8,51%. Menurut Pratama (2017) bahwa rendemen ekstrak kental biji hijau kopi arabika dengan menggunakan metode maserasi adalah sebesar 14,16%. Rendemen kecil tersebut karena pengaruh perbedaan tempat pengambilan bahan baku sehingga mempengaruhi metabolit sekunder.

Pengujian fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terdapat dalam tanaman dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Hasil uji fitokimia ekstrak biji kopi robusta yang didapatkan yaitu positif mengandung alkaloid, tanin, saponin dan flavonoid.

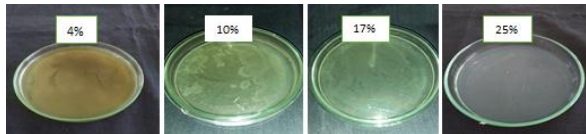
Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Uji KHM merupakan salah satu uji yang digunakan untuk mengetahui daya hambat minimum suatu zat bioaktif dalam menghambat pertumbuhan suatu jenis bakteri uji. Konsentrasi hambat minimum dari zat bioaktif terhadap mikroba digunakan untuk mengetahui sensitivitas dari mikroba terhadap zat bioaktif. Penentuan konsentrasi hambat minimum dilakukan dengan metode dilusi agar. Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi, 2008). Pengujian KHM ekstrak biji hijau kopi robusta terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*

dan *Salmonella typhimurium* yang menggunakan konsentrasi 4%, 10%, 17% dan 25%. Hasil pengujian KHM dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Hasil Uji KHM Ekstrak Kental biji hijau kopi robusta Terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae*, KHM Pada Konsentrasi 25%



Gambar 14. Hasil Uji KHM Ekstrak Kental biji hijau kopi robusta Terhadap Bakteri *Salmonella typhimurium*, KHM Pada Konsentrasi 25%

Hasil pengujian KHM ekstrak biji hijau kopi robusta terhadap bakteri *Salmonella typhimurium* dan *Shigella dysenteriae* yang menggunakan konsentrasi 4%, 10%, 17% dan 25%. Berdasarkan hasil pengujian konsentrasi hambat minimum ekstrak biji hijau kopi robusta terhadap *Salmonella typhimurium* dan *Shigella dysenteriae*, menunjukkan bahwa pada konsentrasi 4%, 10% dan 17% masih menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dan pada konsentrasi 25% menunjukkan hasil yang bening, yang artinya sudah tidak ada lagi pertumbuhan bakteri. Konsentrasi tersebut digunakan sebagai acuan awal konsentrasi ekstrak dalam pengujian Lebar Daerah Hambat (LDH). Semakin sedikit jumlah koloni bakteri pada media agar maka semakin baik aktivitas antibakterinya.

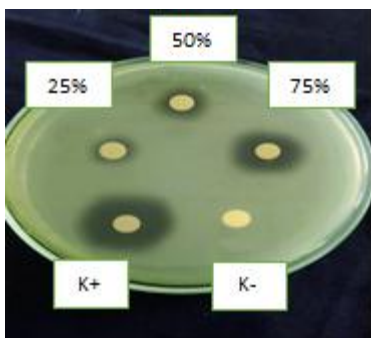
Pengujian Lebar Daerah Hambat (LDH)

Pengujian LDH menggunakan metode kertas cakram. Metode kertas cakram merupakan metode yang biasa digunakan untuk menguji aktivitas antimikroba suatu antibiotik terhadap mikroorganisme patogen penyebab penyakit. Kepekaan mikroorganisme patogen terhadap antibiotik terlihat dari ukuran zona bening yang

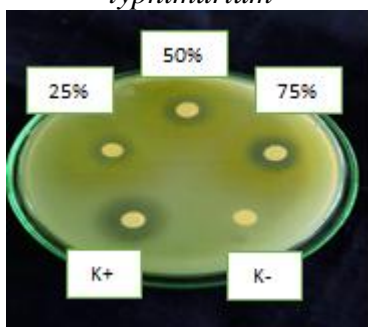
terbentuk (Cappucino & Sherman, 2001). Parameter yang digunakan adalah zona bening, yaitu area bening di sekeliling kertas cakram sebagai indikasi tidak adanya atau terhambatnya pertumbuhan mikroorganisme akibat ekskresi zat antimikroba oleh kompetitornya (Byod, 1995). Ada 3 perlakuan yang diamati pada pengujian ini, diantaranya kontrol negatif (Aquadest), kontrol positif (Kloramfenikol) dan ekstrak (konsentrasi 25%, 50% dan 75%). Dimana Kontrol negatif adalah kontrol yang tidak memiliki daya antibakteri sedangkan kontrol positif adalah kontrol yang memiliki aktivitas antibakteri sebagai obat dipasaran yang biasa digunakan oleh masyarakat. Hasil lebar daerah hambat ekstrak biji kopi robusta dapat dilihat pada Tabel 1.

Sampel	Konsentrasi	LDH (mm)	Kategori
<i>Shigella dysenteriae</i>	25%	3,5 ^b	Lemah
	50%	6 ^c	Sedang
	75%	9,5 ^d	Sedang
	K+	11,25 ^e	Kuat
	K-	0 ^a	Tidak memiliki daya antibakteri
	<i>Salmonella typhimurium</i>	25%	4,25 ^b
50%		7 ^c	Sedang
75%		10 ^d	Sedang
K+		12 ^e	Kuat
K-		0 ^a	Tidak memiliki daya antibakteri

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf superskrip yang sama pada kolom maupun baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata. Aktivitas Antibakteri : Daerah hambat > 20mm sangat kuat, 10-20mm kuat, 5-10mm sedang, < 5mm lemah (Davis dan Stout, 1971).



Gambar 5. Hasil Uji LDH Ekstrak Biji Kopi Robusta Terhadap Bakteri *Salmonella typhimurium*



Gambar 6. Hasil Uji LDH Ekstrak Biji Kopi Robusta Terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae*

Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak biji kopi robusta memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhimurium* dan *Shigella dysenteriae*. Hal ini ditandai dengan terbentuknya zona bening pada sekitar cakram yang dapat dihitung nilai lebar daerah hambatnya. Semua konsentrasi uji dan kontrol positif memiliki aktivitas antibakteri sedangkan kontrol negatif tidak memiliki aktivitas antibakteri.

Pada ekstrak kental biji kopi robusta yang menghambat bakteri *Shigella dysenteriae*, ekstrak dengan konsentrasi 25% memiliki nilai LDH sebesar 3,5mm, pada konsentrasi 50% memiliki nilai LDH sebesar 6mm, konsentrasi 75% memiliki nilai LDH sebesar 9,5mm, sedangkan pada kontrol positif (Kloramfenikol) memiliki nilai LDH paling besar yaitu 11,25mm dan kontrol

negatif tidak memiliki nilai LDH. Ekstrak dengan konsentrasi 75% memiliki nilai LDH yang paling baik dibandingkan dengan konsentrasi lain dan menunjukkan hasil yang hampir sama dengan atau mendekati nilai LDH dari kontrol positif. Semakin besar konsentrasi yang digunakan dalam pengujian maka semakin besar nilai LDH yang didapatkan. Hal ini menunjukkan bahwa dalam konsentrasi yang tinggi terdapat senyawa antibakteri yang tinggi pula.

Pada ekstrak kental biji kopi robusta yang menghambat bakteri *Salmonella typhimurium*, ekstrak dengan konsentrasi 25% memiliki nilai LDH 4,25mm, konsentrasi 50% memiliki nilai LDH 7mm dan pada konsentrasi 75% memiliki nilai LDH 10mm. Kontrol positif (Kloramfenikol) menunjukkan hasil yang berbeda dengan konsentrasi uji, nilai LDH kontrol positif yaitu 12mm. Semakin besar konsentrasi yang digunakan maka semakin besar nilai LDH yang didapatkan. Nilai LDH pada ekstrak biji kopi robusta tergolong sedang karena menggunakan pelarut etanol 96% yang merupakan pelarut semipolar yang dapat menarik senyawa yang sifatnya polar dan non polar.

Berdasarkan hasil LDH dilakukan uji statistik dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Hasil uji statistik menunjukkan bahwa konsentrasi yang digunakan berpengaruh pada aktivitas antibakteri. Hasil uji *Duncan* pada ekstrak kental terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* maupun *Salmonella typhimurium* menunjukkan bahwa setiap perlakuan memiliki hasil yang berbeda nyata. Artinya pada semua konsentrasi maupun kontrol positif memiliki pengaruh yang berbeda

terhadap aktivitas antibakteri. Hasil uji statistik dapat dilihat pada Lampiran 6.

Tanaman biji kopi robusta telah terbukti memiliki aktivitas antimikroba (Pratiwi, 2018). Adanya aktivitas antibakteri pada tanaman ini dikarenakan memiliki kandungan senyawa alkaloid, tanin, saponin, dan flavonoid (Pratiwi, 2018). Flavonoid dapat berperan sebagai antibakteri dapat mengubah sifat fisik dan kimia sitoplasma yang mengandung protein dan mendenaturasi dinding sel bakteri, merusak sel bakteri dengan cara berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen. Aktivitas ini dapat mengganggu fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif dan pengendalian susunan protein (Pelczar dan Chan, 1988). Tannin bekerja sebagai antibakteri sebagai sintesis asam nukleat dengan mendenaturasi protein sel DNA merusak membran sel. Tanin memiliki aktifitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesin sel mikroba juga menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada pada lapisan dalam sel. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Pelczar, 1986). Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri melalui penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan lisis pada dinding sel bakteri sehingga pertumbuhan bakteri terhambat dan bahkan menyebabkan kematian pada bakteri (Lamonthe *et al.* 2009). Mekanisme antibakteri senyawa tanin yaitu senyawa ini berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan, lalu mengikat membran sitoplasma dan mengganggu dan mengurangi

kestabilan itu. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Nuria *et al.* 2009). Prasetyo dkk (2008) menyatakan bahwa saponin merupakan senyawa metabolik sekunder yang berfungsi sebagai antiseptik sehingga memiliki kemampuan antibakteri. Adanya zat antibakteri tersebut akan menghalangi pembentukan atas pengangkutan masing-masing komponen ke dinding sel yang mengakibatkan lemahnya struktur disertai dengan penghilangan dinding sel dan pelepasan isi sel yang akhirnya mengakibatkan kematian maupun menghambat pertumbuhan sel bakteri tersebut.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Konsentrasi ekstrak biji hijau kopi robusta yang paling optimal sebagai antibakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella typhimurium* pada konsentrasi 75% memiliki nilai Lebar Daerah Hambat (LDH) yaitu pada bakteri *Salmonella typhimurium* rata-rata sebesar 10mm dan *Shigella dysenteriae* rata-rata sebesar 9,5mm.

Saran

Perlu dilakukan perbandingan metode ekstraksi dengan pelarut lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Byod, R. 1995. *Basic Medical Microbiology Five edition*. Boston: Little Brown Company Inc : Boston.
- Cappucino, J. and Sherman, N. 2001. *Microbiology; A laboratory Manual 2nd Edition*. The Benjamin Cummings Publishing Company. Rockland

- Community College: State University of New York.
- Fardiaz, S. 1995. Antimicrobial Activity of Coffe (*Coffea Robusta*) Extract. *ASEAN Food Journal*; 3(10) : 103-106
- Karya, M T. 2018. *Rahasia Sukses Budidaya kopi*. Bandung: Nuansa Tani
- Pelczar, M, J., Chan E,C,S. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta : Universitas Indonesia Press
- Prasetyo. 2008. *Aktivitas Sediaan Gel Ekstrak Batang Pohon Pisang Ambon dalam Proses Penyembuhan Luka Pada Mencit*. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan IPB
- Pratama, F. 2017. Perbandingan Metode Ekstraksi Terhadap Kadar Alkaloid Total Ekstrak Etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica L*). *Skripsi*. Bogor: Universitas Pakuan
- Pratiwi, E. 2018. Aktivitas Antibakteri Dari Serbuk Efervesen Ekstrak Kopi Robusta (*Coffea canephora P.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Bogor: Universitas pakuan
- Pratiwi, T . 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga
- Rahmawati, M. 2015. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Rimpang Pacing (*Costus spiralis*) Terhadap Bakteri *Eschericia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* Serta Fungi *Candida Albicans*. *Skripsi*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah
- Tanauma, H., Citraningtyas, G., Lolo W. 2016. Aktivitas antibakteri ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 5 (4) : 2-9
- Utami F, N., Wigati, I., Pratiwi E, Nissa F. 2018. Karakteristik Fitokimia dan Aktivitas antioksidan biji kopi robusta (*Coffea canephora pierre*) dari Bogor, Bandung dan Garut dengan Metode DPPH (1,1-dyphenyl-2-picryldrazyl). *Fitofarmaka*. 8:1
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius
- Yaqin, M., Nurmilawati, M. 2015. *Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta (Coffea robusta) sebagai Penghambat Pertumbuhan Staphylococcus aureus*. Kediri :Universitas Nusantara PGRI Kediri