

## **AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli***

**Hizkia Alesta Tanauma<sup>1)</sup>, Gayatri Citraningtyas<sup>1)</sup>, Widya Astuty Lolo<sup>1)</sup>**

<sup>1)</sup>Progam Studi Farmasi Fakultas MIPA UNSRAT Manado, 95115

### **ABSTRACT**

*The purpose of this study is to test the antibacterial activity of robusta coffee seed extract against bacterium *Escherichia coli*. The extraction method using maceration with solvent ethanol 96%. Antibacterial activity test was done by using pitting method. The results showed that robusta coffee seed extract has antibacterial activity. Effective concentration to inhibit bacterium *Escherichia coli* extract at concentration of 10%, 50% and 100%. The results showed that the greater concentration, the greater the inhibitory zones are formed.*

**Keywords :** *Coffea canephora, Escherichia coli, antibacterial, and agar diffusion*

### **ABSTRAK**

Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak biji kopi robusta terhadap bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 10%, 50% dan 100%. Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Pengujian antibakteri menggunakan metode difusi agar dengan cara sumuran. Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak biji kopi robusta dapat menghambat bakteri *Escherichia coli*. Konsentrasi 10%, 50% dan 100% ketiganya memberikan zona hambat yang berbeda. yaitu semakin besar konsentrasi eksrak biji kopi robusta maka semakin besar zona hambat yang terbentuk.

**Kata kunci :** *Coffea canephora, Escherichia coli, antibakteri, difusi agar.*

.

## PENDAHULUAN

Bakteri merupakan mikroorganisme yang tidak dapat dilihat dengan mata telanjang, tetapi hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop (Radji, 2011). Bakteri patogen lebih berbahaya dan menyebabkan infeksi baik secara sporadik maupun endemik, antara lain *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Djide, dkk. 2008).

Penelitian zat yang berkhasiat sebagai antibakteri perlu dilakukan untuk menemukan produk antibiotik baru yang berpotensi untuk menghambat atau membunuh bakteri yang resisten antibiotik dengan harga yang terjangkau. Salah satu alternatif yang dapat ditempuh adalah memanfaatkan zat aktif pembunuh bakteri yang terkandung dalam tanaman obat. Widjayanti (1999) dalam Nur Iman (2009) menjelaskan salah satu tanaman yang secara empiris digunakan sebagai obat antibakteri adalah kopi.

Kopi robusta (*Coffea canephora*) banyak ditanam di Afrika, India dan Indonesia, komoditas kopi robusta di Indonesia sendiri sangat tinggi hingga menguasai pasar nasional, tapi hanya menguasai 30% pasar dunia jika dibandingkan dengan komoditas kopi arabika yang menguasai 70% pasar dunia. Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Yaqin dan Nurmilawati (2015) tentang pengaruh ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* menyatakan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* akan terhambat setelah pemberian ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*)

dengan konsentrasi minimal sebesar 12,5% dan daya hambat yang paling efektif adalah dengan konsentrasi 100%. Penelitian yang dilakukan oleh Chamidah (2012), menyatakan ekstrak biji kopi robusta mempunyai daya antibakteri terhadap pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* pada konsentrasi 100%, 50%, dan 25%. Atas dasar latar belakang tersebut maka pelu dilakukan penelitian tentang Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Tujuan dari penelitian ini yaitu menguji aktivitas antibakteri ekstrak biji kopi robusta terhadap bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 10%, 50%, dan 100%.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan antara lain : erlenmeyer, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, penangas air, blender, ayakan mesh 65, kaca arloji, timbangan analitik, labu ekstraksi, batang pengaduk, cawan petri, jarum ose, pinset, inkubator, *laminair air flow*, termometer, pencadang, autoklaf, mikropipet, mistar berskala, *rotary evaporator*, dan alat fotografi.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu biji kopi robusta, bakteri uji (*Escherichia coli*), akuades steril, etanol 96%, tetrasiklin, Nutrient Agar (NA),  $H_2SO_4$  0,36 N,  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  1,175%, NaCl 0,9%, kertas saring, kertas label dan aluminium foil.

### **Pengambilan dan perlakuan sampel**

Sampel kopi robusta diambil dari Kabupaten Kepulauan Talaud 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 sampel**

Ekstraksi biji kopi robusta dilakukan dengan metode maserasi. Sebanyak 120 g serbuk simplisia biji kopi dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian direndam dengan larutan etanol 96% sebanyak 225 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 1 dan ampas 1. Ampas yang ada kemudian dimerasasi dengan larutan etanol 96% sebanyak 75 mL, ditutup dengan aluminium foil dan dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 2 hari, sampel tersebut 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. Ekstrak kental yang dihasilkan dibiarkan pada suhu ruangan hingga seluruh pelarut etanol menguap. Ekstrak ditimbang dan disimpan

dalam wadah gelas tertutup sebelum digunakan untuk pengujian.

### **Pembuatan larutan kontrol**

Larutan kontrol positif dibuat dengan cara ditimbang tetrasiplin 500 mg sebanyak 0,02 g, kemudian dilarutkan dengan akuades dan dicukupkan volumenya hingga 100 mL.

### **Pembuatan larutan uji**

Dibuat larutan uji 10%; 50%; dan 100% dengan cara ditimbang 0,1 g; 0,5g; dan 1 g ekstrak biji kopi robusta kemudian dicukupkan dengan akuades sampai 10 mL.

### **Pembuatan media**

Nutrient Agar (NA) sebanyak 0,56 g dilarutkan dalam 20 mL akuades (28 g/1000 mL) menggunakan erlenmeyer. Setelah itu dihomogenkan dengan stirrer di atas penangas air sampai larut. Media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media Agar digunakan untuk inokulasi bakteri.

Media dasar dibuat dengan cara ditimbang Nutrient Agar (NA) sebanyak 2,3 g lalu dilarutkan dalam 100 mL akuades (23 g / 1000 mL) menggunakan erlenmeyer. Sedangkan media pemberian dibuat dengan cara ditimbang 5,75 g NA, lalu dilarutkan dalam 250 mL akuades (23 g / 1000 mL) menggunakan erlenmeyer. Setelah itu, masing-masing media dihomogenkan dengan stirrer di atas penangas air sampai mendidih. Media yang sudah homogen ini disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dasar dan media pemberian digunakan dalam pembuatan media pengujian sebagai lapisan dasar dan lapisan kedua.

### **Kultur bakteri**

Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar dengan cara menggores. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### **Pembuatan larutan McFarland**

Larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,36 N sebanyak 99,5 mL dicampurkan dengan larutan  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,175% sebanyak 0,5 mL dalam erlenmeyer. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji.

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan jarum ose steril lalu disuspensikan kedalam tabung yang berisi 10 mL larutan  $\text{NaCl}$  0,9% hingga di peroleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland.

Lapisan dasar dibuat dengan menuangkan masing-masing 10 mL NA dari media dasar ke dalam 9 cawan petri, lalu dibiarkan sampai memadat. Setelah memadat, pada permukaan lapisan dasar diletakkan 3 pencadang baja yang diatur sedemikian rupa jaraknya agar daerah pengamatan tidak saling bertumpuh. Kemudian, suspensi bakteri dicampurkan ke dalam media pemberian NA. Setelah itu, dituangkan 15 mL campuran suspensi dan media pemberian tersebut ke dalam tiap cawan petri yang diletakkan pencadang sebagai lapisan kedua. Selanjutnya, pencadang diangkat secara aseptik dari cawan petri, sehingga akhirnya terbentuklah sumur-sumur yang akan digunakan dalam uji antibakteri.

#### **Pengujian ekstrak terhadap bakteri**

Larutan uji ekstrak biji kopi robusta dengan berbagai konsentrasi (10%, 50%,

dan 100%); aquades sebagai kontrol negatif; larutan tetrasielin sebagai kontrol positif, masing-masing diteteskan pada sumur yang berbeda. Kemudian cawan petri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

#### **Pengamatan dan pengukuran zona hambat**

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam masa inkubasi. Daerah bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lainnya yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan mistar berskala dengan cara diameter keseluruhan dikurangi diameter sumuran 7 mm. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan menurut David & Stout (1971).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Ekstraksi**

Seruk simplisia biji kopi dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian direndam dengan larutan etanol 96% sebanyak 225 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 1 dan ampas 1. Ampas yang ada kemudian diekstraksi. Proses ekstraksi dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi. Metode maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam maupun bahan laut, karena dengan perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel

karena perbedaan tekanan antara di dalam dan luar sel, sehingga metabolit sekunder akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat di atur perendaman yang dilakukan. Kelebihan metode ini, yaitu untuk menghindari kerusakan zat aktif akibat pemanasan yang berlebih (Dwijendra, 2014).

Menurut Suryanto (2012), pemilihan pelarut pada umumnya dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, selektivitas, kelarutan, dan titik didih. Untuk pelarut ekstraksi sendiri digunakan etanol. Pelarut etanol merupakan pelarut yang tidak beracun, dan bersifat universal yang cocok untuk mengekstrak semua golongan senyawa metabolit sekunder. Selain itu pelarut etanol mempunyai sifat selektif, dapat bercampur dengan air dengan segala perbandingan, ekonomis, mampu mengekstrak sebagian besar senyawa kimia yang terkandung dalam simplisia seperti alkaloid, minyak atsiri, glikosida, kurkumin, klorofil, steroid, dan flavonoid.

Hasil maserasi terhadap kopi robusta berupa filtrat berwarna coklat kehitaman sebanyak 100 g. Selanjutnya filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga memperoleh ekstrak kental sebanyak 83,3 g berwarna coklat kehitaman.

### **Uji Aktivitas Antibakteri**

Pada uji aktivitas antibakteri ekstrak biji kopi robusta yang menggunakan metode difusi agar (difusi Kirby-Bauer yang telah dimodifikasi) dengan cara sumuran menjadi pilihan dalam mencapai tujuan klinis yang sering digunakan dalam uji kepekaan

antibiotik (Loing, 2016). Hasil uji aktivitas antibakteri diperoleh melalui pengamatan yang dilakukan selama 1×24 jam masa inkubasi dengan 3 kali pengulangan untuk masing-masing bakteri. Setelah masa inkubasi terbentuk daerah bening di sekitar sumuran yang berbentuk lingkaran. Daerah bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif atau bahan antibakteri lainnya yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tetrasielin. Fungsi dari tetrasielin ialah sebagai kontrol dari zat uji dengan membandingkan diameter daerah hambat yang terbentuk, sedangkan kontrol negatif yang digunakan ialah air. Fungsi dari kontrol negatif ialah untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pelarut terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli* sehingga dapat diketahui bahwa yang mempunyai aktivitas antibakteri adalah zat uji bukan pelarut.

Hasil uji aktivitas antibakteri dan hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak kopi robusta *Coffea robusta* terhadap bakteri *Escherchia coli* dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil pengukuran diameter zona hambat melalui pengukuran dengan mistar berskala dapat diketahui bahwa ekstrak biji kopi robusta memiliki diameter yang sama dengan tetrasielin dalam menghambat bakteri *Escherchia coli*. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 1 dengan perhitungan rata-rata diameter antara tetrasielin dengan kopi robusta.

Tabel 1. Hasil pengukuran rata-rata diameter zona hambat (mm) terhadap bakteri uji *E. coli*

Konsentrasi (%)	Kontrol		Ekstrak Biji
	Negatif (-) (mm)	Positif (+) (mm)	
10	0	21	22,5
50	0	25	24
100	0	30	27
Rata-rata	0	25	24

Menurut Davis (1971), kriteria kekuatan daya antibakteri sebagai berikut : diameter zona hambat 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat dan zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat. Berdasarkan kriteria tersebut, maka daya antibakteri ekstrak kopi robusta pada bakteri *E.coli* dengan konsentrasi ekstrak 10% (22,5 mm), 50% (24 mm), 100% (27 mm) termasuk sangat kuat. Sehingga dapat diketahui bahwa konsentrasi ekstrak 10%, 50% dan 100% merupakan konsentrasi efektif untuk menghambat bakteri *E.coli*.

Kafein merupakan senyawa alkaloid yang berwujud kristal berwarna putih. Kafein adalah satu kandungan dalam biji kopi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri, dimana kopi robusta mempunyai kandungan sebanyak 1,6%-2,4% (Widyotomo, dkk. 2007). 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. Reaksi ini terjadi karena secara kimia suatu senyawa yang bersifat basa akan bereaksi dengan senyawa asam, dalam hal ini adalah asam amino. Reaksi ini mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino karena sebagian besar asam amino telah bereaksi dengan gugus basa dari senyawa alkaloid. Perubahan susunan asam amino ini jelas akan merubah susunan rantai DNA pada inti sel yang semula memiliki susunan asam dan basa yang saling berpasangan. Perubahan susunan rantai asam amino pada DNA akan menimbulkan perubahan keseimbangan genetik sehingga DNA bakteri akan mengalami kerusakan. Dengan adanya kerusakan pada DNA tersebut inti sel bakteri akan mengalami kerusakan. Hal ini karena DNA merupakan komponen utama penyusun inti sel. Kerusakan DNA pada inti

sel bakteri ini juga akan mendorong terjadinya lisis pada inti sel bakteri. Lisisnya inti sel bakteri akan menyebabkan juga kerusakan sel pada bakteri karena inti sel merupakan pusat kegiatan sel. Kerusakan sel pada bakteri ini lama kelamaan akan membuat sel-sel bakteri tidak mampu melakukan metabolisme sehingga juga akan mengalami lisis. Dengan demikian bakteri akan menjadi inaktif dan hancur (Gunawan, 2009). Hal ini diasumsikan bahwa cara kerja kafein murni dalam menghambat pertumbuhan bakteri sama dengan kafein yang berada dalam ekstrak biji kopi robusta.

Asam volatil merupakan asam lemak rantai pendek dan memiliki aktivitas meningkatkan daya hambat pertumbuhan bakteri, karena lebih mampu menembus dinding sel bakteri daripada asam lemak rantai panjang (Widyotomo, dkk. 2007).

Komponen lain selain kafein yang terdapat dalam biji kopi Robusta yang dilaporkan juga memiliki aktifitas antibakteri adalah senyawa fenol, trigonelline dan asam klorogenik (Fardiaz, 1995). Senyawa fenol merupakan flavonoid yang terdapat dalam biji kopi. Aktifitas biologis senyawa flavonoid dilakukan 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. Mekanisme aktifitas biologis oleh senyawa flavonoid ini berbeda dengan yang dilakukan oleh senyawa alkaloid, dimana senyawa flavonoid dalam merusak sel bakteri memanfaatkan perbedaan kepolaran antara lipid penyusun sel bakteri

dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid. Sedangkan pada senyawa alkaloid memanfaatkan sifat reaktif gugus basa pada senyawa alkaloid untuk bereaksi dengan gugus asam amino pada sel bakteri (Gunawan, 2009).

## **KESIMPULAN**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak biji kopi robusta dapat menghambat bakteri *Escherichia coli*. Aktivitas antibakteri ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 10% menghasilkan diameter zona hambat sebesar 22,5 mm, Aktivitas antibakteri ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 50% menghasilkan diameter zona hambat sebesar 24 mm dan Aktivitas antibakteri ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 100% menghasilkan diameter zona hambat sebesar 27 mm. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak biji kopi robusta maka zona hambat yang terbentuk akan semakin besar.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Budiman, H. 2012. *Prospek Tinggi Bertanam Kopi*. Pustaka Baru Press. Yogyakarta.
- Chamidah, S. 2012. *Daya Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (Coffea canephora) Terhadap Pertumbuhan Porphyromonas gingivalis* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jember.
- Davis, W.W., T.R. Stout. 1971. *Disc Plate Methods of Microbiological*

- Antibiotic Assay. *Microbiology* **22**: 659-665.
- Djide, N., Sartini. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Farmasi*. Lephas UNHAS. Makassar.
- Dwijendra, I.M., D.S. Mewengkang, F.S. Wehantow. 2014. Aktivitas Antibakteri dan Karakteristik Senyawa Fraksi Spons *Lamellodysidea herbacea* yang Diperoleh dari Teluk Manado. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*. **4** : 2302 - 2493.
- Fardiaz, S. 1995. *Antimicrobial Activity of Coffee (Coffea robusta) Extract*. ASEAN Food Journal **10(3)**: 103 – 106.
- Gunawan, I.W.A. 2009. *Potensi Buah Pare (Momordica Charantia L) sebagai Antibakteri Salmonella typhimurium*. Denpasar: Progam Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Mahasaraswati.
- Kusuma, S.A.F.. 2015. *Makalah Escherichia coli*. Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran. Bandung
- Loing, H.N.Q. 2016. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Dan Fraksi Karang Lunak (Lobophytum sp) Terhadap Bakteri Escherichia coli Dan Staphylococcus aureus* [Skripsi]. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi. Manado.
- Najiyati., Danarti. 2004. *Kopi Budidaya dan Penaganan Pascapanen*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Nur, I.M. 2009. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Bunga Pepaya Jantan (Carica papaya L) Terhadap Escherichia coli dan Staphylococcus aureus Multiresisten Antibiotik* [Skripsi]. Fakultas Farmasi UMS Surakarta.
- Post, K.W., G.J. Songer. 2005. *Microbiology: Bacterial and Fungal Agent of Animal Disease*. Elsevier saunders. *Microbiology* **19**:134-144.
- Quinn, P.J., B.K. Markey., M.E. Carter., W.J. Donelly., F.C. Leonard. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Iowa: Blackwell Publishing.
- Radji, M. 2011. *Mikrobiologi*. Buku Kedokteran ECG. Jakarta.
- Rahardjo, P. 2012. *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Ridwansyah. 2003. *Pengolahan Kopi*. Jurusan Teknologi Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Sumatra Utara : USU Digital Library. Sumatra Utara.
- Songer, J.G., K.W. Post. 2005. *Veterinary Microbiology Bacterial and Fungal Agent of Animal Disease*. USA: Elsevier Saunders.
- Suryanto, E. 2012. *Fitokimia Antioksidan*. Penerbit Putra Media Nusantara. Surabaya.

- Suwanto., Y. Octavianty. 2010. *Budidaya Tanaman Perkebunan Unggulan.* Penebar Swadaya. Jakarta.
- Todar, K. 2008. *Staphylococcus aureus and Escherichia coli.* University of Wisconsin Madison Department of Bacteriology
- Wahyono, H. 2007. *Peran Mikrobiologi Klinik Pada Penanganan Penyakit Infeksi.* Makalah Pidato Pengukuhan Guru Besar Dalam Ilmu Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Widyotomo, S., M. Sri. (2007). Kafein: *Senyawa Penting Pada Biji Kopi.* Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. **Vol 23 (1):** 44-50.
- Wise, D.J. 2004. *Essential of Veterinary Bacteriology and Mycology. 6 th Ed.* Iowa: Blackwell Publishing.
- Yaqin, M.A., M. Nurmilawati. 2015. *Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta (Coffea robusta) sebagai Penghambat Pertumbuhan.* Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS.