



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SEDUHAN BUBUK KOPI
ROBUSTA TERHADAP RADIKAL SUPEROKSIDA
NEUTROFIL IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh:

Azizah Safaatin

NIM 141610101033

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2018



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SEDUHAN BUBUK KOPI
ROBUSTA TERHADAP RADIKAL SUPEROKSIDA
NEUTROFIL IN VITRO**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan studi pada Fakultas Kedokteran Gigi (S-1) dan
mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh:

Azizah Safaatin

NIM 141610101033

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Dengan setulus hati skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayah, berkah, dan kemudahan yang tak henti diberikan
2. Nabi Muhammad SAW teladan dunia dan akhirat bagi seluruh umat manusia.
3. Ayah Kiftirul Aziz dan Mama Luluk Zuroidah yang selalu mengalunkan doa tanpa henti, memberikan kasih sayang dan pengorbanan yang tiada batas
4. Dosen Pembimbing dan dosen penguji yang telah banyak memberikan ilmunya.

MOTO

“Sesungguhnya perbuatan baik itu dapat menghapus perbuatan buruk.”
(Terjemahan Q.S. Al Hud: 114)

“Barangsiapa keluar untuk mencari ilmu maka dia berada di jalan Allah”
(HR. Turmudzi)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Azizah Safaatin

NIM : 141610101033

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah berjudul “Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta Terhadap Radikal Superoksida Neutrofil In Vitro” adalah benar-benar karya sendiri, kecuali kutipan yang saya sebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai sikap ilmiah yang harus di junjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 2 Mei 2018

Yang menyatakan

Azizah Safaatin

NIM 141610101033

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SEDUHAN BUBUK
KOPI ROBUSTA TERHADAP RADIKAL
SUPEROKSIDA NEUTROFIL IN VITRO**

Oleh:

Azizah Safaatin

NIM 141610101033

Dosen Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes.

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Dessy Rachmawati, M.Kes, Ph.D

Dosen Penguji:

Dosen Penguji Ketua : drg. Tantin Ermawati, M.Kes.

Dosen Penguji Pendamping : drg. Dyah Indartin, M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta Terhadap Radikal Superoksida Neutrofil In Vitro” karya Azizah Safaatin telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

Hari, tanggal : Rabu, 2 Mei 2018

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota

drg. Tantin Ermawati, M.Kes
NIP. 198003222008122000

drg. Dyah Indartin Setyowati, M.Kes
NIP. 196809301997022001

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes.
NIP. 196109031986022001

drg. Dessy Rachmawati, M.Kes, Ph.D
NIP. 197612232005012001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pro.
NIP. 196901121999601001

RINGKASAN

Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta Terhadap Radikal Superoksida Neutrofil In Vitro; Azizah Safaatin; 141610101033, 63 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Neutrofil adalah leukosit yang berperan sebagai garis pertahanan pertama terhadap benda asing melalui fagositosis. Proses penghancuran benda asing dibantu oleh produk *respiratory burst* seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS). Salah satu jenis ROS adalah radikal superoksida (O_2^-). Produksi yang terus-menerus, tanpa diimbangi antioksidan yang memadai, dapat menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat merusak molekul biologi yaitu DNA, lemak dan asam amino protein yang dapat berujung pada kematian sel. Untuk mengurangi akibat tersebut, maka diperlukan antioksidan. Salah satu antioksidan tambahan adalah kopi robusta yang banyak dikonsumsi masyarakat dalam bentuk seduhan. Kopi robusta mempunyai kandungan polifenol yang mempunyai efek antioksidan yang tinggi. Tujuan penelitian ini untuk mengkaji aktivitas antioksidan seduhan kopi robusta terhadap radikal superoksida neutrofil in vitro.

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories*. Obyek penelitian adalah isolat neutrofil dari arah vena perifer orang sehat. Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2018 di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Variabel bebas pada penelitian ini adalah seduhan bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen produksi PTPN XII. Seduhan kopi dibuat dengan melarutkan 3 gr dan 6 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquades mendidih $90^\circ C$ kemudian letakkan pada *hotplate stirrer* dengan kecepatan 60 rpm selama 1 menit, lalu didinginkan pada suhu ruangan selama 3-4 menit dan disaring menggunakan *filter syringe*. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan yang ditunjukkan oleh berkurangnya jumlah neutrofil yang memproduksi radikal superoksida diamati menggunakan uji NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*). Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah isolat neutrofil yang diisolasi menggunakan metode *gradient density*, kemudian dosis perlakuan antigen *Streptococcus mutans*, dan prosedur laboratoris. Penelitian terdiri dari 3 kelompok yaitu kelompok kopi 1 (neutrofil, antigen bakteri, dan seduhan kopi 3 gr), kelompok kopi 2 (neutrofil, antigen bakteri, dan seduhan kopi 6 gr), dan kelompok kontrol (neutrofil dan antigen bakteri). Analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan menghitung jumlah sel yang mengandung deposit formazan berwarna biru keunguan pada membran sel dalam 100 sel neutrofil.

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata jumlah neutrofil yang memproduksi radikal superoksida pada kelompok kopi 1 sebesar 43,75, kelompok kopi 2 sebesar 34,50, dan kelompok kontrol sebesar 87,25. Hasil analisis data terdapat aktivitas antioksidan yang berbeda signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok kopi dan kontrol. Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa seduhan kopi robusta memiliki efek antioksidan yang baik pada radikal superoksida yang diproduksi oleh neutrofil. Hal ini diduga terkait dengan kandungan antioksidan yang banyak terdapat dalam kopi seperti polifenol, asam klorogenat, dan kafein.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta Terhadap Radikal Superoksida Neutrofil In Vitro”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tuaku tercinta; Ayahanda Kiftirul Aziz dan Ibunda Luluk Zuroidah yang tidak pernah putus memanjatkan doa, mencurahkan kasih sayang, memberikan restu, nasihat, semangat dan dukungan selama ini;
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes dan drg. Dessy Rachmawati, M.Kes, Ph.D selaku dosen pembimbing utama dan dosen pembimbing pendamping skripsi;
4. drg. Tantin Ermawati, M.Kes dan drg. Dyah Indartin Setyowati, M.Kes selaku dosen penguji utama dan dosen penguji anggota skripsi;
5. Muhammad Azam Muttaqin, Azmil Akmalia, Ita Mustainah, Muhammad Nasrullah, Nabil Azka Pratama, dan Muhammad Azzukhruf ; kakak-kakak, dan bayi-bayi penyemangat dan penghiburku, yang tidak ada hentinya mendoakan dan memberikan semangat;
6. Seluruh staf di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang membantu dalam penyelesaian administrasi penulisan skripsi ini;
7. Teknisi laboratorium Bioscience, laboratorium histologi, dan laboratorium mikrobiologi Universitas Jember yang telah membantu dalam proses penelitian;
8. Teman-teman tim penelitian: Prisca Vianda dan Dea Lili Anis terima kasih atas dukungan dan kerjasamanya yang luar biasa;

9. Sahabatku; Arina Nur Rahmah, Najla Irhamni Phasa, Narita Ajeng Loviana, Erlita Prestiandari, Fadhilah Rusmaputeri, Devica Dwi Ratna Putri, Fadylla Nuansa Citra Bening dan Indah Putri Arifiana. Terima kasih sudah bersedia menjadi teman bertukar pikiran yang menyenangkan, memberi perhatian yang luar biasa, selalu mendukung serta mendoakan dalam kebaikan;
10. Teman-teman seperjuangan FKG Universitas Jember angkatan 2014. Terima kasih atas kebersamaan, dukungan dan doa kalian selama ini;
11. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian; atas perhatian dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan khususnya dibidang kesehatan serta menjadi upaya dalam meningkatkan mutu kesehatan masyarakat.

Jember, 2 Mei 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
PERSEMBAHAN.....	iii
MOTO	iv
PERNYATAAN.....	v
PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Neutrofil	4
2.1.1 Fungsi Neutrofil	4
2.2 Radikal Bebas	6
2.2.1 <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS)	7
2.2.2 Radikal Superoksida	8
2.3 Antioksidan.....	9
2.4 Uji Aktivitas Antioksidan.....	10
2.5 Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>).....	11
2.4.1 Taksonomi Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>).....	12
2.4.2 Morfologi Kopi Robusta	12
2.4.3 Kandungan Antioksidan Kopi Robusta.....	13

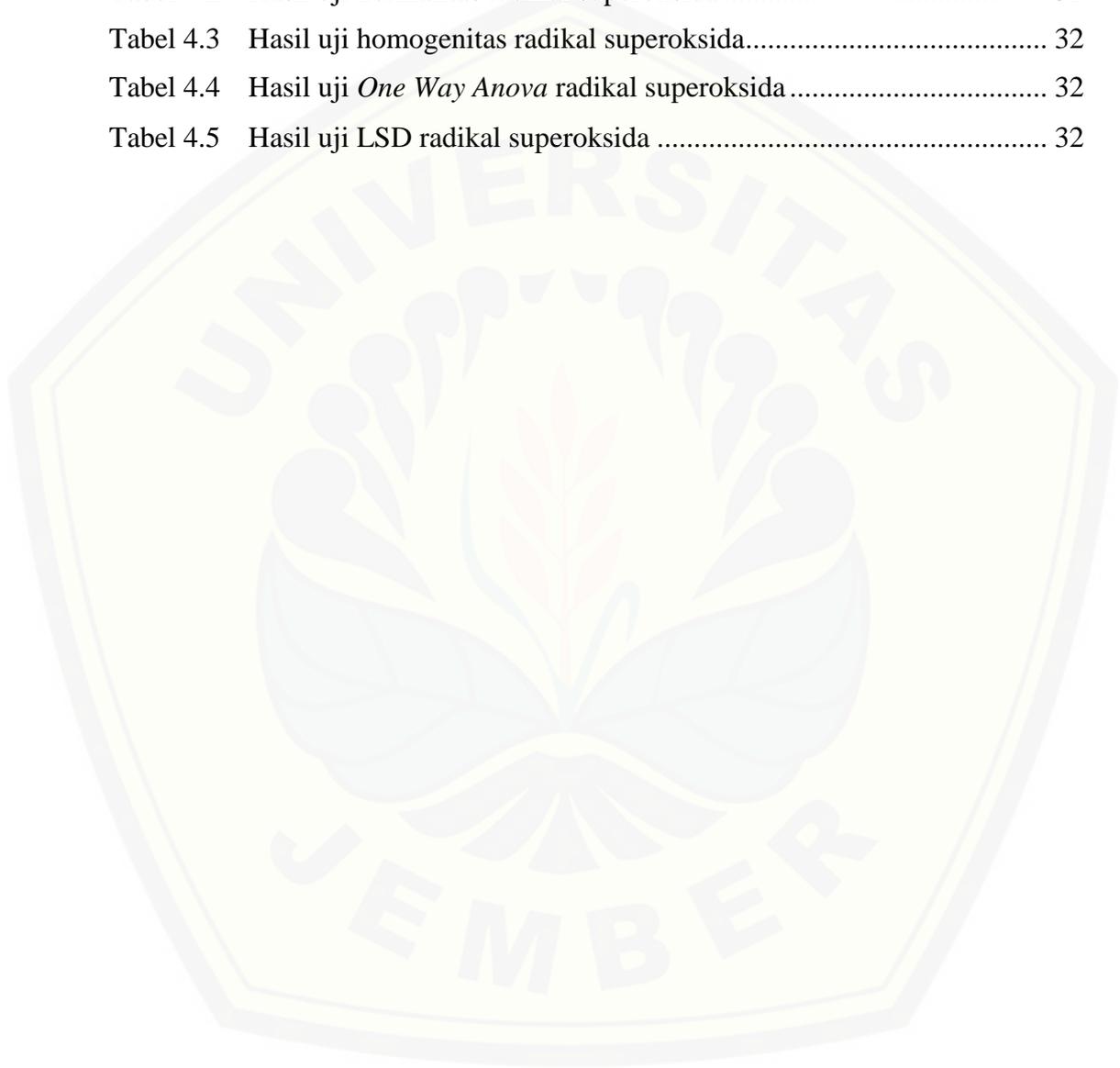
2.6 Kerangka Konsep.....	15
2.7 Penjelasan Kerangka Konsep	15
2.8 Hipotesis	16
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	17
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	17
3.2 Objek Penelitian	17
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.4 Variabel.....	18
3.4.1 Variabel Bebas	18
3.4.2 Variabel Terikat	19
3.4.3 Variabel Terkendali	19
3.5 Sampel Penelitian	20
3.5.1 Jumlah Sampel Penelitian	20
3.5.2 Kelompok Penelitian.....	21
3.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	21
3.6.1 Alat Penelitian.....	21
3.6.2 Bahan Penelitian	22
3.7 Prosedur Penelitian.....	22
3.7.1 Tahap persiapan	23
3.7.2 Tahap Pengujian Aktivitas Antioksidan	25
3.8 Analisis Data	28
3.9 Alur Penelitian.....	29
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Hasil.....	30
4.2 Analisis Data	31
4.3 Pembahasan	33
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	36
5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Sel neutrofil.....	4
Gambar 2.2 Pembentukan ROS selama <i>respiratory burst</i> oleh neutrofil.....	6
Gambar 2.3 Tanaman kopi robusta.....	13
Gambar 2.4 Ilustrasi penampang melintang buah kopi	13
Gambar 2.5 Kerangka konsep.....	15
Gambar 3.1 Prosedur penelitian	22
Gambar 3.2 Pengambilan lapang pandang.....	27
Gambar 3.3 Bagan alur penelitian.	29
Gambar 4.1 Rerata jumlah neutrofil yang memproduksi radikal superoksida. ...	30
Gambar 4.2 Gambaran mikroskopis produksi radikal superoksida.....	31

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Rata-rata jumlah produksi radikal superoksida.....	30
Tabel 4.2 Hasil uji normalitas radikal superoksida	31
Tabel 4.3 Hasil uji homogenitas radikal superoksida.....	32
Tabel 4.4 Hasil uji <i>One Way Anova</i> radikal superoksida	32
Tabel 4.5 Hasil uji LSD radikal superoksida	32



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Surat <i>Ethical Clearence</i>	42
Lampiran B. Surat Identifikasi Bakteri	43
Lampiran C. Surat Izin Penelitian	44
Lampiran D. <i>Informed Consent</i>	45
Lampiran E. Data Hasil Uji Mikroskopis Radikal Superoksida	46
Lampiran F. Foto Hasil Uji Mikroskopis Radikal Superoksida	47
Lampiran G. Analisis Data	54
Lampiran H. Foto Alat dan Bahan	56
Lampiran I. Foto Penelitian	61

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Neutrofil adalah salah satu jenis leukosit yang berperan sebagai garis pertahanan pertama tubuh terhadap benda asing seperti antigen, bakteri, dan virus. Pertahanan pertama tersebut melalui proses fagositosis. Selama proses fagositosis, terjadi penghancuran benda asing oleh produk *respiratory burst*, yaitu metabolit oksigen yang mempunyai sifat bakterisidal seperti *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Guyton dan Hall, 2007; Baratawidjaja, 2014). ROS dapat menyebabkan kerusakan sistem biologis, tergantung pada seberapa besar produksinya (Dewi, 2013).

Salah satu jenis dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) adalah radikal superoksida (O_2^-) (Kumar *et al.*, 2007). Radikal superoksida adalah radikal bebas yang memiliki elektron tidak berpasangan sehingga menjadi reaktif dan cenderung untuk mengikat molekul lain. Radikal superoksida juga dapat menghasilkan radikal bebas lain seperti radikal hidroksil (OH^-) (Marks, 2000). Radikal superoksida dapat diamati dengan menggunakan uji NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) yang berperan sebagai suatu zat yang dapat tereduksi dalam sitoplasma neutrofil dan digunakan untuk mengidentifikasi adanya disfungsi neutrofil (Sigma-Aldrich, 2014). Produksi radikal bebas secara terus-menerus, tanpa diimbangi dengan adanya antioksidan yang memadai, maka dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif dapat merusak molekul biologi yaitu *deoxyribonucleic acid* (DNA), lemak dan asam amino protein yang dapat berujung pada kematian sel (Handoko, 2015; Dewi, 2013; Miksusanti *et al.*, 2012). Apabila kerusakan tersebut terakumulasi, maka dapat berpengaruh terhadap proses penuaan, dan berbagai penyakit lain seperti penyakit kardiovaskuler, kanker, kelainan neurodegeneratif dan sebagainya (Zalukhu, 2016). Untuk mengurangi stres oksidatif akibat radikal bebas yang terbentuk tersebut, maka diperlukan antioksidan.

Antioksidan merupakan suatu senyawa pemberi elektron (*electron donor*) yang dapat menangkal atau mencegah terbentuknya radikal bebas. Antioksidan

dapat berasal dari di dalam tubuh, seperti enzim superoksida dismutase (SOD), enzim katalase dan enzim glutathion peroksidase. Apabila jumlah senyawa radikal bebas melebihi jumlah senyawa antioksidan dari dalam tubuh, maka dibutuhkan asupan antioksidan yang berasal dari luar tubuh, yaitu antioksidan eksogen (Ide, 2008). Antioksidan eksogen bisa didapatkan dari vitamin C, vitamin E, beta karoten, antosianin, krolofil, flavonoid, dan polifenol (Widayati, 2012; Parwata, 2015). Salah satu contoh bahan alami yang juga dapat digunakan sebagai sumber antioksidan eksogen adalah kopi robusta (Kenisa *et al.*, 2012).

Kopi robusta banyak diproduksi dan dikonsumsi oleh masyarakat sebagai minuman. Minuman tersebut diperoleh dari hasil seduhan kopi bubuk, yaitu biji kopi yang telah disangrai, digiling, atau ditumbuk sehingga menjadi serbuk (Hayati, 2012). Kopi robusta juga merupakan jenis kopi yang memiliki jumlah polifenol yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan kopi arabika (Rini, 2014). Polifenol pada kopi robusta memainkan peran yang penting sebagai antioksidan karena dapat menyerap dan menetralkan radikal bebas (Zheng, 2001). Hal ini didukung oleh penelitian Beksono (2014) yang menunjukkan bahwa terdapat efek antioksidan yang tinggi pada ekstrak biji kopi robusta. Efek antioksidan polifenol dalam kopi robusta, yaitu sebagai pencegahan terhadap beberapa penyakit seperti penyakit kardiovaskuler, kanker, dan osteoporosis (Zheng, 2001).

Berdasarkan uraian di atas, produksi radikal superoksida yang berlebih dapat membahayakan tubuh, apabila tidak diimbangi dengan pemberian antioksidan yang memadai. Salah satu antioksidan alami yang banyak digunakan di masyarakat yaitu kopi robusta. Kopi robusta terbukti mengandung senyawa antioksidan, akan tetapi belum pernah dilakukan pengamatan efek antioksidan kopi robusta dalam bentuk seduhan. Hal ini yang menjadi dasar peneliti tertarik mengkaji aktivitas antioksidan dari seduhan bubuk kopi robusta.

1.2 Rumusan Masalah

Sel neutrofil yang terstimulasi antigen dapat menghasikan radikal superoksida, sementara kopi diketahui mempunyai peran sebagai antioksidan yang dapat menetralsir radikal bebas yang terbentuk, sehingga didapatkan rumusan masalah yaitu:

Apakah seduhan bubuk kopi robusta memiliki aktivitas antioksidan yang dapat menghambat produksi radikal superoksida neutrofil?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji aktivitas antioksidan seduhan kopi robusta terhadap radikal superoksida neutrofil.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Meningkatkan pemahaman tentang aktivitas antioksidan seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap radikal yang dihasilkan sel neutrofil manusia.
2. Memberikan sumbangan pemikiran bagi ilmu pengetahuan dan teknologi kedokteran tentang manfaat kopi robusta sebagai antioksidan untuk mencegah berbagai penyakit.
3. Sebagai bahan acuan untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Neutrofil

Fagosit polimorfonuklear atau granulosit banyak dibentuk dalam sumsum tulang. Umur dari granulosit ini tidak panjang yaitu berkisar antara 2-3 hari. Granulosit menurut pewarnaan histologik dibagi menjadi neutrofil, eosinofil, dan basofil. Sel-sel tersebut bersama dengan antibodi dan komplemen berperan pada proses inflamasi akut. Neutrofil juga mempunyai fungsi utama dalam proses fagositosis terhadap antigen/benda asing (Baratawidjaja, 2014)

Neutrofil memiliki inti hingga lima lobus yang dihubungkan oleh benang kromatin tipis, dan sitoplasma mengandung granula halus seperti yang terlihat pada Gambar 2.1 (Dorland, 2010). Neutrofil merupakan sel paling melimpah pada peredaran darah diantara jenis leukosit lainnya, dan merupakan komponen seluler utama untuk respon imun natural selama inflamasi akut (Yunanto, 2012).



Gambar 2.1 Sel neutrofil yang dikelilingi eritrosit, perbesaran 1000x (Sumber: www.wcelneut.htm)

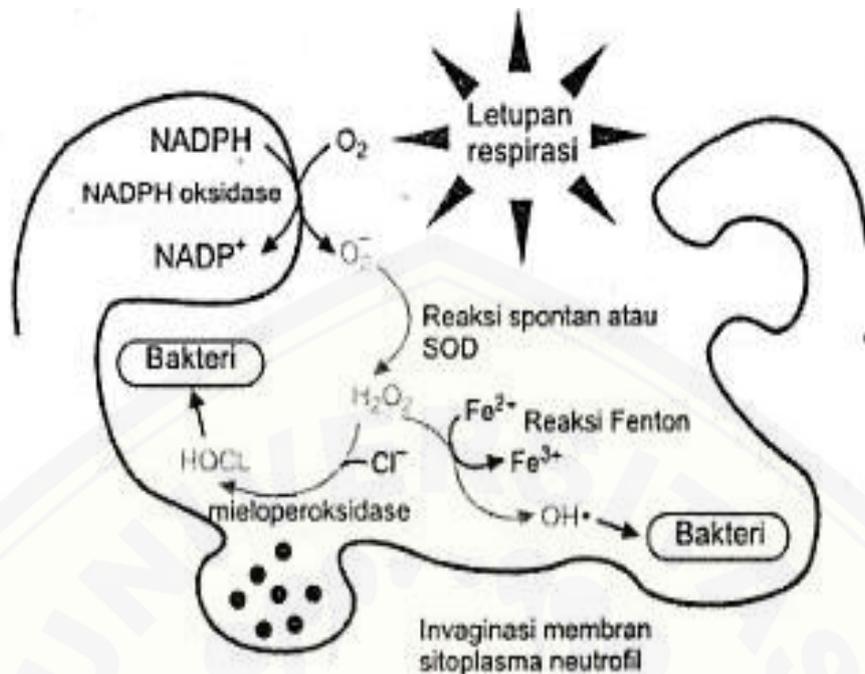
2.1.1 Fungsi Neutrofil

Neutrofil adalah sel matang yang dapat menyerang dan menghancurkan bakteri dan virus bahkan dalam sirkulasi darah (Guyton dan Hall, 2007). Dalam sistem pertahanan tubuh, neutrofil merupakan fagosit utama terhadap bakteri ekstraseluler (Roeslan, 2002). Fungsi neutrofil yang terpenting adalah fagositosis (Guyton dan Hall, 2007).

Mekanisme fagositosis diawali dengan perlekatan neutrofil ke partikel yang akan difagosit, kemudian sel ini menonjolkan pseudopodia ke sekeliling partikel. Pseudopodia bertemu satu sama lain pada sisi yang berlawanan dan bergabung, sehingga tercipta ruangan tertutup yang berisi partikel yang sudah difagositosis. Ruangan ini berinvaginasi ke dalam rongga sitoplasma dan melepaskan diri dari membran sel bagian luar untuk membentuk fagosom di dalam sitoplasma (Guyton dan Hall, 2007).

Mekanisme fagositosis terdapat dua macam yaitu mekanisme non-oksidatif (enzimatik) dan mekanisme oksidatif (non-enzimatik). Mekanisme non-oksidatif melibatkan enzim lisosom dan granula sitoplasmik lainnya. Lisosom dan granula sitoplasmik ini menggabungkan membrannya dengan membran fagosom, kemudian mengeluarkan banyak enzim pencernaan dan bahan bakterisidal ke dalam fagosom, sehingga dimulailah proses pencernaan bakteri yang sudah difagosit (Guyton dan Hall, 2007). Mekanisme oksidatif diperankan oleh beberapa bahan pengoksidasi kuat yang dibentuk oleh enzim dalam membran plasma dan fagosom, atau oleh organel khusus yang disebut peroksisom. Bahan pengoksidasi ini merupakan sejumlah besar superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (OH^{\cdot}) yang dapat membunuh sebagian besar bakteri, bahkan bila enzim lisosomal gagal mencerna bakteri tersebut. Bahan-bahan ini dalam jumlah sedikit namun sudah cukup bersifat mematikan untuk sebagian besar bakteri. Selain itu, salah satu enzim lisosom yaitu enzim mieloperoksidase (MPO) memiliki fungsi mengatalisis reaksi antara H_2O_2 dan ion klorida untuk membentuk hipoklorit ($HOCl$) yang secara luas bersifat bakterisidal (Guyton dan Hall, 2007).

Selama proses fagositosis terjadi pembebasan spesies oksigen reaktif. Ledakan pernafasan (*respiratory burst*) yang timbul di dalam granulosit sebagai respons terhadap agen infeksius atau rangsangan lain adalah sumber utama radikal superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil, hipoklorit, nitrogen monoksida (NO), dan radikal bebas lainnya. Proses terbentuknya radikal superoksida selama ledakan pernafasan dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Pembentukan ROS selama *respiratory burst* oleh neutrofil. Pengaktifan NADPH oksidase mencetuskan *respiratory burst* disertai pembentukan radikal superoksida. Selama fagositosis, membran plasma membentuk invaginasi, sehingga radikal superoksida dibebaskan ke dalam ruang vakuol. Anion superoksida (baik secara spontan atau secara enzimatis melalui SOD) menghasilkan spesies reaktif lain, termasuk H_2O_2 dan radikal hidroksil. Mieloperoksidase, suatu enzim yang mengandung Fe-hem dan terdapat di dalam granula neutrofil, disekresikan ke dalam vakuol, tempat enzim tersebut membentuk HOCl dan halida lainnya. Hasilnya adalah serangan terhadap membran dan senyawa lain dari sel bakteri, dan akhirnya lisis bakteri. Proses keseluruhan disebut sebagai ledakan pernapasan karena hanya berlangsung 30-60 menit dan memerlukan O_2 (Marks, 2000).

2.2 Radikal Bebas

Pada proses metabolisme normal, tubuh memproduksi partikel kecil dengan tenaga besar yang disebut sebagai radikal bebas. Radikal bebas adalah sekelompok bahan kimia baik berupa atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya (Arief, 2006). Secara umum radikal bebas dapat berasal dari dua macam yaitu radikal bebas endogen dan radikal bebas eksogen. Eksogen berasal dari luar tubuh seperti radiasi dan asap rokok, sedangkan endogen yang berasal dari dalam tubuh dihasilkan dari suatu

reaksi redoks atau reduksi oksidasi metabolik (Kumar *et al.*, 2007). Salah satu mekanisme penghasil radikal bebas endogen adalah melalui respirasi fosforilasi oksidatif, reaksi pembentukan adenosin trifosfat (ATP) sebagai energi dalam matriks mitokondria. Mekanisme penghasil radikal bebas endogen lainnya adalah melalui *respiratory burst* neutrofil, dimana terbentuk senyawa oksigen reaktif untuk membunuh bakteri (Widayati, 2012).

Radikal bebas mempunyai dua sifat dasar yaitu reaktifitas yang tinggi dan kecenderungannya untuk membentuk radikal baru, yang pada gilirannya nanti radikal baru tersebut apabila menjumpai molekul lain yang elektronnya mempunyai pasangan akan membentuk radikal yang baru lagi, sehingga terjadilah reaksi berantai (*chain reaction*). Reaksi berantai tersebut baru berhenti apabila radikal bebas tersebut dapat diredam, karena apabila rantai reaksi ini tidak dihentikan dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif dan memicu nekrosis sel. Nekrosis sel ini dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti penyakit kardiovaskuler, gangguan sistem imun, dan penyakit lainnya (Suryohudoyo, 2010).

2.2.1 *Reactive Oxygen Species* (ROS)

Jenis radikal bebas yang terpenting di dalam tubuh adalah *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Kumar *et al.*, 2007). Senyawa oksigen reaktif ini terdiri dari derivat oksigen radikal dan non radikal. Derivat oksigen radikal meliputi ion superoksida atau radikal superoksida (O_2^-), radikal peroksil ($ROO\bullet$) dan radikal hidroksil ($OH\bullet$), sedangkan derivat oksigen yang non radikal meliputi hidrogen peroksida (H_2O_2), oksigen singlet (1O_2) dan radikal peroksida organik ($RCOO^-$). Derivat oksigen non radikal selanjutnya dapat dengan mudah berubah menjadi senyawa radikal (Widayati, 2012).

ROS dihasilkan secara tetap pada makhluk hidup sebagai produk sampingan dari metabolisme sel. Selain itu ROS juga dihasilkan sebagai konsekuensi dari iradiasi, obat-obatan kemoterapi, dan paparan lingkungan terhadap oksidan kimia dan logam transisi. Pada konsentrasi yang tinggi atau jumlah yang berlebihan, ROS bertindak sebagai stres oksidatif yang menyebabkan

kerusakan oksidatif pada lemak, protein, dan DNA, kemudian memicu transformasi onkogenik, meningkatkan aktifitas metabolik, dan disfungsi mitokondria (Dewi, 2013).

2.2.2 Radikal Superoksida

Radikal ion superoksida disebut juga anion superoksida. Senyawa ini diproduksi di beberapa tempat yang memiliki rantai transport elektron. Oksigen teraktivasi dapat terjadi dalam berbagai bagian sel, termasuk mitokondria, kloroplas, mikrosom, glikosom, peroksisom, dan sitosol. Oleh sebab itu, tidak mengherankan jika ditemukan enzim superoksida dismutase dalam subseluler tersebut. Ion superoksida yang terbentuk dalam kloroplas, mitokondria, dan peroksisom merupakan bentuk senyawa oksigen intraseluler yang sangat reaktif (Winarsih, 2007).

Radikal bebas diproduksi dalam sel yang secara umum melalui reaksi pemindahan elektron menggunakan mediator enzimatik atau non-enzimatik. Produksi radikal bebas dalam sel dapat terjadi secara rutin maupun sebagai reaksi terhadap rangsangan. Produksi radikal bebas secara rutin adalah superoksida yang dihasilkan melalui aktivasi fagosit dan reaksi katalisa seperti ribonukleotida reduktase, sedangkan pembentukan melalui rangsangan adalah kebocoran superoksida, hidrogen peroksida, dan kelompok oksigen reaktif (ROS) lainnya pada saat bertemunya bakteri dengan fagosit yang teraktivasi. Pada keadaan normal sumber utama radikal bebas adalah kebocoran elektron yang terjadi dari rantai transport elektron, misalnya yang ada dalam mitokondria dan endoplasma retikulum dan molekul oksigen yang menghasilkan superoksida. Kondisi yang tidak lazim seperti radiasi ion, sinar ultraviolet, dan paparan energi tinggi lainnya, menghasilkan radikal bebas yang sangat berlebihan (Arief, 2006).

Radikal superoksida bersifat sangat reaktif, dapat menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak berbagai komponen sel hidup seperti protein, lipid, dan nukleotida. Perubahan terhadap protein yaitu radikal bebas dapat memodifikasi langsung asam amino dalam protein sehingga tidak lagi dikenal sebagai milik sendiri (*self*) tetapi sebagai *nonsel* oleh sistem imun. Perubahan terhadap

komponen lipid yaitu radikal beraksi dengan lipid tidak jenuh yang terdapat pada membran sel. Proses tersebut dinamakan sebagai peroksidasi lemak. Perubahan terhadap nukleotida yaitu radikal bebas akan menyebabkan terjadinya perubahan struktur (DNA atau RNA) yang menyebabkan terjadinya mutasi (Widayati, 2012).

2.3 Antioksidan

Senyawa antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Senyawa ini memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya sehingga dapat memutus reaksi berantai (Parwata, 2015). Aktivitas antioksidan di dalam tubuh merupakan suatu kesatuan sistem yang saling terkait dan saling mempengaruhi, contohnya superoksida dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase. Kekurangan salah satu komponen ini dapat menyebabkan terjadinya penurunan status antioksidan secara menyeluruh dan mengakibatkan perlindungan terhadap serangan ROS menjadi lemah (Maslachah, 2008).

Secara umum, sumber antioksidan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia dikelompokkan menjadi tiga macam yaitu (1) antioksidan yang sudah ada di dalam tubuh manusia atau antioksidan enzimatis seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan Glutathion (GSH) (2) antioksidan sintetis yang banyak digunakan pada produk pangan seperti *Butylated Hydroxy Anisole* (BHA), *Butylated Hydroxy Toluene* (BHT), *Propyl Galat* (PG), dan *Tertiary Butylated Hydroxy Quinone* (TBHQ), dan (3) antioksidan alami yang diperoleh dari bagian-bagian tanaman seperti kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji, dan serbuk sari, juga dapat diperoleh dari hewan dan mikroba. Jenis antioksidan yang banyak didapatkan dari bahan alami berupa vitamin C, vitamin E, beta karoten, antosianin, klorofil, flavonoid, dan polifenol (Parwata, 2015)

Antioksidan dan enzimnya akan merubah oksidan atau radikal bebas menjadi senyawa yang aman dan kurang reaktif (Handoko, 2015). Berikut adalah

reaksi dari antioksidan enzimatis dalam menetralkan reaktif oksigen spesies :

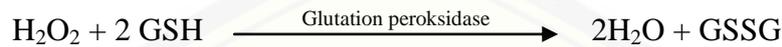
1. Enzim superoksida dismutase (SOD)

Enzim SOD akan merubah superoksid, O_2^- menjadi H_2O_2 :



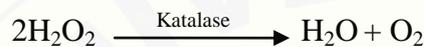
2. Glutation (GSH)

GSH akan merubah H_2O_2 menjadi air dan glutation disulfide (GSSG):



3. Katalase

Katalase akan merubah H_2O_2 menjadi air dan oksigen:



2.4 Uji Aktivitas Antioksidan

Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa cara. Pada penelitian ini dilakukan analisis aktivitas antioksidan menggunakan uji NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*). NBT adalah suatu zat pewarna yang akan tereduksi secara intrasitoplasma pada neutrofil untuk mengidentifikasi adanya disfungsi neutrofil dan untuk membedakan infeksi pirogenik. Reagen pewarnaan NBT hanya digunakan dalam diagnostik in vitro (Sigma-Aldrich, 2014).

Reduksi NBT pada neutrofil didapatkan melalui darah yang sudah diinkubasi bersamaan dengan larutan NBT, kemudian diwarnai dan diperiksa secara mikroskopis untuk menentukan persentase neutrofil yang menunjukkan endapan intrasitoplasmik dari formazan (Sigma-Aldrich, 2014). Persentase ini biasanya naik pada neutrofil yang terinfeksi. Endapan formazan ini akan nampak berupa senyawa biru keunguan (Baehner *et al.*, 1976)

Hastuti (2007) menggunakan uji NBT dalam mengetahui keadaan monosit pada darah ikan nila yang telah diinjeksi oleh LPS (Lipopolisakarida) bakteri *Aeromonas hydrophila*. Selain itu uji NBT juga pernah dilakukan oleh Tjahajati (2007) untuk mengamati aktivitas makrofag peritonium pada anjing yang diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* dalam mensekresi *Reactive Oxygen Reactive* (ROI). Penelitian Lusiastuti (2017) NBT digunakan untuk melihat aktivitas respon imun pada ikan lele yang diberikan probiotik mikroenkapsulasi

(PM) dan tanpa mikroenkapsulasi (PNM) yang menunjukkan pada kelompok PM terdapat peningkatan produksi oksigen radikal pada neutrofil dan sel-sel fagositik lainnya sehingga dapat memberikan ketahanan terhadap penyakit. Widiyantoro (2014) melakukan pengamatan pada ekstrak buah makasar dimana pada fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas reduksi NBT paling tinggi dibandingkan fraksi lainnya dan senyawa dehidrobrusatol hasil isolasi fraksi etil asetat memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan senyawa induknya.

Selain menggunakan uji NBT, uji antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya CUPRAC, DPPH, dan FRAP. Metode CUPRAC menggunakan bis (neokuproin) tembaga(II) ($\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$) sebagai pereaksi kromogenik. Pereaksi ($\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$) yang berwarna biru akan mengalami reduksi menjadi $\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$ yang berwarna kuning. Metode DPPH menggunakan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil sebagai sumber radikal bebas. Prinsipnya adalah reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan. Metode FRAP menggunakan $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$ kompleks besi ligan 2,4,6-tripiridil-triazin sebagai pereaksi. Kompleks biru $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$ akan berfungsi sebagai zat pengoksidasi dan akan mengalami reduksi menjadi $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{2+}$ yang berwarna kuning (Widyastuti, 2010).

2.5 Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Tanaman kopi (*Coffea* sp.) merupakan tanaman tropis yang banyak diperdagangkan di dunia. Kopi berasal dari Afrika, yaitu daerah pegunungan di Etiopia (Rahardjo, 2012). Saat ini tercatat lebih dari 80 nama varietas kopi di dunia, namun hanya terdapat dua varietas yang dikenal memiliki nilai ekonomis yang tinggi yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora*) (Ibrahim *et al.*, 2012). Menurut Prastowo (2010) lebih dari 90% area pertanaman kopi yang ada di Indonesia terdiri dari kopi robusta.

Kopi Robusta merupakan jenis kopi yang paling banyak diproduksi karena memiliki adaptasi yang lebih baik dibandingkan kopi Arabika. Sebagian besar kopi Indonesia merupakan kopi jenis Robusta karena lebih mudah ditanam dibandingkan kopi Arabika serta tingkat produktivitas yang tinggi. Kopi Arabika

memiliki kelebihan tersendiri dibandingkan dengan kopi jenis lainnya. Kopi Arabika memiliki cita rasa yang khas dengan kandungan kafein yang tidak terlalu tinggi dibandingkan dengan kopi Robusta (Panggabean, 2011).

2.4.1 Taksonomi Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Dalam taksonomi tumbuhan, kopi robusta diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Sub kingdom	: <i>Viridiplantae</i>
Infra kingdom	: <i>Streptophyta</i>
Superdivisi	: <i>Embryophyta</i>
Divisi	: <i>Tracheophyta</i>
Subdivisi	: <i>Spermatophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Superordo	: <i>Asteranae</i>
Ordo	: <i>Gentianales</i>
Famili	: <i>Rubiaceae</i>
Genus	: <i>Coffea lindl</i>
Spesies	: <i>Coffea canephora</i> (ITIS, 2015)

2.4.2 Morfologi Kopi Robusta

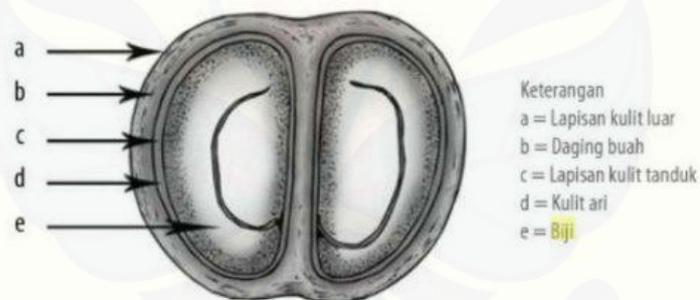
Tanaman ini tumbuh dengan tegak, bercabang, dan bila dibiarkan tumbuh dapat mencapai tinggi 12 m. Gambar 2.3 terlihat buah dan daun dari kopi robusta. Daunnya bulat telur dengan ujung agak meruncing. Daun tumbuh berhadapan dengan batang, cabang, dan ranting- rantingnya (Najiyati *et al.*, 2009). Permukaan atas daun mengkilat, tepi rata, pangkal tumpul, panjang 5 – 15 cm, lebar 4,0 – 6,5 cm, pertulangan menyirip, dan berwarna hijau. Kopi robusta memiliki dua tipe pertumbuhan cabang, yaitu cabang ortotrop yang tumbuh kearah vertikal dan cabang plagiotrop yang tumbuh kearah horizontal (Najiyati, 2012).

Bagian dalam dari buah kopi apabila dilihat dari penampang melintang terdiri dari lapisan kulit luar, daging buah, lapisan kulit tanduk, kulit ari, dan biji seperti yang terlihat pada Gambar 2.4. Daging buah kopi yang sudah matang

mengandung lendir dan senyawa gula yang rasanya manis. Kulit tanduk buah kopi memiliki struktur agak keras dan membungkus sepasang biji kopi. Bagian dalam dari buah kopi adalah biji kopi. Susunan biji kopi yaitu: (1) Kulit ari; (2) Lembaga; (3) Celah atau *center cut* (Panggabean, 2011).



Gambar 2.3 Tanaman Kopi Robusta (Sumber: Panggabean, 2011)



Gambar 2.4 Ilustrasi penampang melintang buah kopi (Sumber: Panggabean, 2011)

2.4.3 Kandungan Antioksidan Kopi Robusta

Antioksidan merupakan zat yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas yang mampu merusak struktur membran sel. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas

dan molekul yang sangat reaktif, sehingga kerusakan sel akan terhambat (Winarsi, 2007).

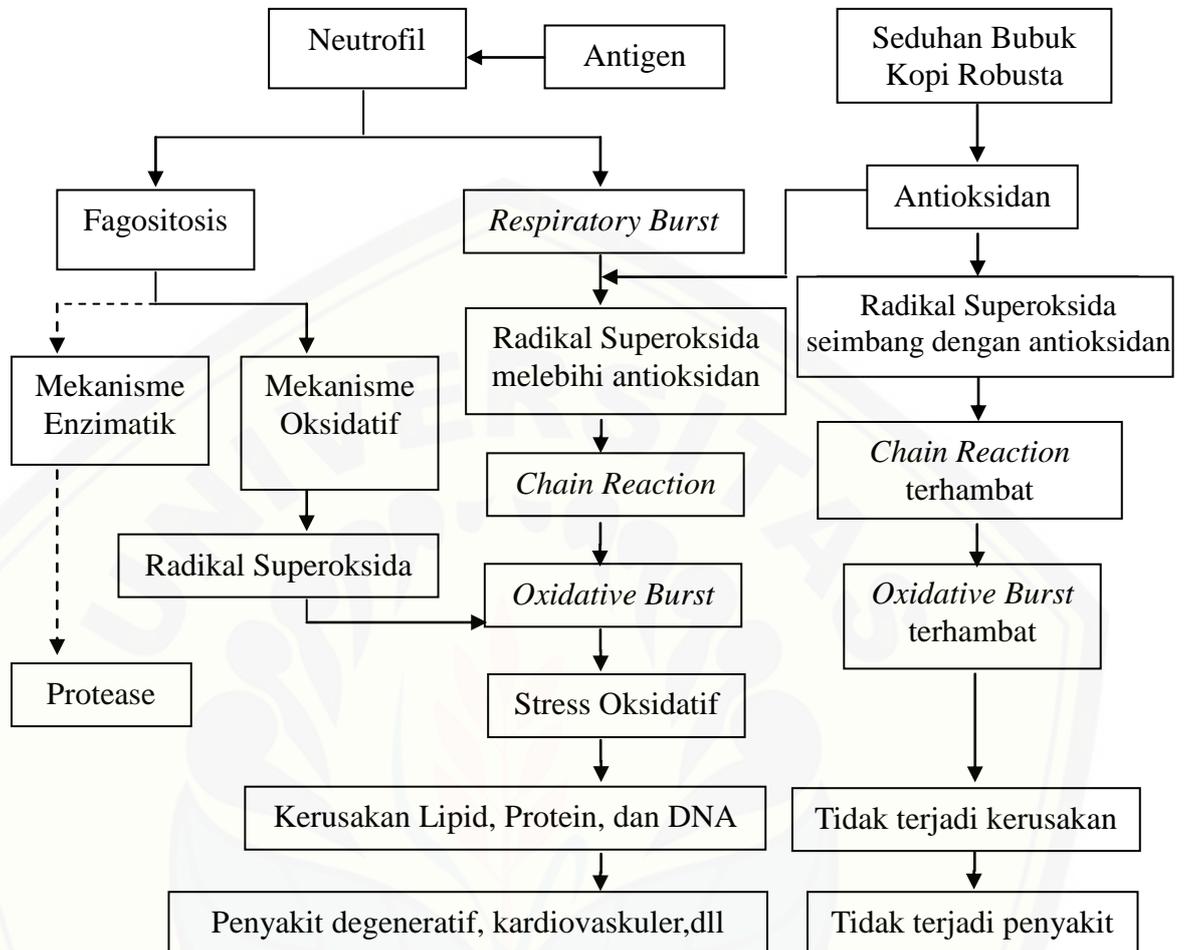
Kopi mengandung senyawa antioksidan yang berperan terhadap manfaat kesehatan, termasuk perlindungan dari berbagai penyakit, seperti penyakit jaringan lunak yang terjadi karena adanya invasi bakteri, virus, antigen, dan lain-lain. Senyawa antioksidan tersebut antara lain adalah kafein, fenol, dan asam klorogenat (Winarsi, 2007).

Kafein merupakan senyawa alkaloid yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Alkaloid adalah senyawa yang paling banyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan (Lenny, 2006). Handayani *et al.* (2014) menyatakan bahwa kafein sebagai antioksidan dapat berperan sebagai peredam radikal bebas.

Antioksidan golongan fenol memegang peranan penting dalam makanan. Peran senyawa fenol ataupun polifenol dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme yakni mampu mengubah permeabilitas sel mikroorganisme dan memungkinkan hilangnya makromolekul dalam sel. Senyawa fenol juga dapat berinteraksi dengan protein membran menyebabkan perubahan struktur dan fungsionalnya (Davidson *et al.*, 2005).

Asam klorogenat merupakan senyawa polifenol yang utama pada kopi. Jumlah asam klorogenat mencapai 90% dari total fenol yang terdapat pada kopi (Yusmarini, 2011). Asam klorogenat mampu melawan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dengan cara mempertahankan struktur normal sel dan fungsinya. Asam klorogenat bekerja dengan cara masuk ke dalam agen asing dan merusak struktur dinding agen asing tersebut (Winarsi, 2007).

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2.5 Kerangka konsep

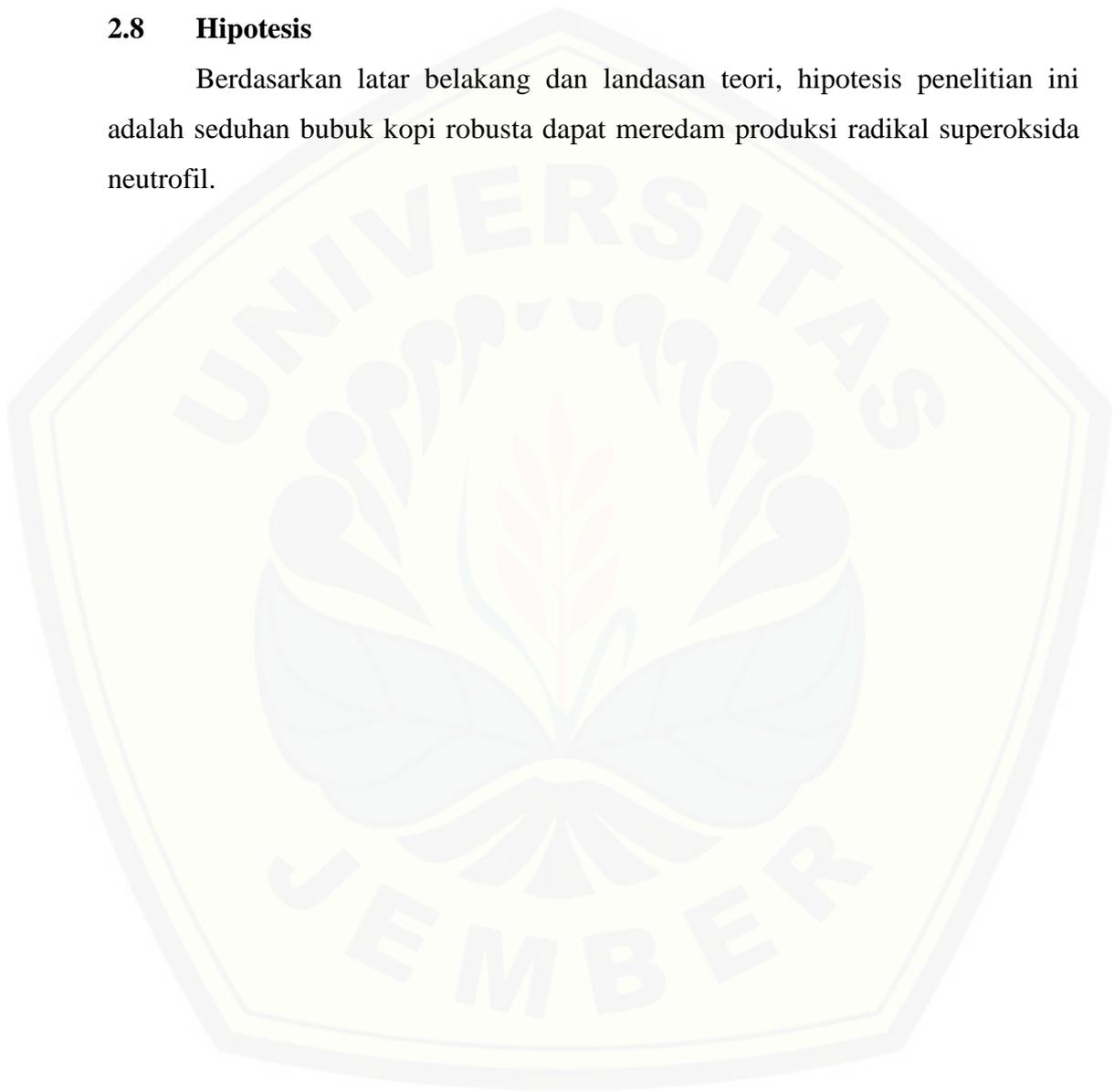
2.7 Penjelasan Kerangka Konsep

Isolat neutrofil yang diberi stimulan oleh antigen, menginduksi terjadinya *respiratory burst* dan fagositosis. Mekanisme fagositosis dapat terjadi secara enzimatis maupun oksidatif. Fagositosis dengan mekanisme enzimatis menghasilkan enzim protease, sedangkan fagositosis dengan mekanisme oksidatif menghasilkan radikal superoksida. Proses *respiratory burst* juga menghasilkan radikal superoksida. Radikal superoksida ini akan memicu terjadinya *chain reaction* yang dapat menimbulkan *oxidative burst*. Kemudian *oxidative burst* tersebut akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif dan merusak sel seperti lipid, protein, dan DNA. Kerusakan molekul ini dapat menyebabkan berbagai

penyakit seperti kardiovaskuler. Terbentuknya radikal superoksida dapat ditanggulangi dengan pemberian seduhan kopi robusta sebagai antioksidan sehingga dapat menghindari terjadinya keadaan patologis tersebut.

2.8 Hipotesis

Berdasarkan latar belakang dan landasan teori, hipotesis penelitian ini adalah seduhan bubuk kopi robusta dapat meredam produksi radikal superoksida neutrofil.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories*. Menurut Arikunto (2000) penelitian eksperimen merupakan penelitian yang dimaksudkan untuk mengetahui ada tidaknya akibat dari perlakuan atau *treatment* pada objek yang diteliti. Objek penelitian ini adalah isolat neutrofil vena perifer manusia yang diberi perlakuan seduhan bubuk kopi robusta (*Coffea canephora*).

Rancangan penelitian adalah *the post test only control group design*, yang menurut Sugiyono (2010) adalah penelitian yang hanya untuk mengetahui keadaan suatu kelompok setelah diberikan perlakuan atau *treatment*. Penelitian ini untuk melakukan pengamatan atau pengukuran produksi radikal superoksida neutrofil setelah perlakuan seduhan kopi robusta dan hasilnya dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.2 Objek Penelitian

Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat neutrofil yang diisolasi dari darah vena perifer orang sehat. Isolasi neutrofil menggunakan metode *gradient density*.

Neutrofil diisolasi dari 6 ml darah yang berasal dari volunteer dengan kriteria sebagai berikut:

1. Orang sehat yang tidak memiliki riwayat kelainan darah serta penyakit sistemik berdasarkan hasil anamnesa dan *vital sign* normal.
2. Tidak merokok.
3. Telah mengisi *informed consent* sebagai bukti persetujuan bahwa darah yang diambil akan dijadikan sampel penelitian.
4. Telah menerima penjelasan mengenai tujuan dari pengambilan darah dalam penelitian

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2018. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember.

3.4 Variabel

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah seduhan bubuk kopi robusta (*Coffea canephora*).

a. Definisi Operasional

Seduhan kopi robusta merupakan sediaan cair hasil penyeduhan bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen produksi PTPN XII.

b. Metode

Larutkan 3 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquades mendidih (90°C) untuk kelompok kopi 1 dan larutkan 6 gr bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen PTPN XII dengan 200 ml aquades mendidih (90°C) untuk kelompok kopi 2. Kemudian letakkan pada *hotplate stirrer* pada suhu 90°C dengan kecepatan 60 rpm selama 1 menit. Setelah itu dinginkan di suhu ruangan selama 3 - 4 menit. Setelah itu dilakukan penyaringan dengan menggunakan *filter syringe* 0,2 nm.

c. Parameter

Seduhan kopi ini dibuat dengan dua macam takaran yaitu 3 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquades (setara satu cangkir kopi) dan 6 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquades (setara dua cangkir kopi).

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan pada seduhan bubuk kopi robusta (*Coffea canephora*) Gunung Ijen (PTPN XII Persero, Indonesia).

a. Definisi Operasional

Aktivitas antioksidan seduhan bubuk kopi robusta adalah kemampuan seduhan kopi robusta dalam menangkal dan meredam produksi radikal superoksida.

b. Metode

Aktivitas antioksidan seduhan kopi robusta didapatkan dari produksi radikal superoksida yang dihasilkan oleh neutrofil yang telah dipapar oleh *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT). NBT adalah suatu zat berwarna kuning larut dalam air, yang dapat direduksi oleh radikal bebas oksigen yang terdapat pada neutrofil dengan membentuk senyawa biru keunguan, yang dikenal sebagai formazan (Baehner *et al.*, 1976).

c. Parameter

Analisis aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara mikroskopis. Secara mikroskopis dapat diketahui dengan jumlah neutrofil yang mereduksi formazan biru keunguan pada sekitar membran sel pada kelompok perlakuan atau kelompok kopi lebih sedikit daripada kelompok kontrol.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah:

a. Isolat Neutrofil

Neutrofil dari darah vena perifer yang telah dilakukan isolasi menggunakan metode *gradient density*.

b. Dosis Perlakuan Antigen *Streptococcus mutans*

Antigen *Streptococcus mutans* diawali dengan pembuatan suspensi bakteri kemudian diukur konsentrasinya setelah itu dilakukan penyaringan atau filter menggunakan *filter syringe* agar bakteri dan medianya terpisah sehingga media bakteri dapat digunakan sebagai antigen bakteri *Streptococcus mutans*.

Kemudian antigen tersebut ditambahkan ke dalam tiap *chamber* / *well* sebanyak 100 μ l, pada tiap kelompok sampel.

c. Prosedur Laboratoris

Prosedur penelitian ini terdiri dari tahap pembuatan seduhan bubuk kopi robusta, pembuatan antigen *Streptococcus mutans*, pembuatan isolat neutrofil, penempelan sel dan tahap perlakuan.

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Jumlah Sampel Penelitian

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan rumus Daniel (2005) yang didapatkan pada penghitungan sebagai berikut:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan:

n = besar sampel tiap kelompok

Z = nilai pada tingkat tertentu jika $\alpha = 0,05$, maka $Z = 1,96$

σ = standar deviasi sampel

d = kesalahan yang masih dapat di tolerir, diasumsikan $\sigma = d$

Dengan asumsi bahwa kesalahan yang masih dapat diterima (d) sama besar dengan (σ) maka :

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

$$= \frac{(1,96)^2 \cancel{\sigma^2}}{\cancel{d^2}}$$

$$= (1,96)^2$$

$$= 3,84 \text{ dibulatkan menjadi } 4$$

Berdasarkan rumus di atas, diperoleh besar sampel minimal yang harus digunakan dalam penelitian ini adalah 4 sampel untuk setiap kelompok.

3.5.2 Kelompok Penelitian

Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi 3 kelompok yang terdiri dari:

a. Kelompok Kopi I

Isolat Neutrofil + seduhan bubuk kopi robusta dengan dosis 3 gr bubuk kopi robusta dan 200 ml aquades + NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) + antigen bakteri *Streptococcus mutans*.

b. Kelompok Kopi II

Isolat Neutrofil + seduhan bubuk kopi robusta dengan dosis 6 gr bubuk kopi robusta dan 200 ml aquades + NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) + antigen bakteri *Streptococcus mutans*.

c. Kelompok Kontrol Negatif .

Isolat Neutrofil + NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) + antigen bakteri *Streptococcus mutans*.

Terdapat 3 kelompok dalam penelitian dengan besar sampel minimal tiap kelompok adalah 4 sampel, sehingga jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 12 sampel.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Autoclave, *centrifuge* (Eppendorf, Centrifuge 5810 R), *inkubator shaker* (LabTech, Daihan LabTech Co.,LTD.), mikroskop *inverted* (Olympus IX51), *opti lab*, *laminar flow* (Dwyer, Mark XX), *water bath*, *hotplate stirrer*, *densichek*, *well plate 12*, oven (Binder), neraca digital, vortex (Labinco L46), *syringe 5 mL*, tabung *eppendorf 2 ml*, tabung falcon 15 ml, tabung heparin, *micro pipette*, *cover slip* (Duran), *Filter syringe 0,2 nm*, *yellow and blue tip*, *tourniquet*, masker, sarung tangan.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen produksi PTPN XII, bakteri *Streptococcus mutans*, media BHI-B (*Brain Heart Infusion Broth*), NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*), HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*), darah vena perifer (*heparinized whole blood*), lymphoprep, histopaque 1119, media kultur RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute Media*), media kultur M119, *penicilin-streptomycin*, *fungizone-amphotericin*, safranin, metanol, aquades steril.

3.7 Prosedur Penelitian



Gambar 3.1 Prosedur Penelitian Uji Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta

Penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap pertama bertujuan untuk mendapatkan seduhan kopi robusta Tahap kedua bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan kopi robusta terhadap radikal superoksida neutrofil menggunakan metode *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT).

3.7.1 Tahap persiapan

a. Sterilisasi

Strerilisasi alat untuk semua yang terbuat dari kaca dibersihkan terlebih dahulu, kemudian untuk tabung falcon, tabung *ependorf*, *yellow tip* dan *blue tip* yang dimasukkan dalam botol kaca, dan *coverslip* yang diletakkan pada *petridish* berisi alkohol, semua dibungkus menggunakan alumunium foil, lalu disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121° C selama 15 menit. Setelah semua alat selesai disterilisasi bersihkan semuanya dengan alkohol termasuk *micro pipette* kemudian masukkan kedalam *laminar flow* yang telah dilapisi alumunium foil lalu dilakukan penyinaran uv selama 1 jam.

b. Pembuatan Seduhan Kopi Robusta

Prinsip proses penyeduhan adalah menuangkan air mendidih ke bubuk kopi dan merendam bubuk kopi didalam air panas untuk mengekstrak kandungan bubuk kopi. Kopi harus ditunggu beberapa saat hingga ampas kopi mengendap seluruhnya, sebelum kopi tersebut diminum (Gardjito dan Rahadian, 2011).

Larutkan 3 gr bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen produksi PTPN XII dengan 200 ml aquades mendidih (90°C) untuk kelompok kopi 1 dan larutkan 6 gr bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen PTPN XII dengan 200 ml aquades mendidih (90°C) untuk kelompok kopi 2. Kemudian letakkan pada *hotplate stirrer* pada suhu 90°C dengan kecepatan 60 rpm selama 1 menit. Setelah itu dinginkan di suhu ruangan selama 3-4 menit. Setelah itu dilakukan penyaringan dengan menggunakan *filter syringe*.

c. Pembuatan Medium RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) dan Medium Kompleks

- 1) Pembuatan RPMI dari sediaan bubuk ke cair (dalam 200 ml aquades steril)

$\frac{200}{1000} \times 10,4 = 2,08$ gr (jadi, dalam 200 ml aquades steril ditambahkan 2,08 gr serbuk RPMI)

- 2) Pembuatan Medium Kompleks M199 (dalam 200 ml aquades steril)

$\frac{200}{1000} \times 9,5 = 1,9$ gr (jadi, dalam 200 ml aquades steril ditambahkan 1,9 gr serbuk medium kompleks M199)

- d. Pembuatan Media BHI-B (*Brain Heart Infusion Broth*)

BHI-B sebanyak 3,7 gr dimasukkan dalam *erlenmayer* dan ditambah 100 ml aquades steril. Dipanaskan diatas kompor listrik sampai mendidih. Kemudian ditutup kapas dan di sterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Untuk memastikan bahwa media BHI-B dalam keadaan steril, maka media tersebut dimasukkan dalam *incubator* dengan suhu 37°C selama 24 jam.

- e. Pembuatan Antigen Bakteri *Streptococcus mutans*

Antigen bakteri *Streptococcus mutans* digunakan pada penelitian ini sebagai stimulan untuk merangsang neutrofil melakukan proses *Respiratory burst* agar dapat terbentuk radikal superoksida. Antigen yang diambil dari media bakteri ini diduga mengandung endotoksin yang bersifat toksik. Proses pembuatan antigen bakteri ini terdiri dari dua tahapan, yaitu :

- 1) Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*

- a) Ambil 2 ml BHIB, kemudian tambahkan 3-5 koloni bakteri.
- b) Campurkan, kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.
- c) Lakukan pengecetan gram untuk melihat morfologi bakteri *Streptococcus mutans*.
- d) Menentukan konsentrasi bakteri dengan *densicheck* sebesar 0,5 mcfarland setara 1×10^8 *Colony Forming Units* (CFU) /ml (Tenover, 2009).

- 2) Tahap Penyaringan

Pada tahap filter ini digunakan untuk memisahkan antara bakteri dengan medianya. Pemisahan dilakukan menggunakan *filter syringe* ukuran 0,2 nm.

3.7.2 Tahap Pengujian Aktivitas Antioksidan

a. Pengambilan Sampel Darah

Mengambil darah (*whole blood*) dari darah vena perifer orang sehat (tidak mempunyai kelainan sistemik) yang telah menandatangani *informed consent*. Pengambilan darah vena menggunakan *disposable syringe* secara intravena pada *fossa cubiti* sebanyak 6 ml, kemudian darah tersebut dibagi dalam tiga tabung heparin yang mengandung antikoagulan.

b. Prosedur Isolasi Neutrofil

- 1) Siapkan 6 mL darah vena perifer orang sehat, lalu dimasukkan ke dalam dua tabung heparin masing-masing 3 mL
- 2) Tabung heparin digoyangkan selama beberapa detik agar darah tidak menggumpal dan bercampur dengan antikoagulan (*heparinized whole blood*) lalu dipindahkan kedalam tabung falcon.
- 3) Selanjutnya, lapiskan 3 mL *hystopage* 1119 pada tabung falcon steril dan tambahkan 3 mL *lymphoprep* secara hati-hati pada tabung falcon dengan teknik ujung mikro pipet ditempelkan pada dinding tabung, dan disemprotkan secara perlahan-lahan untuk mencegah pecahnya *ficoll*, sehingga terbentuk 2 lapisan.
- 4) Setelah itu, dilakukan pelapisan 6 mL darah diatas *gradient* tabung tadi, secara perlahan lahan melalui dinding tabung falcon, maka terbentuklah 3 lapisan (*hystopage* 1119, *lymphoprep*, dan darah).
- 5) Sentrifugasi dengan kecepatan 1900 rpm atau 700 g selama 30 menit pada suhu 20°C.
- 6) Terbentuk 6 lapisan yang terdiri dari plasma, mononuklear, *lymphoprep*, polimorfonuklear , *hystopage* 1119 dan eritrosit.
- 7) Pipet Lapisan ke 4 yaitu polimorfonuklear (yang berbentuk cincin kabut) secara hati-hati menggunakan pipet mikro dan masukkan pada tabung falcon steril.
- 8) *Buffy coat* neutrofil kemudian dicuci dengan cara mengencerkan sampel Polimorfonuklear menggunakan RPMI 3 ml, lalu homogenkan.

- 9) Sentrifugasi dengan kecepatan 600 g atau 1700 rpm selama 10 menit dengan suhu 20°C, lakukan tahap pencucian ini sebanyak 3 kali.
- 10) Tambahkan 1 ml HBSS pada Supernatant yang didapat, homogenkan.
- 11) Tambahkan 5 µl *fungizone* dan 20 µl *penicilin streptomycin*.

c. Prosedur Penempelan Sel

- 1) Siapkan *well plate* yang berisi 12 well, masukkan *coverslip* steril pada masing-masing *well* yang sebelumnya telah didesinfektan menggunakan *autoclave*.
- 2) Teteskan 100 µl supernatant hasil isolasi neutrofil pada *coverslip* yang sudah disiapkan.
- 3) Inkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C.
- 4) Ambil dan tambahkan 1 ml media kultur RPMI, dan inkubasi lagi selama 20 – 30 menit pada suhu 37°C.
- 5) Amati di bawah mikroskop *inverted*, dengan menggoyang secara perlahan untuk melihat penempelan selnya.
- 6) Cuci menggunakan media RPMI sebanyak 3 kali, secara hati-hati untuk melepaskan kontaminasi sel
- 7) Amati di bawah mikroskop *inverted*, untuk melihat kontaminasi selnya
- 8) Setelah sel steril bebas dari kontaminasi, ganti media kultur menggunakan media kultur M.199.
- 9) Diamkan selama 15 menit lalu sel siap untuk dilakukan perlakuan.

d. Pemaparan Seduhan Bubuk Kopi dan Antigen Bakteri

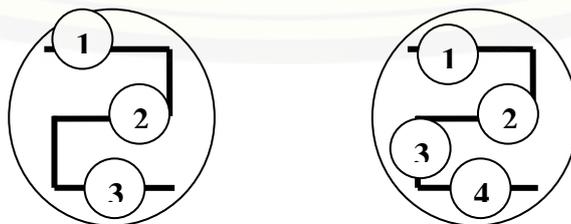
- 1) Neutrofil dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu:
 - a) Kelompok I (kelompok kopi I) dengan seduhan kopi robusta dosis 3 gr bubuk kopi dengan 200 ml aquades.
 - b) Kelompok II (kelompok kopi II) dengan seduhan kopi robusta dosis 6 gr bubuk kopi dengan 200 ml aquades.
 - c) Kelompok III (kelompok kontrol) tanpa seduhan kopi robusta.
- 2) Kelompok I dan II dipapar masing masing 100 µl seduhan kopi robusta.
- 3) Setelah itu dilakukan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dalam *inkubator shaker*.

4) Lalu pemaparan 100 μ l antigen bakteri dan 250 μ l NBT pada semua kelompok. Pemaparan dilakukan bersamaan karena neutrofil yang telah terpapar antigen akan segera membentuk radikal superoksida dengan masa hidup yang sangat pendek (sepersekian detik), jadi apabila tidak langsung diberikan NBT maka radikal superoksida tidak dapat tertangkap karena telah berubah menjadi radikal bebas lain yang lebih reaktif.

5) Inkubasi selama 1 jam dalam *inkubator shaker* suhu 37°C.

e. Analisis Aktivitas Antioksidan Kopi Robusta Terhadap Radikal Superoksida

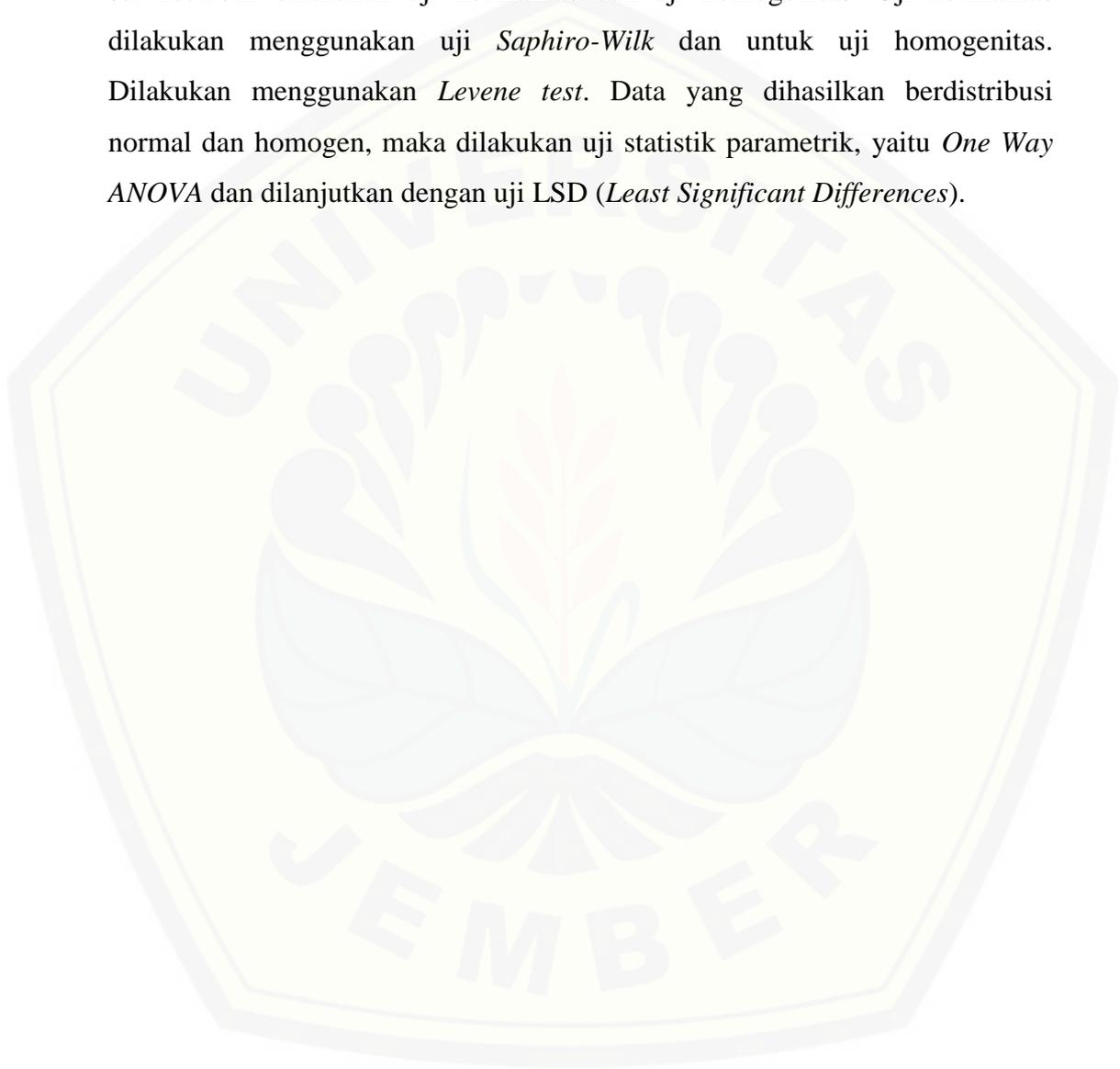
Setelah medium di ambil, neutrofil yang menempel pada *cover glass* dicuci dua kali menggunakan RPMI, diangin-anginkan lalu di fiksasi dengan metanol. Pewarnaan menggunakan larutan safranin. Pemeriksaan dilakukan melalui penghitungan jumlah sel neutrofil yang berwarna biru keunguan karena mengandung partikel formazan *blue*. Pengamatan dilakukan dengan metode *blinding*. Diambil gambar preparat pada 3-4 lapang pandang yang didapatkan dari menggeser secara *zig-zag* seperti pada Gambar 3.2 di bawah mikroskop. Lapang pandang yang diambil dimulai dari tepi bagian atas lalu bagian tengah, dan tepi bagian bawah preparat, hal ini dilakukan agar gambar yang diambil dapat mewakili keseluruhan preparat dan pengamatan dilakukan oleh 3 orang pengamat dengan bantuan *opti lab* mikroskop perbesaran 1000x (Hasanah, 2018; Firsthya *et al.*, 2014). Neutrofil yang memproduksi radikal kemudian dihitung dan hasilnya dirata-rata. Aktivitas antioksidan dapat diketahui dari jumlah neutrofil yang mereduksi formazan biru keunguan pada sekitar membran neutrofil pada kelompok perlakuan (kopi) lebih sedikit daripada kelompok kontrol (tanpa kopi) (Yagizawa *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2006).



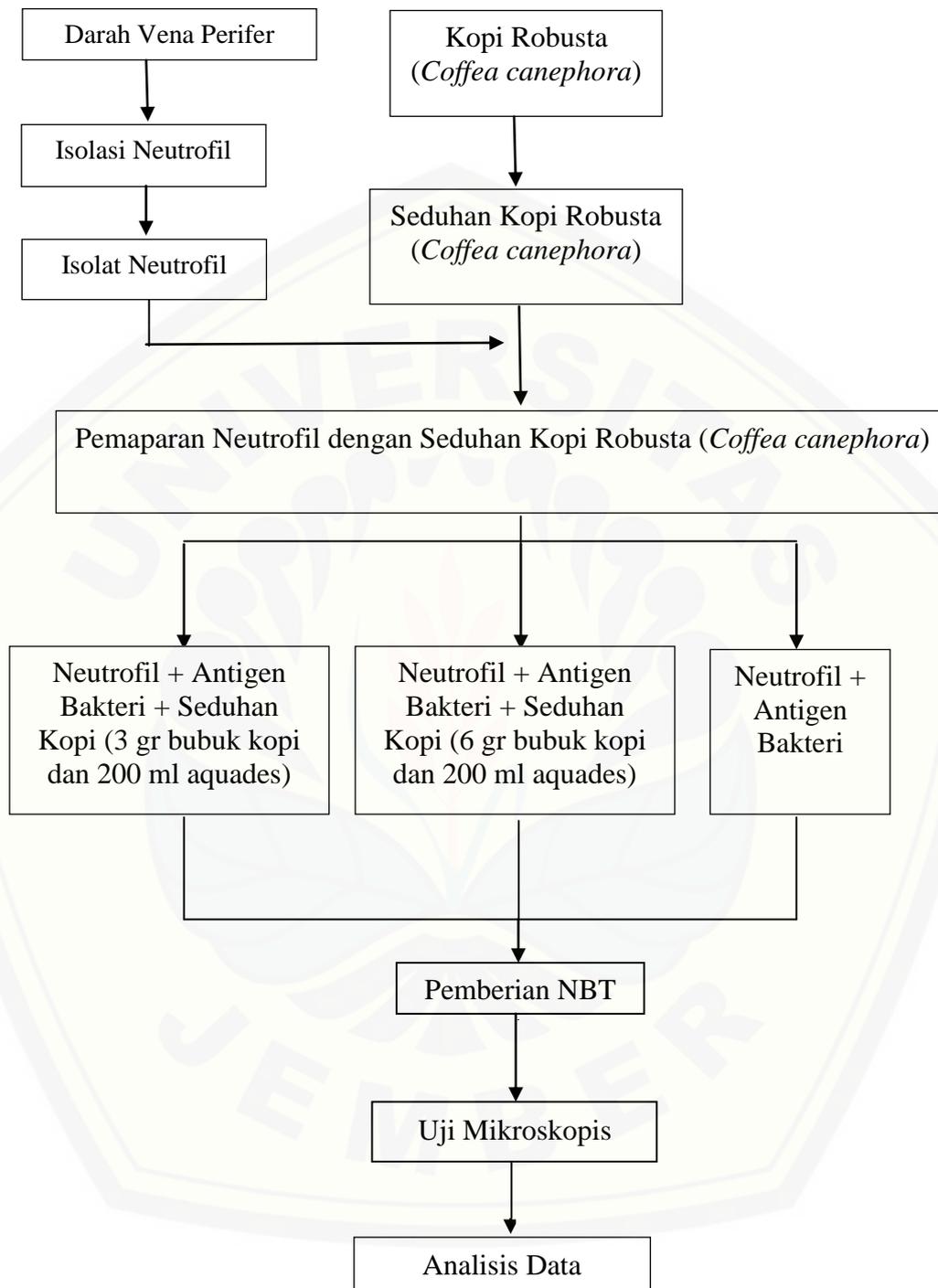
Gambar 3.2 Pengambilan Lapang Pandang

3.8 Analisis Data

Dalam penelitian ini data yang didapatkan yaitu rata-rata jumlah sel neutrofil yang memproduksi radikal superoksida. Rata-rata jumlah neutrofil yang memproduksi radikal superoksida pada pemeriksaan mikroskopis tiap 100 sel neutrofil dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas dilakukan menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan untuk uji homogenitas. Dilakukan menggunakan *Levene test*. Data yang dihasilkan berdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji statistik parametrik, yaitu *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *LSD (Least Significant Differences)*.



3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Bagan Alur Penelitian.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa seduhan bubuk kopi dapat bertindak sebagai antioksidan yang memadai dalam meredam produksi radikal superoksida neutrofil yang diinduksi oleh antigen bakteri.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui berbagai konsentrasi atau dosis yang efektif dalam meredam radikal superoksida
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai efek antioksidan dari beberapa macam merek bubuk kopi yang terdapat di pasaran.

DAFTAR PUSTAKA

- Arief, S. 2006. *Radikal Bebas*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Ariadini, S. W. 2007. Aktivitas Superoksida Dismutase dan Patologi Anatomi pada Hati Tikus Dengan Perlakuan Parasetamol dan Suplemen Kelapa Kopyor. *Skripsi*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Arikunto, S. 2000. *Prosedur Penelitian; Suatu Pendekatan Praktek*. Edisi 3. Jakarta: Rineke Cipta.
- Baehner, R. L., L. A Boxer, dan J. Davis. 1976. The Biomechanical Basis Of Nitro Blue Tetrazolium Reduction In Normal Human And Chronic Granulomatous Disease Polymorphonuclear Leukocytes. *Blood*. 48: 309-313
- Baratawidjaja, K. G dan I. Rengganis. 2014. *Imunologi Dasar*. Edisi 11. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Beksono, H. R. 2014. *Uji Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Biji Kopi Robusta (coffea canephora) Dengan Metode DPPH*. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Choi, H. S., J. W. Kim, Y. N. Cha, dan C. Kim. 2006. A Quantitative Nitro Blue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry* 27(1): 31-44.
- Daniel, W. W. 2005. *Biostatistic: A Foundation for Analysis in The Health Sciences*. Eight Edition. John Wiley & Sons Inc.
- Davidson, P. M., J. N. Sofos, dan A. L. Brenem. 2005. *Antimicrobial in Foods*. Third Edition. New York: Marcel Dekker Inc.
- Dewi, A. 2013. Peranan *Reactive Oxygen Species* (Ros) Dari Mitokondria Pada Resistensi Silang (*Cross-Resistance*) Antara Radiasi Dan Docetaxel. *Tesis*. Program Studi Magister IKM Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.
- Dorland W. A., dan Newman. 2010. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi 31. Jakarta: EGC.
- Firsthya, O. dan Rohmah, I. N. 2014. Perbandingan Antara Durasi Waktu Pembekuan Terhadap Terjadinya Waktu Pembusukan Jaringan Ginjal Pada Kelinci. *Tesis*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

- Fitriyana, N. 2012. Pengaruh Pemaparan Bakteri *Phorpyromonas Gingivalis* Terhadap Produksi Superoksida Neutrofil. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Guyton A.C., dan J.E. Hall 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 9. Jakarta: EGC.
- Handayani, H., H. S. Feronika, dan Yunianta. 2016. Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode *Ultrasonic Bath* (Kajian Rasio Bahan : Pelarut dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 4(1): 262-272.
- Handayani, V., A. R. Ahmad, dan M. Sudir. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga dan Daun Patikala (*Etilingera elatior*) Menggunakan Metode DPPH. *Journal*. ISSN 2407-2354: 86-93.
- Handoko, E., dan W. A. Sumilat. 2015. Metabolisme Hidrogen Peroksida Dan Peranannya Pada Infeksi Telinga. *Skripsi*. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Hasanah, A. N. 2018. Efektivitas Ekstrak Etanol Biji Edamame (*Glycine max* L. Merrill) Terhadap Jumlah Fibroblas Pada penyembuhan Luka Bakar Derajat II. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Hastuti, S. D. 2007. Evaluasi Pertahanan Non Spesifik Ikan Nila Gift (*Oreochromis sp*) yang Diinjeksi dengan LPS (Lipopolysaccharida) Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Protein* 14(1): 79-84.
- Hayati, R., A. Marliah, dan F. Rosita. 2012. Sifat Kimia dan Evaluasi Sensori Bubuk Kopi Arabika. *Jurnal Floratek* 7: 66-75
- Ide, Pangkalan. 2008. *Gaya Hidup Penghambat Alzheimer*. Jakarta: PT Elex Komputindo
- ITIS. 2015. *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner. ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*). http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=5060&print_version=PRT&source=to_print. [Diakses pada 18 November 2017].
- Kenisa, Y. P. 2012. Pengaruh Salep Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Proses Penyembuhan Luka Full-Thickness Pada Kulit. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
- Kumalaningsih, S. 2006. *Antioksidan Alami-Penangkal Radikal Bebas, Sumber, Manfaat, Cara Penyediaan dan Pengolahan*. Surabaya: Trubus Agrisarana
- Kumar V., R.S. Cotran, dan S.L. Robbins. 2007. *Buku Saku Dasar Patologi Penyakit*. Edisi 7. Terjemahan oleh A. Prasetyo, B.U. Pendit, T. Priliono. Jakarta: EGC

- Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoid, Fenilpropanoide dan Alkaloida*. Medan : Universitas Sumatra Utara.
- Lusiastuti, A. M., S. Andriyanto, dan R. Samsudin. 2017. Efektivitas Kombinasi Probiotik Mikroenkapsulasi Melalui Pakan Untuk Pengendalian Penyakit *Motile Aeromonads Septicemia* Pada Ikan Lele, *Clarias gariepinus*. *Jurnal Riset Akuakultur* 12(2): 179-186.
- Marks, D.B., A.D. Marks, dan C.M. Smith. 1996. *Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. Terjemahan oleh B.U. Pendi. 2000. Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis. EGC. Jakarta.
- Maslachah, L., R. Sugihartuti, dan R. Kusniasanti. 2008. Hambatan Produksi Reactive Oxygen Species Radikal Superoksida (O_2^-) oleh Antioksidan Vitamin E (α -tocopherol) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Menerima Stressor Renjatan Listrik. *Media Kedokteran Hewan* 24(1): 21-26
- Mayers, M. G. 2004. Effect of caffeine on blood pressure beyond the laboratory. *American Heart Association* 43: 724-725.
- Miksusanti, Elfita, dan S. Hotdelina. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Sifat Kestabilan Warna Campuran Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) dan Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.). *Jurnal Penelitian Sains* 15(2©): 60-69
- Mulanto, S. dan E. Suharyanto. 2012. *Kopi, Seduhan, dan Kesehatan*. Jember: Puslitkoka Indonesia.
- Murtafiah, A. 2012. Daya Hambat Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap *Streptococcus mutans*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Najiyati, S., dan Danarti. 2009. *Memilih dan Merawat Tanaman Buah di Pekarangan Sempit*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Najiyati, S., dan Danarti. 2012. *Kopi, Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Panggabean, E. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta Selatan: PT Agro Media Pustaka
- Parwata, I. M. O. A. 2015. Karakteristik dan Kapasitas Antioksidan Daun Gaharu (*Gyrinops versteegii*). Denpasar : Universitas Udayana.
- Prastowo, B., E. Karmawati, Rubijo, Siswanto, C. Indrawanto, dan S. J. Munarso. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.

- Puspitasari, M.L., T. V. Wulansari, T. D. Widyaningsih, J. P. Malingan, dan N. I. P. Nugrahini. 2016. Aktivitas Antioksidan Suplemen Herbal Daun Sirsak (*Annona Muricata L.*) Dan Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana L.*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 4(1): 283-290
- Rahardjo, P.. 2012. *Kopi Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Ramanaviciene, Almira, Mostovojus, Voktoras, Bachmatova, Iriana, dan Ramanavicius. 2003. Anti-bacterial Effect on Caffeine on *Eschericia coli* and *Pseudomonas floescens*. *Journal Acta Medica Lituania*. 10(4): 185-188.
- Rini, L. A. S. 2014. Optimasi Sediaan Krim Ekstrak Kering Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora L.*) Sebagai Antioksidan Dengan Basis *Vanishing Cream*. *Tesis*. Malang: Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang.
- Roeslan, B. O. 2002. Respon Imun di Dalam Rongga Mulut, *Majalah Ilmiah Kedokteran Gigi, Scientific Journal in Dentistry* No 49 Tahun 17.
- Sigma-Aldrich. 2014. Nitroblue Tetrazolium (NBT) Reduction. *Sigma Technical Bulletin* No. 840. USA
- Siswoyo, T.A., dan K. Hoshokawa. 2012. Produksi Pengembangan Protein Antihipertensi Generasi Baru dari Gnetum gnemon Protein sebagai Bahan Nutraceutical Komersial. *Prosiding Insinas*. Vol 0652
- Sugiyono. 2010. *Metode Penelitian Pendidikan Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta
- Suryohudoyo, P. 2010. *Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas*. Surabaya: Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Tenover, F. C. 2009. Antibiotic Suspectibility Testing. *Encyclopedia of Microbiology*. Edisi 3
- Tjahajati, I. 2007. Vaksinasi BCG Meningkatkan Aktivitas Makrofag dalam Sekresi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) pada Anjing yang Diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*. *Media Kedokteran Hewan* 23(3): 173-178.
- Weinberg. A., dan Bealer. B. K. 2002. *The Miracle of Caffeine: Manfaat Tak Terduga Kafein Berdasarkan Penelitian Paling Mutakhir*. Alih bahasa oleh Warastuti. Bandung: Qanita.
- Widayati, E. 2012. Oksidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant. *Majalah Ilmiah Sultan Agung* 50(128): 26-32.

- Widiyantoro, A. 2014. Metabolit Sekunder Prospektif Dari Famili Simaroubaceae. *Jurnal Penelitian Sainstek* 19(2): 14-22.
- Widyastuti, N. 2010. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Dengan Metode CUPRAC, DPPH, Dan FRAP Serta Korelasinya Dengan Fenol Dan Flavonoid Pada Enam Tanaman. *Skripsi*. Bogor: Departemen Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.
- Winarsi, H. 2007. *Anioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Yagisawa, M., A. You, M. Yonemaru, S. Imajoh-Ohmi, S. Kanegasaki, Y. Yazaki, dan F. Takaku. 1996. Superoxide Release and NADPH Oxidase Components in Mature Human Phagocytes: Correlation between Functional Capacity and Amount of Functional Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228(2): 510-516.
- Yunanto, A., M. S. Chandra, E. Widjajanto, M. A. Widodo. 2012. Kuantitas, Kualitas, dan Daya Fagositosis Neutrofil pada Saliva dan Darah Bayi Baru Lahir dengan Faktor Risiko Sepsis. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 27(2): 89-95
- Yusmarini. 2011. Mini Review Senyawa Polifenol pada Kopi: Pengaruh Pengolahan, Metabolisme dan Hubungannya dengan Kesehatan. *Jurnal Sagu* 10(2): 22-30
- Zalukhu, M. L., A. R. Phyma, dan R. T. Pinzon. 2016. Proses Menua, Stres Oksidatif, dan Peran Antioksidan. *Cermin Dunia Kedokteran Edisi 245* 43(10): 733-736.
- Zheng W. dan S. Y. Wang. 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(11): 5165-5170.

LAMPIRAN

Lampiran A. Surat *Ethical Clearance*

 KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER
(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH
FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)

ETHIC COMMITTEE APPROVAL
No. 044/UN25.8/KEPK/DL/2018

Title of research protocol : "Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta Terhadap Radikal Superoksida Neutrofil In Vitro"

Document approved : Research Protocol

Principal Investigator : Azizah Safaatin

Member of research : -

Responsible Physician : Azizah Safaatin

Date of approval : February 5th, 2018

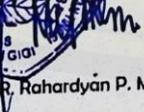
Place of research : 1. Bioscience Laboratory RSGM Universitas Jember

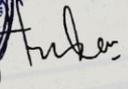
The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.

Jember, February 10th, 2018

Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember

Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember


(drg. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)


(Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M. SI.)

Lampiran B. Surat Identifikasi Bakteri

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN
TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
JURUSAN BIOLOGI
Jalan Kalimantan III No. 23 FMIPA, Universitas Jember,
Jawa Timur 68123

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

Berdasarkan hasil identifikasi dengan pengecatan Gram pada bakteri yang digunakan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember oleh:

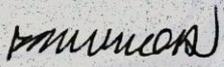
Nama/NIM : 1. Kholisa/141610101054
2. Arina Nur Rahmah/141610101032
3. Prisca Vianda Sukma/141610101019
4. Azizah Safaatin/141610101033

Jurusan/Fak/PT : Kedokteran Gigi/Universitas Jember

Maka dapat disampaikan hasilnya bahwa bakteri tersebut adalah:
Streptococcus mutans

Demikian, mudah-mudahan bermanfaat.

Jember, 7 Februari 2018
Kalab. Mikrobiologi


Drs. Rudju Winarsa, M. Kes
196008161989021001

Lampiran C. Surat Izin Penelitian

	KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS JEMBER FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991	
	Nomor Perihal	: 4073 UN25.8.TL/2017 : Ijin Penelitian
		26 OCT 2017
<p>Kepada Yth Direktur RSGM Universitas Jember Di Jember</p>		
<p>Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :</p>		
1	Nama	: Azizah Safaatin
2	NIM	: 141610101033
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl.Mastrip Gang 2 No.50 Jember
6	Judul Penelitian	: Aktivitas Antioksidan Seduhan Biji Kopi Robusta (Coffea Canephora) Terhadap Radikal Superoksida Neutrofil In Vitro
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: Sentrifuse vertikal, incubator shaker, mikroskop
9	Waktu	: Oktober 2017
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Mengetahui Uji Efektivitas Seduhan Biji Kopi Robusta (Coffea Canephora) Terhadap Radikal Superoksida Neutrofil In Vitro
11	Dosen Pembimbing	: 1. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes 2. drg. Dessy Rachmawati, M.Kes,Ph.D
<p>Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih</p>		
<p>an. Dekan Wakil Dekan I,  Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes NIP. 196109031986022001</p>		

Lampiran D. Informed Consent**SURAT PERSETUJUAN**
INFORMED CONSENT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Zakiyya Ulpiyah
Umur : 20 tahun
Jenis Kelamin : Perempuan

Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari :

Nama : Azizah Safaatin
NIM : 141610101033
Fakultas : Kedokteran Gigi
Alamat : Jl. Mastrip Gang 2 No.50

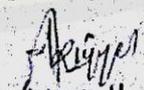
Dengan judul penelitian **AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SEDUHAN BUBUK KOPI ROBUSTA TERHADAP RADIKAL SUPEROKSIDA NETROFIL IN VITRO**, dimana prosedur pelaksanaan penelitian untuk pengambilan sampel ini tidak akan menimbulkan resiko bagi subyek yang bersangkutan.

Saya telah membaca atau dibacakan prosedur penelitian yang terlampir dan telah diberi kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan diberi jawaban dengan jelas.

Surat persetujuan ini saya tulis dengan sebenar-benarnya tanpa suatu paksaan dari pihak manapun. Dengan ini saya menyatakan dengan sukarela sanggup menjadi subyek dalam penelitian ini.

Jember, 29 Januari 2018

Yang menyatakan


(..Zakiyya Ulpiyah..)

Lampiran E. Data Hasil Uji Mikroskopis Radikal Superoksida

Kelompok Kopi 1 (3 gr)

Pengulangan	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	42	43	43	42.67
2	46	42	46	44.67
3	40	38	40	39.33
4	49	47	49	48.33
			Jumlah	175
			Rata-rata	43,75
			%	43,75%

Kelompok Kopi 2 (6 gr)

Pengulangan	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	38	39	37	38.00
2	26	28	29	27.67
3	34	34	35	34.33
4	37	39	38	38.00
			Jumlah	138
			Rata-rata	34,5
			%	34,5%

Kelompok Kontrol (tanpa kopi)

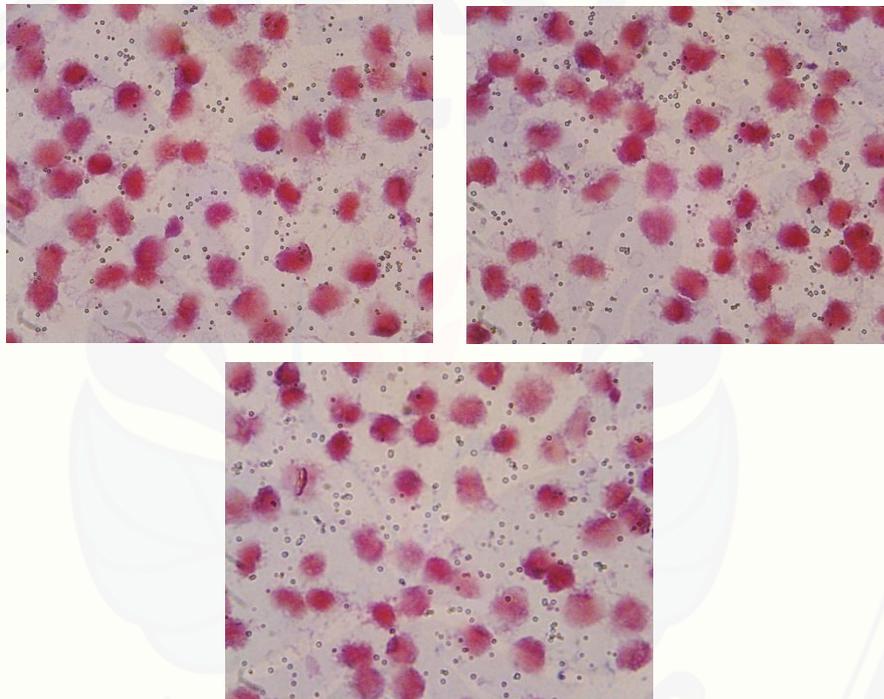
Pengulangan	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	92	92	90	91.33
2	86	86	86	86.00
3	89	89	88	88.67
4	83	83	83	83.00
			Jumlah	322
			Rata-rata	80,5
			%	80,5%

Lampiran F. Foto Hasil Uji Mikroskopis Radikal Superoksida

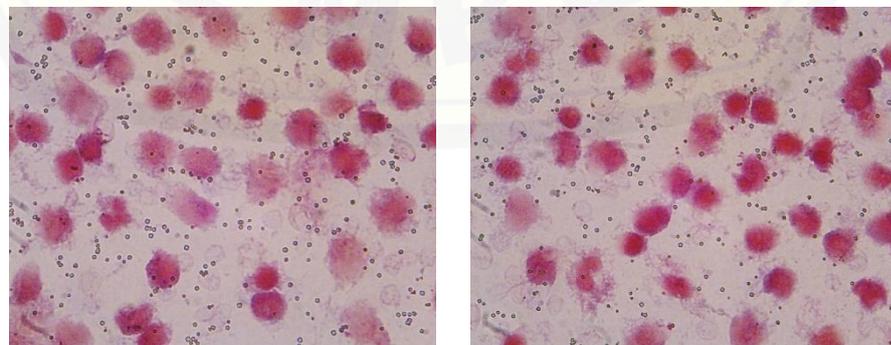
F.1 Kelompok Kopi 1

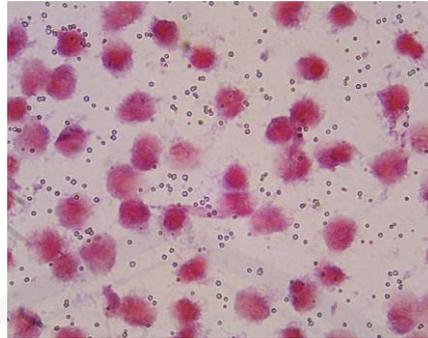
Kelompok kopi 1 adalah kelompok yang terdiri dari neutrofil, antigen bakteri *Streptococcus mutans*, dan seduhan kopi 3 gr. Pada gambar terlihat jumlah radikal superoksida tidak banyak. Radikal superoksida terlihat dari membran sel yang berwarna keunguan (perbesaran 1000x).

1) Kelompok kopi 1 (1)

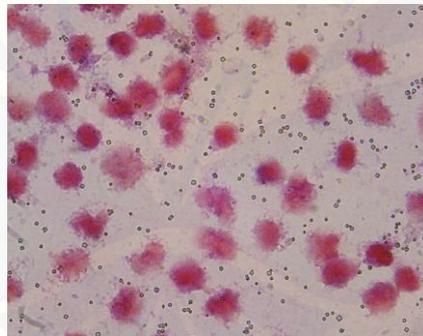
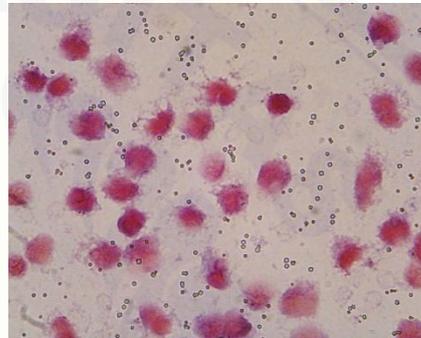
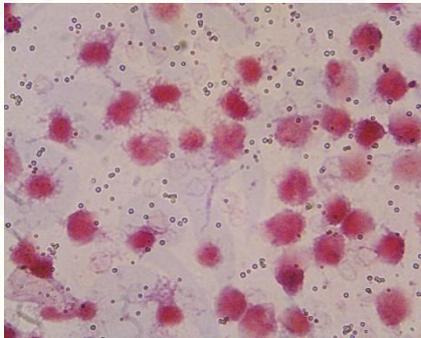


2) Kelompok kopi 1 (2)

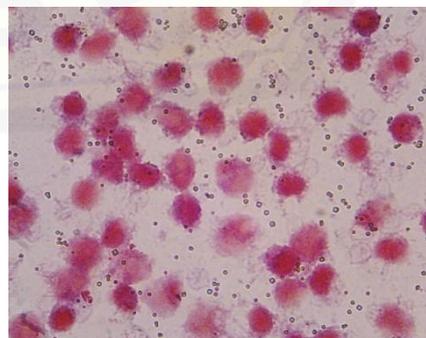
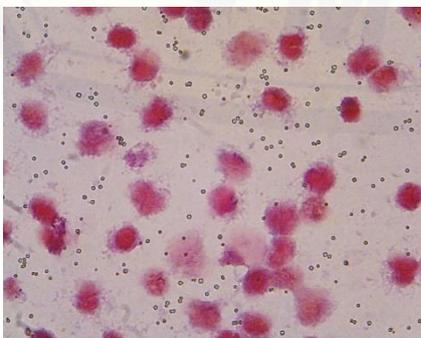


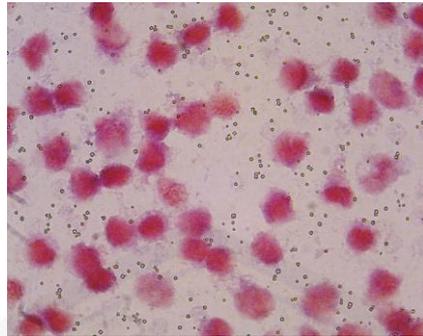


3) Kelompok kopi 1 (3)



4) Kelompok kopi 1 (4)

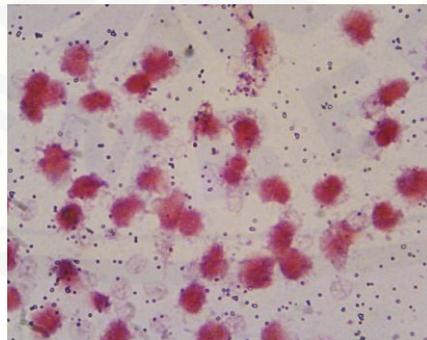
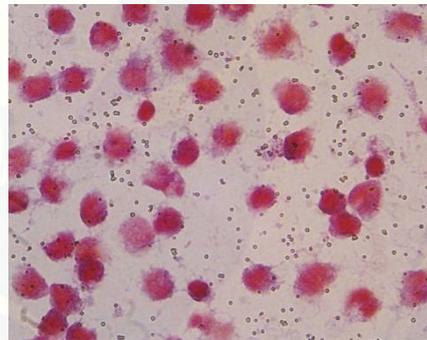
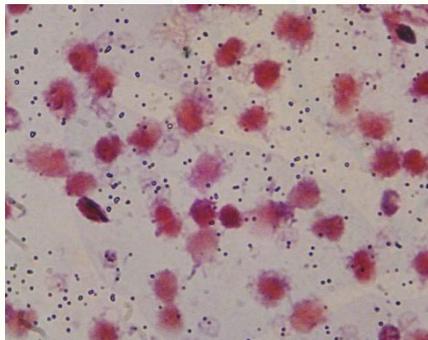




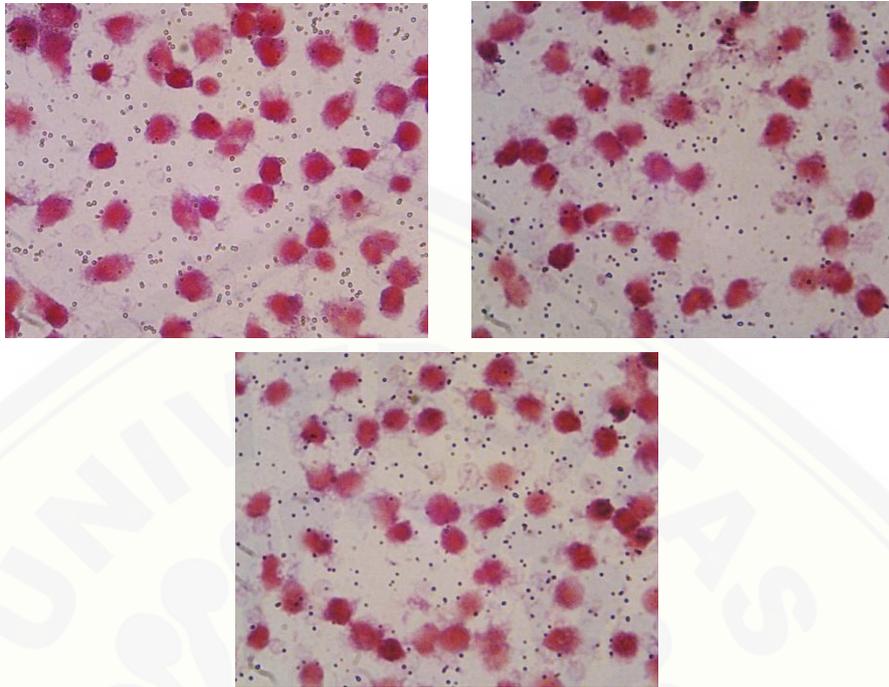
F.2 Kelompok Kopi 2

Kelompok kopi 2 adalah kelompok yang terdiri dari neutrofil, antigen bakteri *Streptococcus mutans*, dan seduhan kopi 6 gr. Pada gambar terlihat jumlah radikal superoksida juga tidak banyak. Radikal superoksida terlihat dari membran sel yang berwarna keunguan (perbesaran 1000x).

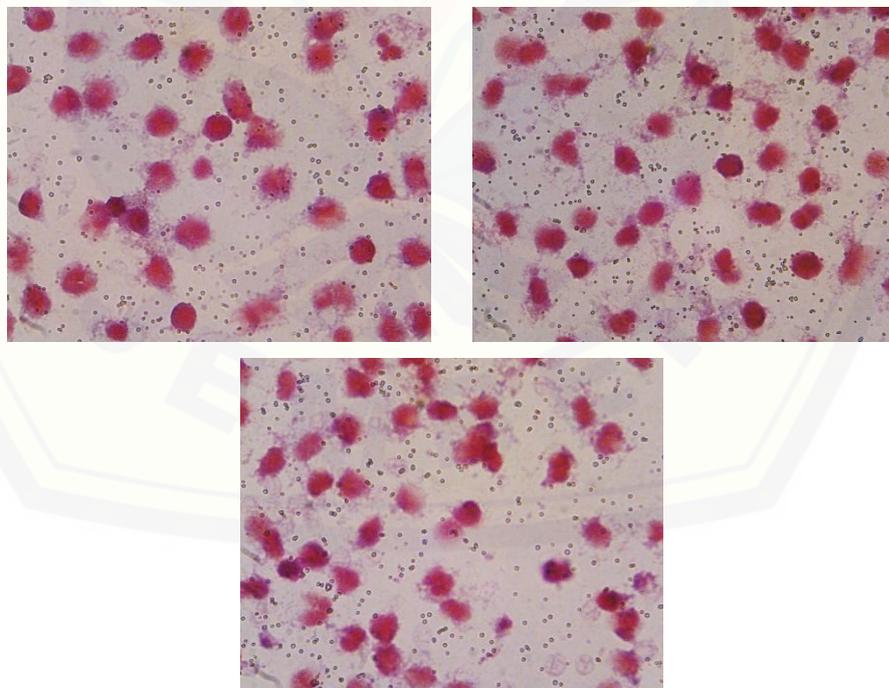
1) Kelompok kopi 2 (1)



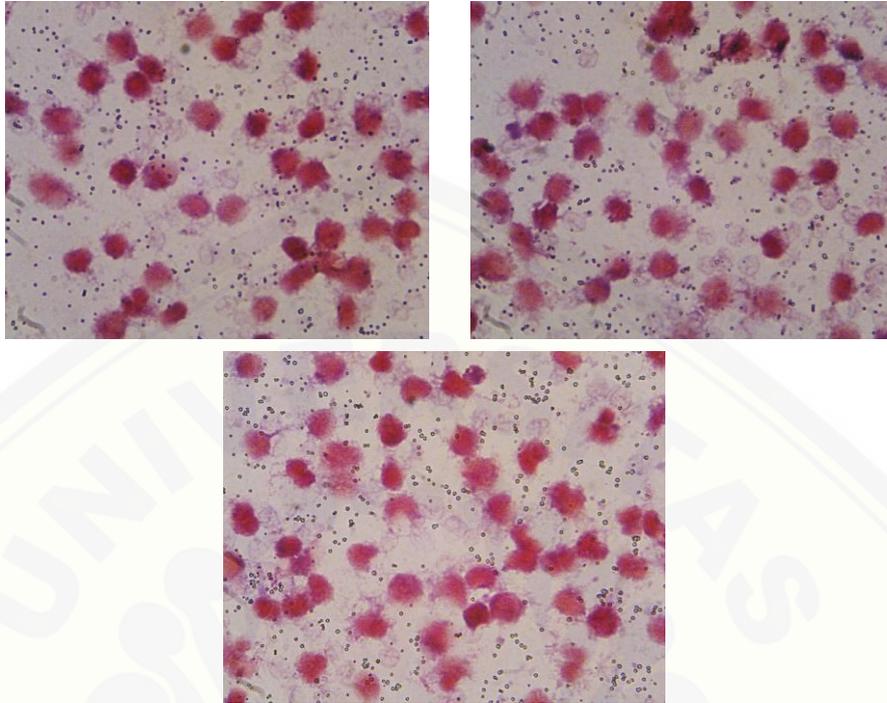
2) Kelompok kopi 2 (2)



3) Kelompok kopi 2 (3)



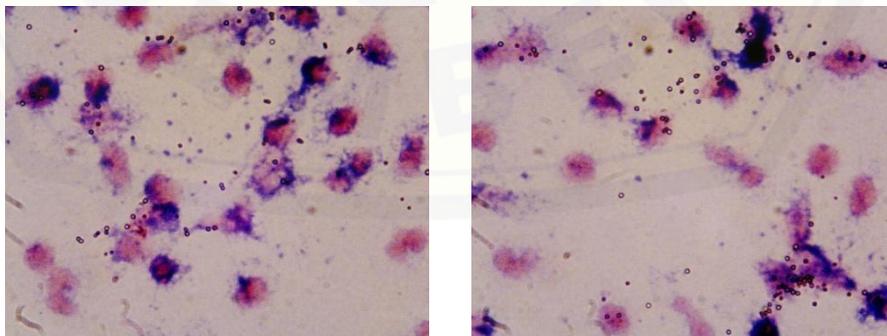
4) Kelompok kopi 2 (4)

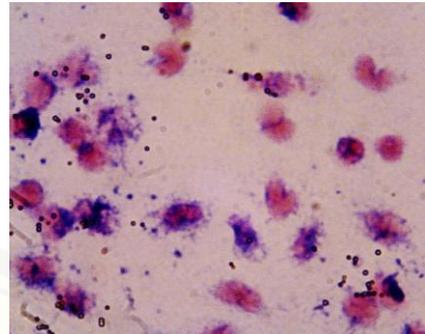
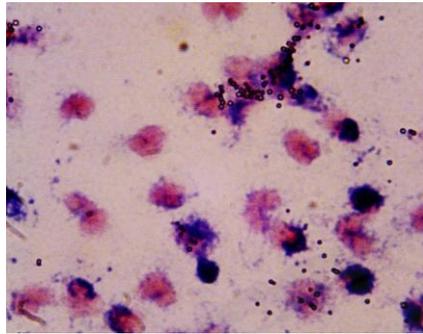


F.3 Kelompok Kontrol

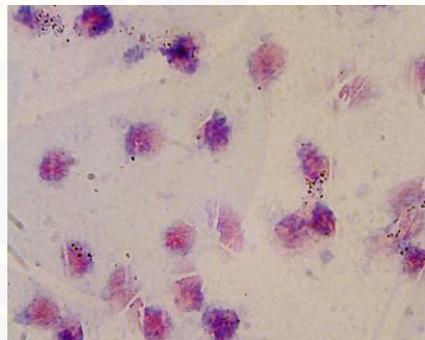
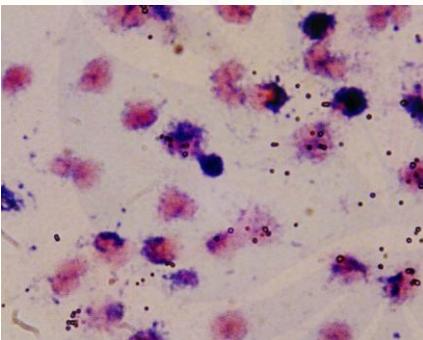
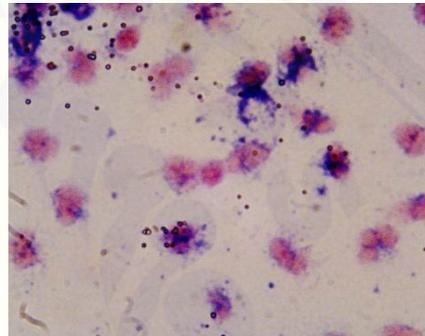
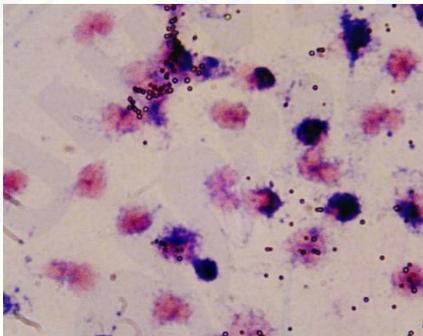
Kelompok kontrol adalah kelompok yang terdiri dari neutrofil dan antigen bakteri *Streptococcus mutans*. Pada gambar terlihat jumlah radikal superoksida sangat banyak. Radikal superoksida terlihat dari membran sel yang berwarna biru-ungu (perbesaran 1000x).

1) Kelompok kontrol (1)

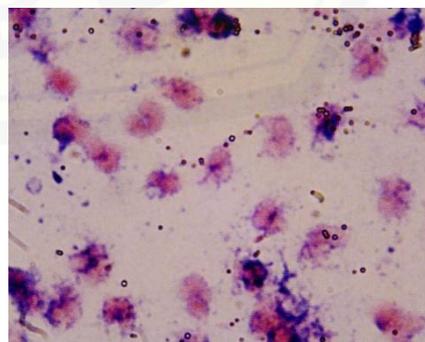
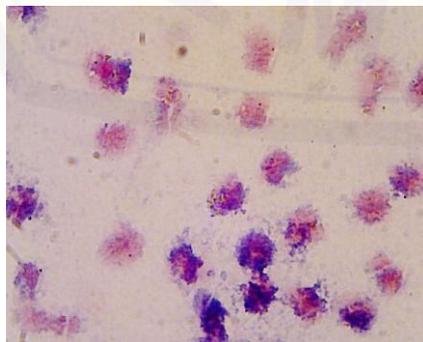


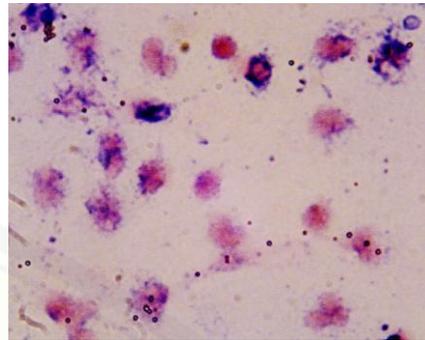
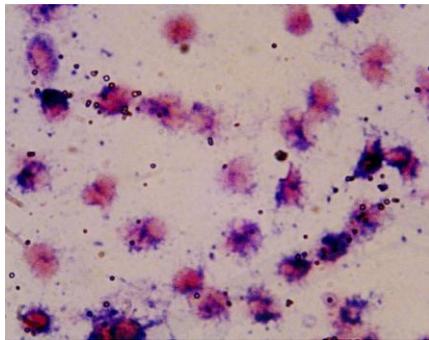


2) Kelompok kontrol (2)

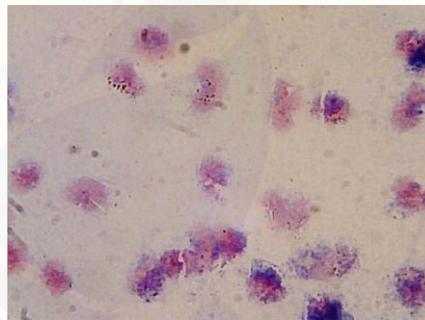
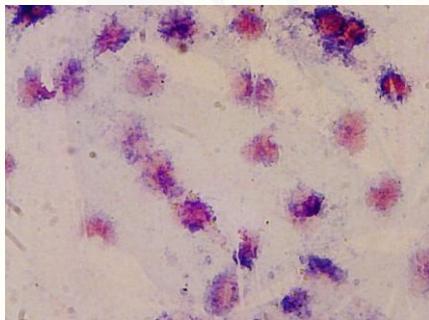
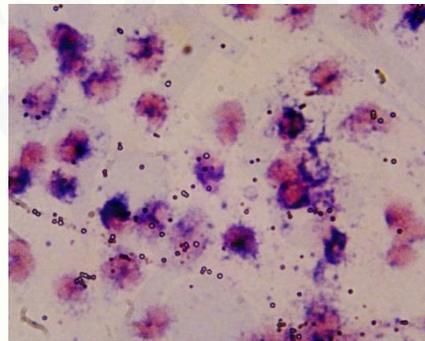
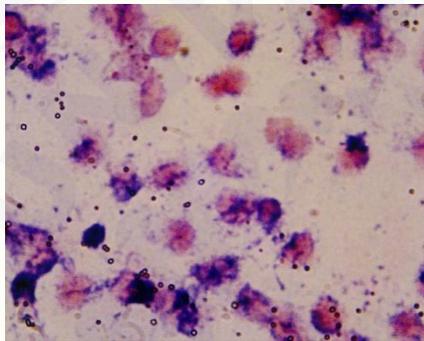


3) Kelompok kontrol (3)





4) Kelompok kontrol (4)



Lampiran G. Analisis Data

1. Hasil Uji Normalitas *Saphiro-Wilk*

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Perlakuan	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Hasil	Kelompok Kopi 1	.153	4	.	.999	4	.997
	Kelompok Kopi 2	.264	4	.	.835	4	.182
	Kelompok Kontrol	.154	4	.	.994	4	.977

a. Lilliefors Significance Correction

2. Hasil Uji Homogenitas *Levene test*

Test of Homogeneity of Variances				
Hasil				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
.159	2	9	.855	

3. Hasil Uji *One Way Anova*

ANOVA					
Hasil					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6347.167	2	3173.583	187.920	.000
Within Groups	151.991	9	16.888		
Total	6499.158	11			

4. Hasil Uji LSD (*Least Significant Difference*)**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Hasil

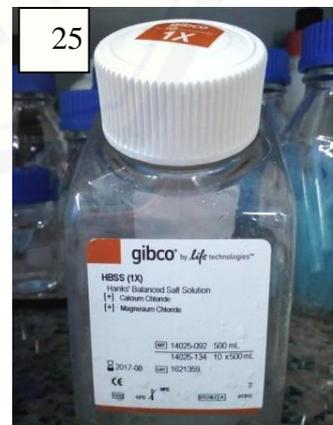
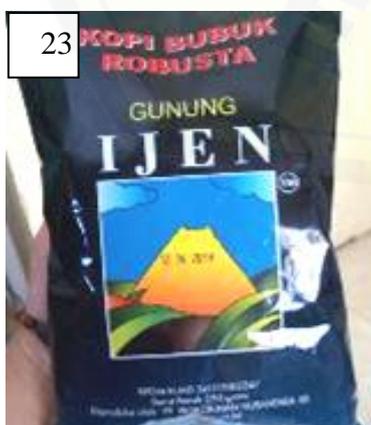
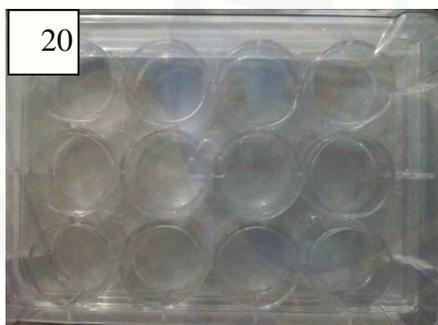
LSD

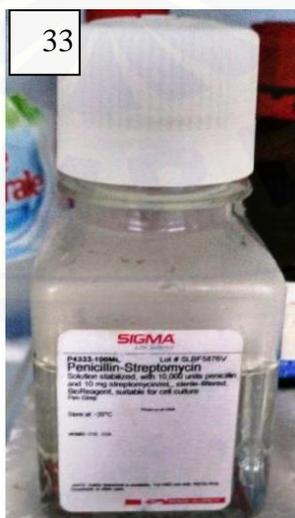
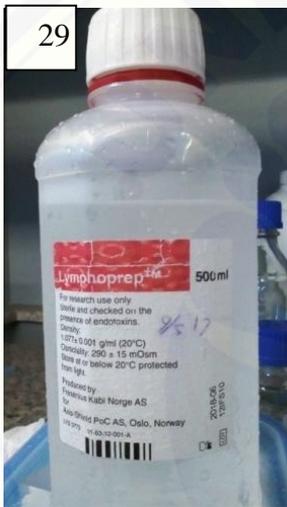
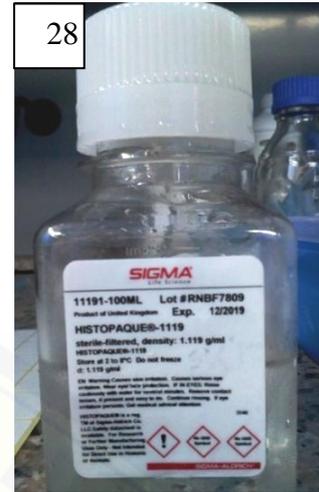
(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok Kopi 1	Kelompok Kopi 2	9.25000*	2.90585	.011	2.6765	15.8235
	Kelompok Kontrol	-43.50000*	2.90585	.000	-50.0735	-36.9265
Kelompok Kopi 2	Kelompok Kopi 1	-9.25000*	2.90585	.011	-15.8235	-2.6765
	Kelompok Kontrol	-52.75000*	2.90585	.000	-59.3235	-46.1765
Kelompok Kontrol	Kelompok Kopi 1	43.50000*	2.90585	.000	36.9265	50.0735
	Kelompok Kopi 2	52.75000*	2.90585	.000	46.1765	59.3235

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran H. Foto Alat dan Bahan







Keterangan Gambar :

1. Autoclave
2. Oven (Binder)
3. Inkubator shaker (LabTech, Daihan LabTech Co.,LTD.)
4. Centifuse (Eppendorf, Centrifuge 5810 R)
5. Neraca digital
6. Mikroskop *inverted* (Olympus IX51)
7. *Opti lab*
8. *Laminar flow* (Dwyer, Mark XX)
9. *Water bath*
10. Vortex
11. *Hotplate stirrer*
12. Densichek
13. *Micro pipette*
14. *Blue tip*
15. *Yellow tip*
16. Tabung heparin
17. Tabung falcon
18. Bakteri *Streptococcus mutans*
19. *Tourniquet*
20. *Well plate*
21. Tabung tube eppendorf
22. *Filter syringe*
23. Bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen PTPN XII
24. NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*)
25. HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*)
26. Darah vena perifer
27. BHI-B (*Brain Heart Infusion Broth*)
28. Histopaque 1119
29. Lymphoprep

30. Safranin
31. Media kultur RPMI (*Rosewel Park Memorial Institute Media*)
32. Media kultur M.119
33. *Penicilin-Streptomycin*
34. *Fungizone-Amphotericin*



Lampiran I. Foto Penelitian

I.1 Foto Pembuatan Seduhan Kopi, Medium RPMI dan Medium M199, dan Antigen *Streptococcus mutans*



Penyeduhan Bubuk Kopi



Hasil Seduhan Kopi



Hasil Media RPMI (merah muda) & M199 (kuning)



Media BHI-B



Bakteri *Streptococcus mutans*



Penyaringan bakteri dan mediana

I.2 Foto Isolasi Neutrofil



Pengambilan darah



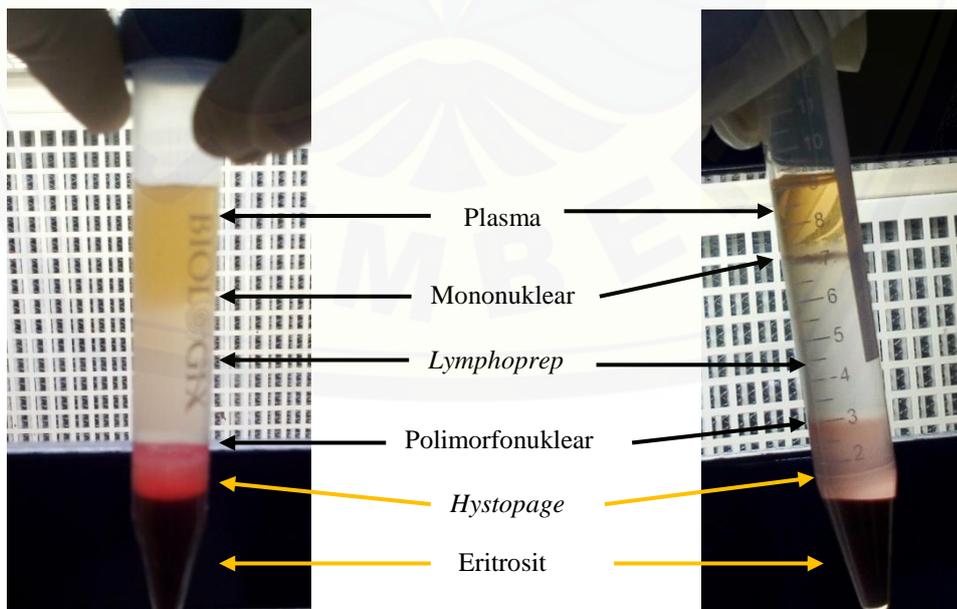
Darah dalam tabung heparin



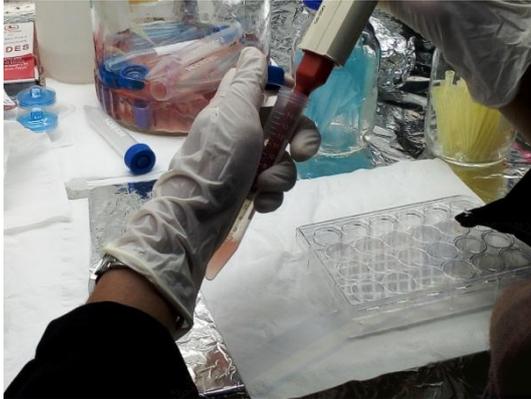
Pelapisan darah diatas hystopage 1119 dan *lymphoprep*



Sentrifugasi 1900 rpm pada suhu 20°C



6 lapisan hasil isolasi neutrofil setelah di sentrifugasi



penempelan sel pada well plate lalu dipapar seduhan kopi dan antigen



Inkubasi 1 jam dalam inkubator shaker pada suhu 37°C

