



EFEK PEMBERIAN GEL EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP JUMLAH SEL MAKROFAG DAN LIMFOSIT JARINGAN GINGIVA PADA MODEL TIKUS PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI *Porphyromonas gingivalis*

SKRIPSI

Oleh

Astrid Ganadya Nurul Iffah

NIM 161610101101

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2020



EFEK PEMBERIAN GEL EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP JUMLAH SEL MAKROFAG DAN LIMFOSIT JARINGAN GINGIVA PADA MODEL TIKUS PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI *Porphyromonas gingivalis*

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Astrid Ganadya Nurul Iffah

NIM 161610101101

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

PERSEMBAHAN

Dengan tulus hati, saya persembahkan skripsi ini untuk:

1. Allah SWT. atas segala rahmat dan ridhoNya dalam setiap aktivitas yang saya lakukan
2. Nabi Muhammad S.A.W yang selalu menjadi panutan dalam beraktivitas
3. Papa Gatot Jumarji Tri Yuana, S.Psi. S.Pd, Mama Nani Widijati, adik Azzahra Ganandya Nurul Firdaus, Nenek Supartiyah, dan keluarga besar yang telah memotivasi, mendukung, dan menyemangati saya
4. Guru dan Dosen yang telah membimbing saya
5. Semua teman – teman FKG angkatan 2016 Universitas Jember dan sahabat terindah Bacrul Ulum
6. Almamater Universitas Jember

MOTO

“Karena sesungguhnya, sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya,
sesudah kesulitan itu ada kemudahan”

(Q.S Al-Insyirah : 5 – 6)

“If you never try, you'll never know”

(penulis)

“Berdoalah saat yang lain enggan untuk meminta.

Karena hanya kepadaNya, segala mimpi dan keinginanmu diberikan”

(penulis)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Astrid Ganadya Nurul Iffah

NIM : 161610101101

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Pemberian Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Jumlah Sel Makrofag dan Limfosit Jaringan Gingiva Model Tikus Periodontitis yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*” adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan di institusi manapun dan buka karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 05 – Mei – 2020
Yang menyatakan,

Astrid Ganadya N.I
NIM. 161610101101

SKRIPSI

EFEK PEMBERIAN GEL EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP JUMLAH SEL MAKROFAG DAN LIMFOSIT JARINGAN GINGIVA PADA MODEL TIKUS PERIODONTITIS YANG DIINDUKSI *Porphyromonas gingivalis*

oleh

Astrid Ganadya Nurul Iffah

161610101101

Pembimbing

Dosen pembimbing utama : drg. Tantin Ermawati, M.Kes.

Dosen pembimbing anggota : drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MDS.

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Jumlah Sel Makrofag dan Limfosit Jaringan Gingiva Model Tikus Periodontitis yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*” ini telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

hari : Selasa
tanggal : 05 – Mei – 2020
tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Utama

Dosen Penguji Pendamping

drg.Zahara Meilawaty, M.Kes
NIP.198005272008122002

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

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

drg.Tantin Ermawati, M.Kes
NIP.198003222008122003

drg.Rendra Chriestedy Prasetya.,MD.Sc
NIP.198305312008011003

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Efek Pemberian Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Jumlah Sel Makrofag dan Limfosit Jaringan Gingiva Model Tikus Periodontitis yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*; Astrid Ganadya Nurul Iffah, 161610101101, 67 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyakit periodontal didefinisikan sebagai kondisi inflamasi dari gingiva, kerusakan tulang alveolar dan ligamen periodontal. Bakteri dominan yang menyebabkan periodontitis yaitu *Porphyromonas gingivalis*. *P. gingivalis* merupakan bakteri gram negatif anaerob yang memiliki komponen endotoksin yaitu lipopolisakarida yang dapat mengikat reseptor CD14/TLR-4 untuk meningkatkan sekresi sitokin proinflamatori. Sel radang yang berperan penting dalam respon inflamasi antara lain makrofag dan limfosit. Makrofag merupakan sel mononuklear yang berperan dalam sistem pertahanan tubuh. Jumlah makrofag yang tinggi dapat menyebabkan destruksi pada jaringan periodontal yang lebih lanjut. Selain itu, terdapat limfosit yang berperan dalam inflamasi kronis. Jumlah limfosit yang berlebihan pada saat terjadi inflamasi dapat menyebabkan kerusakan pada kolagen, fibronektin, dan laminin yang berkontribusi pada destruksi lokal dari jaringan gingiva. Obat – obatan yang sering digunakan dalam terapi periodontitis dalam bentuk obat topikal dalam bentuk sediaan gel salah satunya gel Aloclair™ yang berbahan dasar *Aloe Vera*. Gel ini mengandung *acetylated mannan* untuk menghambat metabolisme asam arakidonat melalui jalur siklooksigenase. Saat ini telah dikembangkan gel yang berbahan dasar ekstrak biji kopi yang digunakan sebagai alternatif terapi. Kopi merupakan bahan alam yang telah terbukti sebagai antiinflamasi karena adanya senyawa antara lain flavonoid, polifenol, dan proantosianidin.

Ekstrak biji kopi robusta diperoleh dengan metode ekstraksi dengan menggunakan etanol 96%. Ekstrak biji kopi robusta selanjutnya dibuat sediaan gel 0,025 g/mL dan 0,05 g/mL dengan menambahkan basis gel dan diaduk hingga homogen. Sampel terdiri dari 20 tikus yang terbagi dalam 5 kelompok. Kelompok

dibedakan berdasarkan perlakuan yaitu kelompok kontrol, kelompok periodontitis, kelompok gel aloclair, kelompok gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL dan kelompok gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL. Setelah itu dilakukan dekaputasi pada hari ke-8 setelah perlakuan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah makrofag dan limfosit pada kelompok perlakuan pada hari ke tujuh. Terjadi penurunan jumlah makrofag dan limfosit pada kelompok gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL dan 0,05 g/mL. Penurunan jumlah makrofag dan limfosit tertinggi pada kelompok perlakuan gel Aloclair. Berdasarkan analisis statistik yang telah dilakukan, bahwa gel Aloclair lebih mampu menurunkan jumlah sel makrofag dan limfosit dibandingkan pada kelompok gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL dan 0,05 g/mL. Pada kelompok gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL dan 0,05 g/mL menunjukkan penurunan jumlah makrofag yang signifikan dibandingkan dengan kelompok periodontitis ($p < 0,05$). Sedangkan, kelompok gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL menunjukkan penurunan jumlah sel limfosit yang signifikan dibandingkan kelompok periodontitis ($p < 0,05$).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian gel ekstrak biji kopi robusta dapat menurunkan jumlah sel makrofag dan limfosit pada gingiva tikus periodontitis yang diinduksi *P.gingivalis*. Hal tersebut menyebabkan terjadinya keseimbangan jumlah makrofag dan limfosit yang dapat menurunkan efek destruktifnya.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah swt. atas segala rahmat, ridho, barokah dan karunia Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Jumlah Sel Makrofag dan Limfosit Jaringan Gingiva Model Tikus Periodontitis yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*”. Skripsi ini disusun guna 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 terimakasih kepada:

1. Dr.Ir. Iwan Taruna, M.Eng., selaku rektor Universitas Jember.
2. drg.R.Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp.Prost., selaku dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
3. drg.Tantin Ermawati, M.Kes. dan drg.Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc. selaku dosen pembimbing utama dan dosen pembimbing pendamping yang telah membimbing saya dengan sabar dan telaten.
4. drg.Zahara Meilawaty, M.Kes. dan drg.Dessy Rachmawati, M.Kes.,Ph.D. selaku dosen penguji utama dan dosen penguji pendamping.
5. Gatot Jumarji Tri Yuana, S.Psi.,S.Pd. papa sebagai motivator hidup saya, mama Nani Widijati yang selalu mendukung saya, adik tersayang Azzahra Ganandya Nurul Firdaus. Seluruh staff di FKG Universitas Jember yang telah membantu dalam proses penyelesaian skripsi ini.
6. Bacrul Ulum sebagai sahabat terindah dan selalu ada dalam membantu penyelesaian skripsi ini.
7. Sahabat tersayang Pintan, Julia dan Yumna. Terimakasih atas dukungan, doa, motivasi dan semangat dari kalian.
8. Teman – teman sepenelitian kopi Favinas, Ghafran dan Rizky.
9. Teman penelitian di histologi

10. Seluruh teman – teman seperjuangan FKG Universitas Jember angkatan 2016 “Dextra”, teman tutorial, dan KKN 135 desa Gudang Situbondo 2019 terimakasih atas doa dan dukungan kalian semua.
11. Staf histologi dan biomedik, Bu Nur, Mas Agus dan Bu Wahyu yang sudah membantu selama penelitian.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan dalam ilmu pendidikan khususnya di bidang ilmu kesehatan.

Jember, 05 Mei 2020

Penulis

DAFTAR ISI

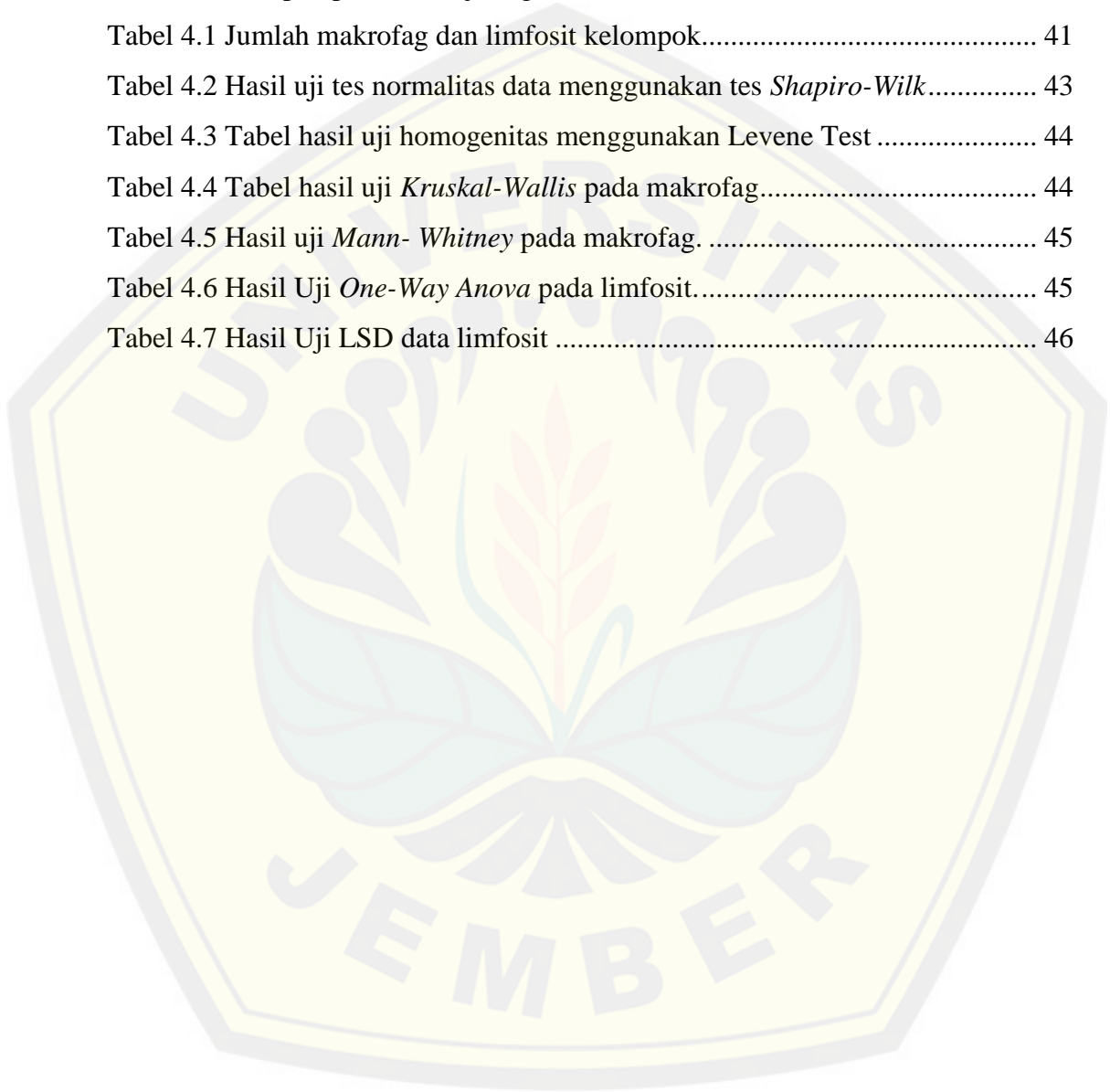
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan	3
1.4. Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Periodontitis	5
2.1.1 Definisi dan Prevalensi Periodontitis	5
2.1.2 Etiologi Periodontitis	6
2.1.3 Patogenesis Periodontitis	6
2.2 Kopi Robusta.....	7
2.2.1 Definisi Botani dan Klasifikasi Kopi Robusta	7
2.2.2 Struktur Biji Kopi Robusta	8
2.2.3 Kandungan Biji Kopi Robusta	9
2.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	10
2.3.1 Klasifikasi <i>Porphyromonas gingivalis</i>	10
2.3.2 Karakteristik <i>Porphyromonas gingivalis</i>	11
2.3.3 Mekanisme Perlekatan <i>Porphyromonas gingivalis</i> Terhadap Inang.....	12
2.3.4 Respon Imun terhadap <i>Porphyromonas gingivalis</i>	12

2.4	Makrofag.....	14
2.4.1	Definisi Makrofag.....	14
2.4.2	Pembentukan Makrofag.....	15
2.4.3	Distribusi Makrofag pada Gingiva.....	16
2.4.4	Fungsi Makrofag.....	16
2.5	Limfosit.....	18
2.5.1	Definisi Limfosit.....	18
2.5.2	Jenis Limfosit.....	19
2.5.3	Fungsi Limfosit.....	21
2.6	Hubungan antara Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>C.canephora</i>) terhadap Periodontitis.....	22
2.7	Hipotesis.....	23
2.8	Kerangka Konseptual.....	24
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	25
3.1.	Jenis dan Rancangan Penelitian.....	25
3.2.	Tempat dan Waktu Penelitian.....	25
3.2.1	Tempat penelitian.....	25
3.2.2	Waktu penelitian.....	25
3.3.	Sampel Penelitian.....	26
3.3.1	Besar Sampel Penelitian.....	26
3.3.2	Kriteria Sampel Penelitian.....	27
3.4.	Identifikasi Variabel Penelitian.....	27
3.4.1	Variabel Bebas.....	27
3.4.2	Variabel Terikat.....	27
3.4.3	Variabel Terkendali.....	27
3.5.	Definisi Operasional.....	28
3.5.1	Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>).....	28
3.5.2	Model Tikus Periodontitis.....	28
3.5.3	Jumlah Sel Makrofag.....	28
3.5.4	Jumlah Sel Limfosit.....	28
3.6.	Alat dan Bahan Penelitian.....	28
3.6.1	Alat Penelitian.....	28
3.6.2	Bahan Penelitian.....	29
3.7	Prosedur Penelitian.....	29
3.7.1	Ethical Clearance.....	29

3.7.2	Persiapan Hewan Coba	29
3.7.3	Pembagian Kelompok Hewan Coba	30
3.7.4	Pembuatan Suspensi <i>P.gingivalis</i>	30
3.7.5	Pembuatan Model Tikus Periodontitis	31
3.7.6	Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>).....	31
3.7.7	Aplikasi Topikal Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	32
3.7.8	Eutanasia Sampel	33
3.7.9	Tahap Dekalsifikasi Jaringan	33
3.7.10	Pembuatan Sediaan Histologis	34
3.7.11	Tahap Perhitungan Jumlah Makrofag.....	37
3.7.12	Tahap Perhitungan Jumlah Limfosit.....	37
3.8	Analisis Data	37
3.9	Alur penelitian.....	39
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
4.1.	Hasil Penelitian	40
4.2.	Pembahasan.....	46
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	51
5.1.	Kesimpulan	51
5.2.	Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA.....		52
LAMPIRAN.....		59

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Proses Dehidrasi, <i>Clearing</i> , dan Impregnasi.....	34
Tabel 3.2 Tahapan pewarnaan jaringan	36
Tabel 4.1 Jumlah makrofag dan limfosit kelompok.....	41
Tabel 4.2 Hasil uji tes normalitas data menggunakan tes <i>Shapiro-Wilk</i>	43
Tabel 4.3 Tabel hasil uji homogenitas menggunakan Levene Test	44
Tabel 4.4 Tabel hasil uji <i>Kruskal-Wallis</i> pada makrofag.....	44
Tabel 4.5 Hasil uji <i>Mann-Whitney</i> pada makrofag.	45
Tabel 4.6 Hasil Uji <i>One-Way Anova</i> pada limfosit.....	45
Tabel 4.7 Hasil Uji LSD data limfosit	46

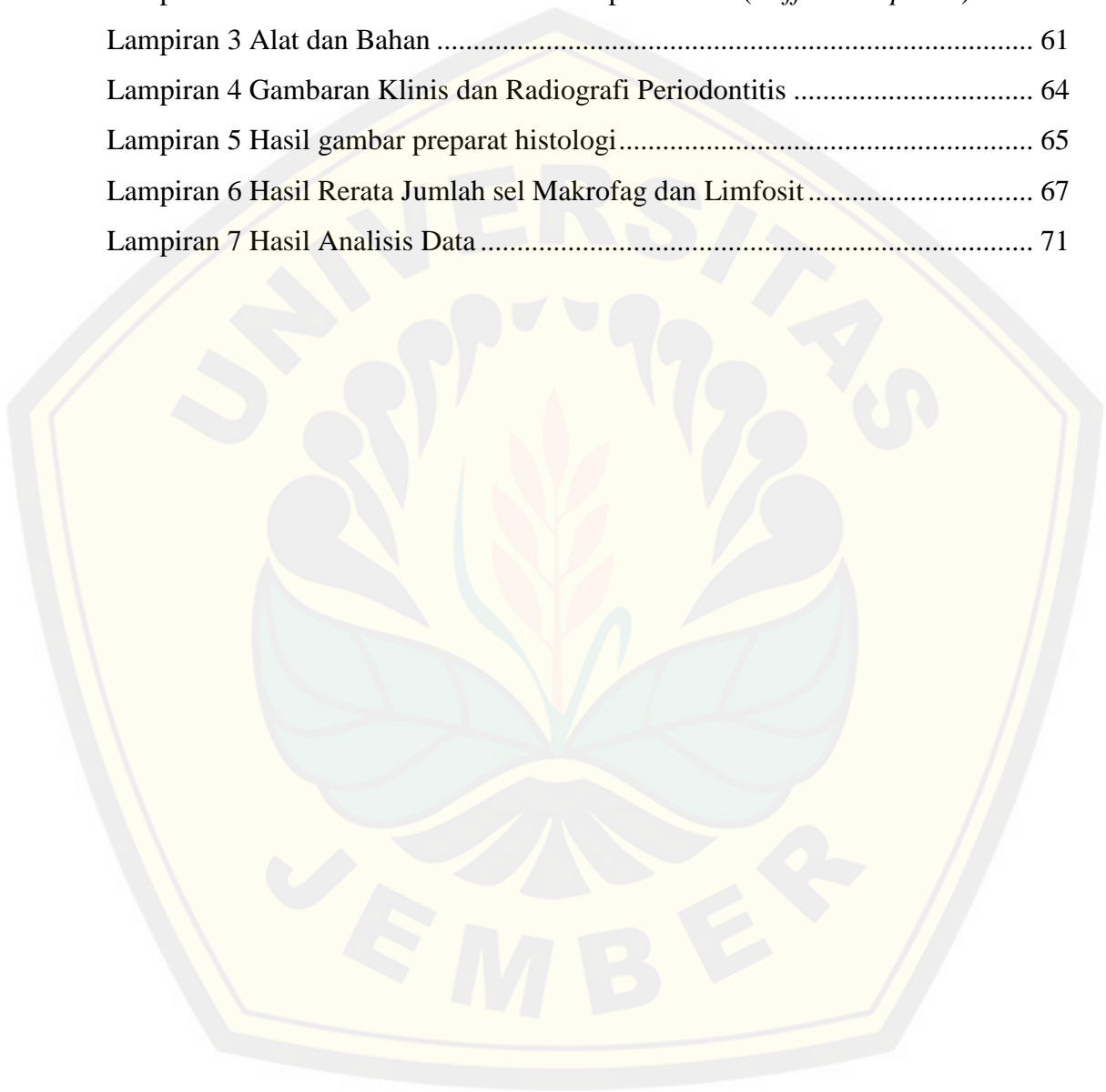


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Buah matang dari tanaman kopi robusta (<i>C.canephora</i>).....	8
Gambar 2.2 Struktur biji kopi robusta.....	9
Gambar 2.3 Gambaran mikroskopis <i>P. gingivalis</i>	11
Gambar 2.4 Sel makrofag secara mikroskopis.....	15
Gambar 2.5 Sel limfosit secara mikroskopis.....	19
Gambar 2.6 Skema kerangka konseptual penelitian	24
Gambar 3.9 Alur Penelitian.....	39
Gambar 4.1 Gambaran mikroskopis makrofag dan limfosit.....	40
Gambar 4.2 Grafik diagram batang jumlah sel makrofag dan limfosit.	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat keterangan <i>Ethical Clearance</i>	59
Lampiran 2 Surat Identifikasi Tanaman Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	60
Lampiran 3 Alat dan Bahan	61
Lampiran 4 Gambaran Klinis dan Radiografi Periodontitis	64
Lampiran 5 Hasil gambar preparat histologi.....	65
Lampiran 6 Hasil Rerata Jumlah sel Makrofag dan Limfosit.....	67
Lampiran 7 Hasil Analisis Data	71



BAB 1.PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit periodontal didefinisikan sebagai kondisi inflamasi dari gingiva, kerusakan tulang alveolar dan ligamen periodontal. Penyakit periodontal dimulai dari gingivitis dan dapat berkembang menjadi periodontitis. Bakteri dominan yang menyebabkan periodontitis yaitu bakteri fakultatif gram negatif atau bakteri anaerob. Bakteri tersebut antara lain, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tanarella forsythia*, *Campylobacter rectus* dan *Porphyromonas gingivalis* (Newman *et al*, 2012).

P. gingivalis merupakan bakteri gram negatif anaerob yang memiliki komponen endotoksin yaitu lipopolisakarida (LPS). LPS dapat mengikat reseptor CD14/ TLR-4 yang meningkatkan sekresi sitokin proinflamatori yaitu IL-1 α , IL-1 β , IL-6 dan IL-8. Selain itu, *P.gingivalis* dapat menempel pada sel epitel melalui kapsular polisakarida dan fimbria yang mampu memodulasi sistem imunitas melalui proses inflamasi. Sel radang yang berperan penting dalam respon inflamasi antara lain makrofag dan limfosit (Newman *et al*, 2012).

Makrofag merupakan sel mononuklear yang berperan dalam sistem pertahanan tubuh. Jumlah sel makrofag pada gingiva sehat yaitu $58,74 \pm 18,56$ sel/ mm² (Golijanin *et al*, 2015). Sedangkan pada saat terjadi inflamasi, terjadi peningkatan yang cukup signifikan pada makrofag yaitu 2,5 kali lebih banyak dan menjadi $116,55 \pm 54,78$ sel/ mm². Makrofag berfungsi untuk menghancurkan mikroorganisme dalam fagolisosom, melepaskan berbagai enzim dan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Senyawa ROS bersifat toksik pada mikroorganisme dan dapat mengaktifkan enzim *matrix metalloproteinase- 8* (MMP-8). MMP – 8 merupakan salah satu enzim proteolitik yang dapat mendestruksi kolagen pada jaringan periodontal (Kumar *et al*, 2018). Sehingga, jumlah makrofag yang tinggi dapat menyebabkan destruksi pada jaringan periodontal yang lebih lanjut.

Limfosit merupakan sel imunitas yang berperan dalam inflamasi kronis. Berdasarkan fungsinya, limfosit dibagi menjadi 2 jenis, yaitu sel limfosit B dan T.

Berdasarkan penelitian Amunulla (2015), jumlah limfosit pada gingiva normal yaitu $12,25 \pm 2,17$ sel/mm², sedangkan pada gingiva yang terjadi inflamasi mengalami peningkatan jumlah yaitu $45,35 \pm 2,43$ sel/mm². Jumlah limfosit yang berlebihan pada saat terjadi inflamasi dapat menyebabkan kerusakan pada kolagen, fibronektin, dan laminin yang berkontribusi pada destruksi lokal dari jaringan gingiva (Figueredo *et al*, 2011). Selain itu, limfosit dalam jumlah banyak dapat menyebabkan terjadinya resorpsi tulang alveolar (Alvarez *et al*, 2018).

Obat anti inflamasi non-steroid dapat digunakan secara topikal sebagai terapi untuk mengatasi proses inflamasi. Beberapa keuntungan dari penggunaan obat secara topikal yaitu untuk menghindari kesulitan dalam absorpsi gastrointestinal akibat aktivitas enzimatik dan pH. Selain itu, aplikasi obat secara topikal memiliki efek yang terlokalisir dan efek samping yang minimal. Salah satu bentuk obat yang diaplikasikan secara topikal yaitu gel (Garg *et al*, 2015).

Gel berbahan dasar kopolimer, poloksamer dan monogliserida menyebabkan bahan obat relatif mudah diaplikasikan dan diserap oleh jaringan. Selain itu, gel memiliki kemampuan biokompatibilitas dan bioavailabilitas yang tinggi sehingga akan memudahkan adhesi pada poket periodontal dan dapat dengan cepat dihilangkan melalui jalur katabolisme sehingga dapat mengurangi resiko reaksi alergi *host* (Garg *et al*, 2015). Contoh penggunaan obat anti inflamasi berbentuk gel saat ini yaitu gel Aloclair™. Gel ini mengandung zat aktif *acetylated mannan* untuk menghambat metabolisme asam arakidonat melalui jalur siklooksigenase sehingga tidak terjadi kerusakan jaringan periodontal yang lebih lanjut pada periodontitis (Singh *et al*, 2011). Saat ini telah dikembangkan gel yang berbahan dasar ekstrak biji kopi yang digunakan sebagai alternatif terapi. Menurut penelitian Xue (2016), ekstrak biji kopi robusta dapat menurunkan jumlah sel makrofag dan limfosit secara *in vitro*.

Kopi merupakan bahan alam yang telah terbukti sebagai antiinflamasi. Berdasarkan data Direktorat Jenderal Perkebunan Indonesia, 2017, produksi kopi di Indonesia mencapai 637,539 kg terutama kopi robusta (Dirjen Perkebunan RI, 2017). Biji kopi robusta mengandung senyawa antioksidan antara lain flavonoid, polifenol, dan proantisianidin (Artho *et al*, 2015). Senyawa polifenol telah

terbukti menunjukkan efek imunomodulator, antioksidan, dan menurunkan adhesi sel imunitas (Tangney *et al*, 2013). Selain itu, terdapat asam klorogenat yang telah terbukti dapat menurunkan infiltrasi makrofag, metabolit asam araknoid termasuk PGE2 dan TNF- α , sehingga berfungsi sebagai anti inflamasi (Hwang *et al*, 2014). Berdasarkan penelitian Ermawati (2013), gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 0,025 g/mL dan 0,05 g/mL pada tikus yang diinduksi periodontitis dapat menurunkan sekresi *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) yang merupakan penyebab terjadinya inflamasi pada periodontitis.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*C.canephora*) terhadap jumlah makrofag dan limfosit jaringan gingiva pada model tikus periodontitis yang diinduksi *P.gingivalis*.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta terhadap jumlah sel makrofag dan limfosit jaringan gingiva pada model tikus periodontitis?

1.3. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta terhadap jumlah sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis.

1.4. Manfaat

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan pengetahuan tentang potensi gel ekstrak biji kopi robusta sebagai antiinflamasi terhadap jumlah limfosit dan makrofag pada model tikus periodontitis.
2. Sebagai informasi kepada masyarakat tentang penggunaan ekstrak biji kopi robusta dalam membantu proses penyembuhan periodontitis sehingga dapat dijadikan alternatif terapi.

3. Hasil penelitian ini dapat dijadikan referensi untuk penelitian gel ekstrak biji kopi robusta terhadap penyakit rongga mulut lainnya.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Periodontitis

2.1.1 Definisi dan Prevalensi Periodontitis

Penyakit periodontal didefinisikan sebagai inflamasi kronis dari gingiva, tulang alveolar, dan ligamen periodontal. Inflamasi ini disebabkan oleh toksin dari bakteri yaitu *Porphyromonas gingivalis*. Toksin bakteri ini menyebabkan kerusakan antara lain resorpsi tulang alveolar, resesi gingiva dan kerusakan ligamen periodontal sehingga mengakibatkan kegoyangan pada gigi geligi (Prasetya, 2013). Periodontitis diklasifikasikan sebagai periodontitis kronis yang umum dimana melibatkan lebih dari 10 gigi dan disebut sebagai periodontitis kronis lokal ketika kurang dari 10 gigi yang terlibat (Newman *et al*, 2012).

Prevalensi periodontitis terjadi pada orang dewasa, namun tidak menutup kemungkinan terjadi pada anak-anak dan usia remaja. Menurut data penelitian Notohartoyo (2010), prevalensi untuk jaringan periodontal sehat sebesar 4,79% sedangkan jaringan tidak sehat sebesar 95,21%. Berdasarkan data Departemen Kesehatan Republik Indonesia tahun 2011, prevalensi penyakit periodontal di Indonesia menduduki tingkat kedua penyakit gigi dan mulut yaitu sebesar 60% terutama periodontitis (Depkes RI, 2011).

Faktor utama penyebab penyakit periodontal adalah bakteri plak dan didukung oleh faktor predisposisi lokal seperti akumulasi plak, kalkulus dan faktor iatrogenik. Periodontitis dimulai dengan adanya gingivitis, inflamasi lokal dari gingiva yang diakibatkan oleh bakteri plak (mikrobal biofilm yang menempel pada gingiva dan gigi) (Chappel *et al*, 2018). Gingivitis yang tidak dilakukan perawatan maka akan menyebar ke jaringan periodontal lain yang berakibat resorpsi tulang alveolar, ligamen periodontal yang putus, resesi gingiva, terbentuk poket periodontal, mobilitas gigi yang meningkat hingga kehilangan gigi (Singh *et al*, 2013).

2.1.2 Etiologi Periodontitis

Etiologi dari periodontitis yaitu akumulasi dari dental plak. Dental plak merupakan ekosistem unik yang terdapat pada permukaan gigi dengan mikroorganisme terperangkap pada lapisan biofilm dari saliva. Biofilm merupakan lapisan basal yang tipis pada bagian substratum dan membutuhkan pelikel enamel untuk melekat. Bakteri yang terdapat pada biofilm ini akan membentuk lapisan protein dan enzim yang dapat menginduksi inflamasi jaringan periodontal (Dumitrescu *et al*, 2010).

Mikroorganisme yang dapat menempel pada biofilm tersebut dapat berupa bakteri, spiroceta, dan virus. Beberapa spesies bakteri antara lain *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Streptococcus intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus mikro*, *Fusbacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens* dan yang paling dominan adalah *Porphyromonas gingivalis* (Kinane *et al*, 2017).

2.1.3 Patogenesis Periodontitis

Terjadinya periodontitis dimulai ketika faktor virulensi dari *P.gingivalis* yaitu lipopolisakarida (LPS) dikenali oleh *Toll-Like Receptor-4* (TLR-4) pada sel epitel. TLR4 memainkan peranan penting dalam mengenali komponen yang dimiliki oleh *P.gingivalis* antara lain kapsul, fimbria dan LPS. TLR4 dapat ditemukan di jaringan gingiva pada sel epitel, fibroblas dan sel dendritik.

Selanjutnya, sel epitel yang merupakan *barrier* utama yang melawan bakteri akan memproduksi sitokin, kemokin dan peptida antimikrobal dimana akan menginduksi rekrutmen dari sel inflamasi menuju ke daerah yang terinflamasi (Dumitrescu *et al*, 2010). Selain itu, sel epitel dapat menstimulasi sel residen seperti makrofag, fibroblas, dan sel mast untuk memproduksi PGE-2, sitokin pro-inflamasi (IL-1 β , TNF- α , IL-6, dan IL-12), histamin dan leukotrien (Ermawati *et al*, 2019).

Mediator seperti IL-1 β , TNF- α dan histamin dapat menyebabkan aktivasi sel endotel pembuluh darah di sekitar daerah gingiva sehingga mengekspresikan molekul *P-selectin*. Molekul ini menyebabkan jarak antar sel endotel merenggang,

sehingga monosit dalam jumlah banyak akan bermigrasi menuju daerah yang terinflamasi dan berdiferensiasi menjadi makrofag (Mariano *et al*, 2010).

Pada respon inflamasi kronis, makrofag bertindak sebagai *Antigen Presenting Cells* (APC). APC merupakan sel yang memproses antigen, memotongnya menjadi peptida-peptida kecil, dan mempresentasikannya pada sel limfosit yang masih belum aktif. Sehingga, pada saat terjadi konjugasi antara MHC kelas II dan APC maka sel limfosit T akan menjadi aktif (Alvarez *et al*, 2018).

2.2 Kopi Robusta

2.2.1 Definisi Botani dan Klasifikasi Kopi Robusta

Klasifikasi tanaman kopi robusta yaitu :

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Magnoliophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Subkelas : *Asteridae*

Ordo : *Rubiales*

Famili : *Rubiaceae*

Genus : *Coffea*

Spesies : *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (USDA, 2019)

Kopi merupakan jenis tanaman yang tumbuh di daerah tropis kecuali pada tempat dengan temperatur terlalu tinggi maupun terlalu rendah. Tanaman kopi dapat tumbuh pada ketinggian sekitar 600–700m diatas permukaan laut dengan temperatur 20°–24°C (Anshori, 2014). Terdapat 4 jenis kopi yang dikenalkan di Indonesia antara lain kopi arabika (*Coffea arabica*), kopi liberika (*Coffea liberica*), kopi robusta (*Coffea canephora*) dan kopi excelsa (*coffea dewevrei*) (Artho *et al*, 2015).

Tanaman ini berbentuk pohon yang tumbuh tegak, bercabang, dan dapat mencapai ketinggian 12m. Daunnya memiliki morfologi yang lebar dan tipis. Bagian tepinya bergelombang dan tumbuh pada cabang, batang dan ranting. Setelah kurang lebih 2 tahun, tanaman kopi akan berbunga dimana tersusun dalam

kelompok buku–buku cabang dengan mahkota berwarna putih dan kelopak berwarna hijau muda (Artho *et al*, 2015).

Buah kopi mentah berwarna hijau dan ketika matang berwarna merah menyala hingga merah tua. Buahnya terdiri dari biji dan daging. Pada daging terdapat 3 lapisan yaitu, lapisan kulit luar (eksokarp), daging buah (mesokarp) dan kulit tanduk (endokarp). Daging buah ketika matang mengandung lendir dan senyawa gula sehingga rasanya akan manis. Sedangkan pada bagian biji, berbentuk agak bulat dengan lengkungan biji yang tebal (Anshori, 2014).

Pada gambar 2.1, terlihat bahwa pada biji kopi robusta yang matang kulitnya berwarna merah tua. Buahnya cenderung membulat dan tidak mudah rontok dari tangkainya. Selain itu, kopi yang telah matang memiliki kandungan senyawa gula yang lebih tinggi (De Kochko *et al*, 2010).



Gambar 2.1 Buah matang dari tanaman kopi robusta (*C.canephora*)

(De Kochko *et al*, 2010).

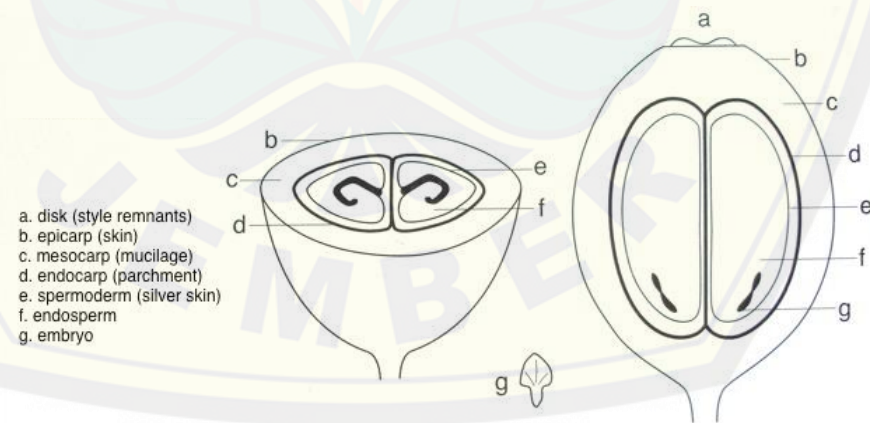
2.2.2 Struktur Biji Kopi Robusta

Biji kopi berbentuk seperti telur (*egg-shaped*), datar dengan sedikit kecembungan, dan memiliki alur longitudinal pada permukaan bidang. Penutup luar dari biji dibentuk oleh endokarp berwarna coklat pucat yang apabila sudah mengalami pengeringan menjadi *parchment*. Endokarp mengandung lapisan tertutup yang memiliki warna hijau tipis yang dikenal sebagai spermoderma atau kulit perak yang merupakan sisa dari perisperma. Pada biji kopi robusta, spermoderma melekat dan berwarna coklat. Ukuran biji kopi robusta bervariasi mulai panjang 10–18 mm dengan lebar 6,5–9,5 mm. Sedangkan spesies lain

seperti *C.racemosa* memiliki ukuran panjang 5–7 mm dengan lebar 3–3,5mm (Eira *et al*, 2006).

Endosperma merupakan jaringan hidup yang memiliki dua regio yang mengelilingi embrio yaitu regio eksternal keras dan internal lunak. Bagian dari endosperma yang berada di depan ujung radikula disebut sebagai penutup endosperma (mikropilaris) dan lainnya disebut sebagai endosperma lateral. Jaringan endosperma memiliki kandungan polisakarida yang tinggi. Dinding selnya terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan gula yang tidak larut yaitu manosa. Endosperma lateral sangat keras karena terdiri dari manosa yang terdeposit membentuk lapisan yang tebal. Sejumlah protein, lemak dan mineral tersimpan di sitoplasma endosperma dan digunakan sebagai makanan cadangan untuk pertumbuhan embrio (Eira *et al*, 2006).

Buah kopi robusta memiliki struktur anatomi (gambar 2.2) yang terdiri dari diskus, epikarp, mesokarp, endokarp, spermoderma, endosperma dan embrio. Warna epikarp (kulit) pada awal perkembangannya bewarna hijau karena adanya kloroplas yang terlepas ketika buah telah matang. Selain itu, terdapat endosperma yang merupakan bakal buah. Kandungan senyawa dari endosperma terdiri dari kafein, trigonelin, saponin dan lain – lain.



Gambar 2.2 Struktur biji kopi robusta. (Eira *et al*, 2006)

2.2.3 Kandungan Biji Kopi Robusta

Komposisi kimia biji kopi bergantung pada jenis kopi, tanah tumbuh dan cara pengolahannya. Kopi mengandung senyawa yang berfungsi sebagai

antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri. Kandungan biji kopi robusta secara umum terbagi menjadi dua yaitu alkaloid dan polifenol (Patay *et al*, 2016).

Alkaloid memiliki minimal satu unsur atom nitrogen yang bersifat basa dan merupakan bagian dari cincin heterosiklik. Kafein (*3,7 dihidro-1, 3, 7-trimethyl-1H-purine-2,6-dione*) merupakan bagian dari alkaloid yang penting dan terdapat pada seluruh bagian tanaman kopi. Kafein dapat menjadi stimulator pada sistem persarafan sentral, mencegah kelelahan, dan meningkatkan aktivitas motorik. Selain itu kafein juga memiliki sifat antibakteri dan antioksidan. Sebagai antibakteri, kafein dapat meningkatkan kekebalan imunitas terhadap invasi bakteri melalui peningkatan konsentrasi dari sel imunokompeten dan memperkuat aktivitas enzim lisozim (Pruthviraj *et al*, 2011).

Polifenol merupakan senyawa pada biji kopi robusta yang terdiri dari dua struktur kerangka logam pada cincin aromatiknya yaitu, *hydroxycinnamic* (hidroksisinamat) dan *hydroxybenzoic* (hidroksibenzoat). Asam klorogenat atau nama lainnya *5-O-caffeolquinic acid* (5-CQA) termasuk keluarga dari ester polifenol yang terbentuk dari penggabungan asam kuinat dan trans-sinamat, umumnya kafeik p-kumarik dan asam ferulat (Ayelign *et al*, 2013). Fungsi dari asam klorogenat pada tanaman kopi yaitu untuk melindungi tanaman dari mikroorganisme, serangga dan radiasi ultraviolet (Watanabe *et al*, 2004). Sedangkan untuk manusia, berfungsi sebagai antioksidan, antivirus, hepatoprotektif dan antispasmodik (Farhaty, 2016). Sebagai antioksidan, asam klorogenat dapat mendonasikan atom hidrogen untuk menurunkan radikal bebas dan menghambat reaksi oksidasi (Liang *et al*, 2015). Selain itu, sebagai antiinflamasi, asam klorogenat telah terbukti dalam menurunkan infiltrasi dari makrofag secara in vitro (Xue *et al*, 2016).

2.3 *Porphyromonas gingivalis*

2.3.1 Klasifikasi *Porphyromonas gingivalis*

Taksonomi dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*

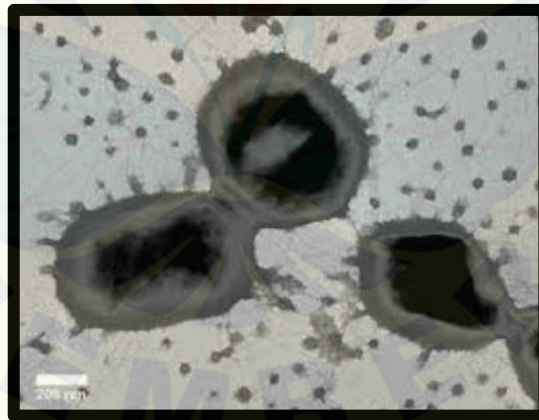
Subkingdom : *Negibacteria*

Filum : *Bacterioidetes*

Kelas	: <i>Bacteroidia</i>
Ordo	: <i>Bacteroidales</i>
Famili	: <i>Porphyromonadaceae</i>
Genus	: <i>Porphyromonas</i>
Spesies	: <i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>Bacterial Nomenclature</i> , 2012)

2.3.2 Karakteristik *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis merupakan bakteri gram negatif anaerob yang tidak memiliki alat gerak (*non-motile*) dan bersifat asakarolitik. Bakteri ini berbentuk coccobacillus dengan panjang 0,5–2 μm . Pada medium blood agar, bakteri ini tampak lembut, cembung dan berkilau dimana pada 1–2 mm di dalam garis tengah dan menggelap dari tepi koloni (Gambar 2.3). Perubahan warna koloni dapat terjadi menjadi kehitaman akibat produksi dari *protohaem*. Untuk pertumbuhannya, dibutuhkan temperatur maksimal yaitu 37°C. Pertumbuhan yang signifikan dari bakteri ini dipengaruhi oleh adanya karbohidrat (How *et al*, 2016).



Gambar 2.3 Gambaran mikroskopis *P. gingivalis* (Zhang, 2016)

2.3.3 Mekanisme Perlekatan *Porphyromonas gingivalis* Terhadap Inang

Perlekatan *P.gingivalis* dibantu dengan faktor virulensi yang berhubungan dengan destruksi jaringan dan mekanisme pertahanan terhadap sel inang yang meliputi :

1. Kapsular polisakarida dapat berperan sebagai adesin mikroba terhadap sel inang. Selain itu, dapat menurunkan fagositosis dan kemotaksis oleh sel imun (Nakayama *et al*, 2017).
2. Lipopolisakarida (LPS) merupakan faktor virulensi yang penting pada bakteri periodontopatogen karena dapat mengaktifasi respon inflamasi dari host, meningkatkan resorpsi tulang dan degradasi imunoglobulin. Selain itu, LPS dapat meningkatkan produksi IL-1 dan IL-8 yang berperan dalam patogenesis periodontitis (Nakayama *et al*, 2017).
3. Fimbria merupakan perantara dalam perlekatan bakteri ke substrat yang tersedia dan perlekatan antara bakteri dengan membran terluar dari host (Pierce *et al*, 2009).
4. Kolagenase berfungsi dalam mendegradasi inhibitor plasma protease yang mengakibatkan destruksi dari jaringan periodontal (How *et al*, 2016).
5. Protease, terutama arginin-spesifik atau gingipain, dapat mendegradasi komponen matriks ekstraseluler termasuk ikatan antara integrin dan fibronektin, sitokin, imunoglobulin, kolagen dan faktor komplemen. Selain itu, dapat mendegradasi protein heme yang berkontribusi dalam menghambat koagulasi darah dan meningkatkan perdarahan. Hal tersebut mengakibatkan peningkatan bioavailabilitas hemin untuk pertumbuhan bakteri (Nakayama *et al*, 2017).

2.3.4 Respon Imun terhadap *Porphyromonas gingivalis*

Induksi dan perkembangan kerusakan jaringan periodontal merupakan proses yang kompleks yang melibatkan akumulasi plak, pelepasan material bakteri dan respon inflamasi. Bakteri *P.gingivalis* dapat memproduksi faktor virulensi yang menembus gingiva dan menyebabkan kerusakan jaringan akibat induksi inflamasi pada host. Patogen tersebut harus mengatasi pertahanan

eksternal pada host sebelum menempati lingkungan yang sesuai untuk berkolonisasi agar tetap bertahan hidup. Maka dari itu, terdapat macam-macam faktor virulensi dari *P.gingivalis* antara lain LPS, fimbria, kapsul dan lain-lain (How *et al*, 2016).

Selain itu, bakteri ini memiliki kemampuan dalam mempertahankan diri melalui tiga mekanisme, yaitu 1). menghambat fusi lisosom dengan fagosom yang berisi bakteri pada sel fagosit, 2). lipid mikrobakterial seperti lipoarabinomanan dapat menghalangi pembentukan oksigen reaktif, 3). dapat menghindari perangkap fagosom dengan menggunakan lisin sehingga bakteri dapat hidup bebas dalam sitoplasma makrofag (Amano *et al*, 2003).

Fungsi sel epitel sebagai pertahanan fisik utama dalam melawan patogen dan dapat menginduksi respon sistem imunitas *innate* maupun *acquired*. LPS dapat mengikat TLR-4 pada monosit dan mempresentasikannya pada limfosit. Infiltrasi dari neutrofil, granulosit dan limfosit pada daerah lesi periodontal dapat mengakibatkan penggumpalan dan pembunuhan dari bakteri tergantung tingkat invasi dari bakteri terhadap jaringan periodontal.

Monosit dari pembuluh darah akan menginfiltrasi jaringan dan berkembang menjadi makrofag. Makrofag memproduksi sitokin proinflamasi yang menyebabkan kerusakan pada jaringan antara lain *Interleukin-1* (IL-1), *Interleukin-6* (IL-6), prostaglandin-E2 (PGE2), dan TNF- α . Selain itu, makrofag dapat membentuk pre-osteoklas yang ketika matang menjadi osteoklas akibat respon dari TNF- α dan *Receptor Activator NF- κ B Ligand* (RANKL) (Lindberg, 2013). Jika kondisi ini berlangsung kronis, maka dapat menyebabkan diferensiasi makrofag menjadi osteoklas sehingga terjadi resorpsi tulang alveolar, degradasi ligamen periodontal oleh *matriks metalloproteinnase* (MMP) dan pembentukan jaringan granulasi (Kinane *et al*, 2017).

Pada respon inflamasi kronis, limfosit akan lebih banyak menginfiltrasi jaringan dimana merupakan salah satu sel darah putih yang dominan dalam degradasi jaringan pada saat terjadi gingivitis dan periodontitis. Limfosit memproduksi berbagai sitokin antara lain IL-1, IL-6, IL-17, RANKL, dan TNF- α (Cekici *et al*, 2014). Produksi yang berlebihan dari RANKL akan menyebabkan

resorpsi tulang alveolar. Selain itu, pada saat limfosit telah mencapai jaringan yang terinflamasi, maka sel B akan bertransformasi menjadi sel B plasma yang akan menghasilkan sejumlah antibodi (Kinane *et al*, 2017).

Titik dari respon imun terletak pada peran dan fungsi dari limfosit T, terutama pada sel T CD4⁺. Setelah diproses oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) seperti makrofag, sel Langerhans dan sel dendritik, antigen akan dipresentasikan pada sel T4. Setelah teraktivasi, maka sel T4 akan memicu respon imun yang lebih kompleks baik seluler maupun humoral. Aktivasi dari sel T4 dibutuhkan minimal dua sinyal, yaitu untuk mengikat reseptor antigen sel T pada kompleks antigen MHC kelas II yang berada di permukaan APC dan sinyal kedua berasal dari IL-1 yang dihasilkan oleh APC. Selanjutnya, sel T4 akan menginduksi aktivasi sel T8 untuk menghancurkan sel-sel asing, sel T memori yang menyimpan kode dari antigen dimana apabila antigen ini masuk ke dalam tubuh untuk kedua kalinya atau seterusnya maka akan direspon imunitas tubuh lebih cepat dan sel B sebagai mediator imunitas humoral (Amano *et al*, 2003).

Respon imun spesifik terhadap bakteri *P.gingivalis* diperantarai oleh sel T yang sangat penting dalam mengatasi organisme intraseluler. Sel T4 akan berikatan pada partikel antigen yang telah dipresentasikan pada permukaan makrofag oleh MHC kelas II yang telah terinfeksi bakteri tersebut. Selanjutnya akan teraktivasi sel T helper antara lain Th1, Th2 dan Th17. Th1 akan mensekresikan sitokin yang menginduksi teraktivasinya makrofag dan membunuh organisme intraseluler melalui pembentukan oksigen reaktif dan nitrit oksida yang merupakan radikal bebas dalam membunuh bakteri (Kinane *et al*, 2017).

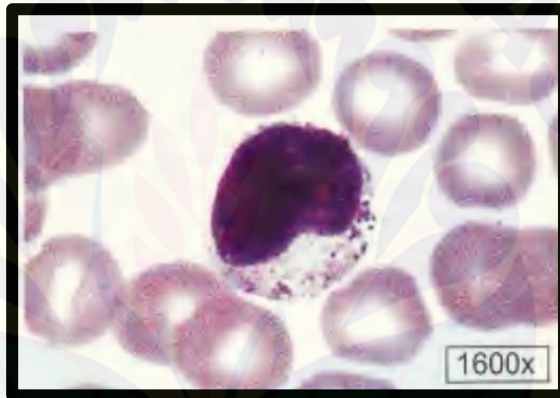
2.4 Makrofag

2.4.1 Definisi Makrofag

Menurut Dorlan (2002), makrofag termasuk *mononuclear phagocyte system* yang disebut dengan *Reticulo Endothelial System* (RES) dimana merupakan suatu istilah untuk sel yang fagosit yang tersebar diseluruh jaringan dalam tubuh antara lain hati, limpa, nodus limfatikus, sumsum tulang, dan lain-lain. Makrofag merupakan diferensiasi dari monosit yang berasal dari aliran

darah yang awalnya promonosit berasal dari sumsum tulang (Italiani *et al*, 2015, Epelman *et al*, 2014).

Makrofag memiliki ukuran antara 10–30 μm , inti berbentuk seperti tapal kuda (*Horsehoe like*) dan terletak eksentrik (Gambar 2.4). Umumnya sel ini berbentuk tidak beraturan dengan cabang yang biasanya pendek atau langsing panjang. Membran plasma berlipat–lipat dan bertonjolan kecil–kecil. Keadaan permukaan yang sedemikian rupa untuk membantu perluasan dalam fagositosis dan motilitas dari sel. Sitoplasma dengan atau tanpa ribosom, mitokondria serta vakuola pinositik, dan fagositik. Lisosom dalam jumlah yang banyak tersebar dalam sitoplasma (McWhorter *et al*, 2015).



Gambar 2.4 Sel makrofag secara mikroskopis (Mescher *et al*, 2011)

2.4.2 Pembentukan Makrofag

Fagosit mononuklear dibentuk di dalam sumsum tulang. Mereka mengalami proliferasi di dalam sumsum tulang dan dilepaskan di dalam darah pada sebelum atau sesudah fase monoblas dan menjadi fase premonosit dan menjadi monosit. Selanjutnya, sel–sel ini akan memasuki jaringan tempat kerja utama dimana mereka akan berdiferensiasi menjadi makrofag. Monosit yang berdiferensiasi menjadi makrofag melibatkan perubahan struktur dan morfologi termasuk peningkatan ukuran, jumlah organel, metabolisme, ekspresi reseptor permukaan dan sensitivitas pada molekul persinyalan (Sherwood *et al*, 2009). Selain itu, terjadi peningkatan aktivitas enzim lisosomal, karena mempersiapkan mereka sebagai fagosit aktif dan pencernaan terkait material asing.

2.4.3 Distribusi Makrofag pada Gingiva

Makrofag pada gingiva yang normal distribusinya hampir tidak ditemukan pada lamina propria. Tetapi, makrofag ditemukan pada daerah gingiva sulkuler dan *junctional epithelium* dalam jumlah yang sedikit. Jumlah sel makrofag pada gingiva sehat yaitu $58,74 \pm 18,56$ sel/ mm^2 (Golijanin *et al*, 2015).

Pada saat terjadi inflamasi, terjadi peningkatan yang cukup signifikan pada makrofag yaitu 2,5 kali lebih banyak dan menjadi $116,55 \pm 54,78$ sel/ mm^2 . Pada fase *early periodontitis*, makrofag tersebar pada daerah *papillary* dan retikuler lamina propria. Sedangkan pada fase *established* periodontitis, makrofag lebih tersebar pada daerah sekitar serabut kolagen dan menyebabkan destruksi (Golijanin *et al*, 2015).

2.4.4 Fungsi Makrofag

Dahulu, makrofag ditemukan hanya berfungsi sebagai pembersih dari bakteri, tetapi sekarang diketahui memiliki beberapa fungsi lain yang terlibat dalam radang dan kekebalan tubuh. Makrofag di dalam darah dapat diaktivasi oleh berbagai macam aktivator maupun stimulan antara lain mikroba dan produknya, kompleks antigen antibodi, inflamasi, limfosit T yang teraktivasi, sitokin, trauma dan protein matriks ekstraseluler seperti fibronectin (Gordon *et al*, 2017).

Aktivasi makrofag dapat dipengaruhi oleh faktor eksternal dan internal. Faktor eksternal antara lain makanan (asam askorbat, asam amino, arginin, polifenol, flavonoid, fitoestrogen dan probiotik) dan pola makan. Sedangkan pada faktor internal meliputi sistem persyarafan seperti saraf vagus, flora normal pada mukosa lumen usus, hormon leptin, usia, status gizi, dan aktivitas. Makrofag yang teraktivasi memiliki jumlah lisosom yang meningkat dan menghasilkan serta melepaskan IL-1, yang mempunyai aktivitas luas dalam respon inflamasi. Berdasarkan fungsinya, makrofag dibagi menjadi dua golongan, yang pertama sebagai sel fagosit dan kedua sebagai *antigen presenting cell* (APC) yang berfungsi dalam menyajikan antigen pada limfosit (Hume *et al*, 2008).

Fungsi utama dari makrofag adalah menghancurkan antigen dalam fagolisosom dan juga melepaskan berbagai enzim dan isi granula ke luar sel

bersama – sama dengan sitokin seperti TNF- α yang dapat membunuh organisme patogen. Selain itu, sel ini berperan dalam mempengaruhi aktivitas dari respon imun, menelan hingga menyampaikan informasi antigen pada sel – sel yang berdekatan. Makrofag aktif dalam sekresi enzim yang berada di lisosomnya antara lain elastase, kolagenase, hidrolase dan lain–lain (Gordon *et al*, 2017).

Kemampuan makrofag dalam mengenali substansi asing dikarenakan adanya reseptor untuk fosfolipid. Sebagai sel efektor, makrofag dapat menghancurkan mikroorganisme serta sel – sel ganas dan benda asing karena adanya enzim dalam lisosom yaitu hidrolase dan peroksidase yang dibutuhkan untuk membunuh mikroorganisme. Selain itu, pada permukaan makrofag terdapat ekspresi dari *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II (Hume *et al*, 2008).

Fungsi terpenting dari makrofag adalah fagositosis yang berarti pencernaan seluler terhadap bahan yang mengganggu. Fase–fase proses fagositosis makrofag antara lain kemotaksis, adhesi, ingesti dan degranulasi. Kemotaksis merupakan pergerakan dari fagosit ke tempat infeksi sebagai respon terhadap faktor yaitu bakteri dan toksinnya yang mengakibatkan aktivasi komplemen. Setelah itu dilanjutkan dengan adhesi yang merupakan proses perlekatan membran plasma fagosit dengan bagian permukaan dari mikroorganisme. Perlekatan dan pengenalan partikel pada makrofag difasilitasi oleh protein opsonin dan prosesnya disebut dengan opsonisasi. Opsonin mengikat molekul spesifik pada mikroba dan selanjutnya memfasilitasi pengikatannya dengan reseptor opsonin spesifik pada makrofag (Epelman *et al*, 2014).

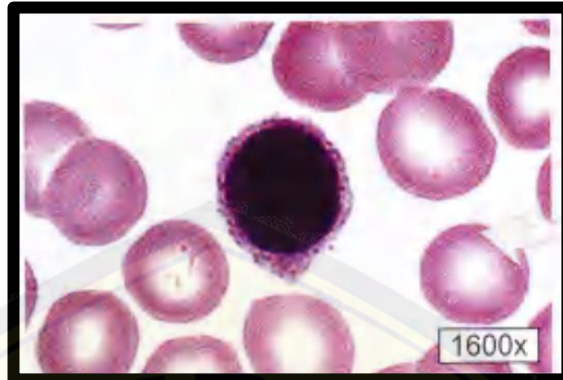
Setelah terjadi adhesi, selanjutnya proses ingesti atau penelanan pada bakteri karena fagosit membentuk pseudopodia pada membran plasmanya yang diperpanjang hingga mengelilingi objek hingga membentuk vakuola fagositik (fagosom). Dinding fagosom dengan demikian terdiri dari dinding bagian luar dari fagosit dan akan berfusi dengan membran granula lisosom sehingga akan terjadi pengeluaran isi dari granula masuk ke dalam fagolisosom dan terjadi degranulasi (Epelman *et al*, 2014).

Pada saat fagosom masuk ke sitoplasma, maka akan bergabung dengan lisosom menjadi fagolisosom dan terjadi degranulasi enzim yang ada di lisosom dan oleh spesies oksigen reaktif. Terjadi aktivasi NADPH menjadi NADP dengan enzim NADPH oksidase dimana oksidasi ini dapat mengubah oksigen menjadi ion superoksida (O_2^-). Superoksida kemudian diubah melalui dismutasi spontan menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). H_2O_2 yang kurang kuat dalam membunuh mikroba dan membutuhkan enzim myeloperoksidase (MPO) dan halida seperti Cl^- yang terdapat pada granula azurofilik netrofil dimana dapat mengubah H_2O_2 menjadi radikal hipoklorat (HOCl). HOCl merupakan oksidan dan antimikroba kuat yang dapat membunuh bakteri melalui halogenasi atau dengan oksidasi protein dan lipid peroksidase. Mikroorganisme yang mati kemudian akan didegradasi oleh hidrolase asam lisosom (Gordon *et al*, 2017).

2.5 Limfosit

2.5.1 Definisi Limfosit

Limfosit adalah leukosit yang paling kecil dan biasanya memiliki nukleus bulat besar yang menempati sebagian besar dari sel. Jumlah limfosit berkisar antara 20–30% dari sel darah putih yang berada di peredaran darah. Pada sediaan darah, limfosit berupa sel yang berbentuk bulat kecil dengan diameter 7–12 μm dengan nukleus berlekuk, terpulas gelap dan memiliki sedikit sitoplasma bewarna biru terang (Gambar 2.5). Pada mikroskop elektron, limfosit tidak memiliki retikulum endoplasma tetapi memiliki banyak ribosom bebas di sitoplasmanya. Limfosit bertanggung jawab terhadap kontrol sistem imunitas adaptif (Sherwood *et al*, 2007).



Gambar 2.5 Sel limfosit secara mikroskopis (Mescher *et al*, 2011)

Berdasarkan fungsinya, terdapat limfosit B dan T. Limfosit B menghasilkan antibodi sehingga disebut dengan imunitas humoral (diperantarai antibodi). Antibodi yang berikatan dengan benda asing spesifik maka akan ditandai untuk dihancurkan sistem imunitas. Sedangkan pada limfosit T tidak memproduksi antibodi, tetapi secara langsung akan menghancurkan sel target yang spesifik dengan mengeluarkan zat-zat kimia yang dapat membentuk pori besar/ lubang pada sel target sehingga disebut sebagai imunitas seluler. Sasaran dari sel T ini mencakup sel-sel tubuh yang terinfeksi bakteri, virus maupun sel kanker (Sherwood *et al*, 2007).

Limfosit dapat hidup sekitar 100–300 hari. Selama kehidupannya, sebagian besar akan didaur ulang di jaringan limfoid, limfe dan darah, tetapi hanya menghabiskan waktu beberapa jam saja di peredaran darah. Dengan demikian, hanya sebagian kecil dari limfosit total yang transit di dalam darah setiap waktu tertentu (Sherwood *et al*, 2007).

2.5.2 Jenis Limfosit

Berdasarkan sifat fungsionalnya, limfosit digolongkan dalam dua kelompok besar yaitu :

1. Limfosit B

Limfosit B berkembang di sumsum tulang dan mengalami pendewasaan di organ limfoid perifer. Jumlah sel limfosit B dalam total limfosit manusia normal sekitar 15%. Sel B menyediakan imunitas humoral yang melawan patogen

ekstraseluler melalui pembentukan antibodi sehingga disebut sebagai imunitas humoral. Antibodi berfungsi sebagai penetralisir patogen dan toksinnya, memfasilitasi opsonisasi, aktivasi komplemen, internalisasi antigen, mempresentasikan antigen pada limfosit T untuk meningkatkan respon imunitas. Limfosit B yang teraktivasi akan berkembang menjadi sel memori yang dapat mengekspresikan penanda pada permukaan CD45RO yang akhirnya akan berdiferensiasi menjadi sel plasma (LaRosa *et al*, 2008).

2. Limfosit T

Sel T membentuk 65–75% limfosit pada peredaran darah. Sel limfosit T memerlukan maturasi ke dalam timus dan membentuk beberapa subkelas dengan fungsi yang spesifik. Kemudian sel T berdiferensiasi menjadi sel T yang matur dan mengisi ke seluruh jaringan limfoid di seluruh tubuh. Sel ini berasal dari sumsum tulang dan bermigrasi ke timus untuk maturasi dan proliferasi hingga dibawa ke jaringan limfoid lain. Semua sel T memiliki suatu molekul pada permukaannya yang disebut dengan reseptor sel T yang berfungsi untuk mengenali epitop yang spesifik (Mescher *et al*, 2011). Berdasarkan perannya, terdapat tiga subpopulasi dari sel T yaitu :

1. Sel T Pembantu (Sel T-Helper) berfungsi dalam menghasilkan sitokin yang dapat meningkatkan diferensiasi dari sel B menjadi sel plasma, aktivasi sel T sitotoksik, aktivasi makrofag menjadi fagositik, dan induksi reaksi inflamasi. Sel T-helper memiliki penanda $CD4^+$ pada permukaannya sehingga sel ini sering disebut dengan sel T $CD4^+$. Dalam keadaan tertentu, sel T helper ini juga bertindak sebagai mediator sitotoksitas dan supresor. Biasanya sel ini akan menemukan antigen peptida yang terikat pada molekul glikoprotein MHC kelas II yang ada di permukaan *antigen presenting cells* (APC). Setelah terpapar oleh peptida MHC kelas II, maka sel T helper akan teraktivasi dan berproliferasi (Mescher *et al*, 2011).
2. Sel T Sitotoksik atau dikenal dengan sel T $CD8^+$ bekerja secara langsung pada sel asing atau sel yang telah terinfeksi virus melalui 2 mekanisme utama. Sel ini melekat pada sel yang akan dihancurkan dan melepaskan

peptida protein yang disebut dengan perforin dimana akan terbentuk lubang di membran sel target yang mengakibatkan sel tersebut lisis dan mati. Mekanisme lainnya, sel tersebut akan melekat sebuah sel dan membunuhnya dengan menginduksi mekanisme apoptosis. Sel T sitotoksik dapat mengidentifikasi antigen peptida yang terikat oleh MHC kelas I pada permukaan sel target. Selain itu sel ini berperan dalam menekan respon imun dengan melepas faktor terlarut yang akan mengganggu fungsi sel imun lain (Mescher *et al*, 2011).

3. Sel T Regulatorik atau dikenal dengan sel $CD4^+CD25^+$ yang berperan penting dalam memungkinkan toleransi dari imun. Dimana sel ini akan menekan jumlah berlebihan dari proliferasi sel imunitas sebagai respon inflamasi yang berlebihan. Sel-sel ini menghasilkan toleransi perifer yang menjadi *back-up* toleransi sentral yang muncul di kelenjar timus (Mescher *et al*, 2011).

2.5.3 Fungsi Limfosit

Sel limfosit muncul sebagai reseptor antigen dimana merupakan kondisi yang tepat untuk menginduksi reaksi imunospesifik pada peradangan. Limfosit memiliki peranan fungsional yang berbeda dimana semuanya berhubungan dengan reaksi imunitas terhadap serangan mikroorganisme, makromolekul asing dan sel kanker (LaRosa *et al*, 2007).

Sel limfosit T akan melekat pada sel yang akan dihancurkan dan melepaskan peptida protein yang disebut dengan perforin dimana akan terbentuk lubang di membran sel target yang mengakibatkan sel tersebut lisis dan mati (Koyasu *et al*, 2012).

Sel limfosit B akan menyediakan imunitas humoral yang berfungsi dalam melawan patogen melalui pembentukan antibodi. Antibodi akan menetralsir patogen dan toksinnya, memfasilitasi opsonisasi, aktivasi komplemen, internalisasi antigen, mempresentasikan antigen pada limfosit T untuk meningkatkan respon imunitas (LaRosa *et al*, 2007).

2.6 Hubungan antara Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*C.canephora*) terhadap Periodontitis

Penyakit periodontal didefinisikan sebagai kondisi infamasi kronis dari gingiva, tulang alveolar, dan ligamen periodontal. Penyakit periodontal dimulai dari gingivitis dan dapat berkembang menjadi periodontitis. Secara umum, bakteri fakultatif gram negatif atau bakteri anaerob merupakan bakteri dominan yang menyebabkan periodontitis. Bakteri salah satunya adalah *Porphyromonas gingivalis* (Newman *et al*, 2012).

P. gingivalis merupakan bakteri gram negatif obligat anaerob yang memiliki komponen virulensi yang dapat mengikat reseptor CD14/TLR-4 sehingga meningkatkan sekresi sitokin proinflamatori yaitu IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 dan TNF- α . Selain itu, *P.gingivalis* dapat menempel pada sel epitel yang dapat memodulasi sistem imunitas melalui proses inflamasi. Sel radang yang berperan penting dalam respon inflamasi antara lain makrofag dan limfosit (Newman *et al*, 2012).

Berdasarkan penelitian Ermawati (2013), gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 0,025 g/mL dan 0,05 g/mL pada tikus yang diinduksi periodontitis dapat menurunkan sekresi TNF- α yang merupakan penyebab terjadinya inflamasi pada periodontitis. Pada penelitian Fadli (2013), konsentrasi gel ekstrak biji kopi robusta yang optimal dalam meningkatkan ketebalan epitel gingiva pada tikus periodontitis adalah 0,05 g/mL.

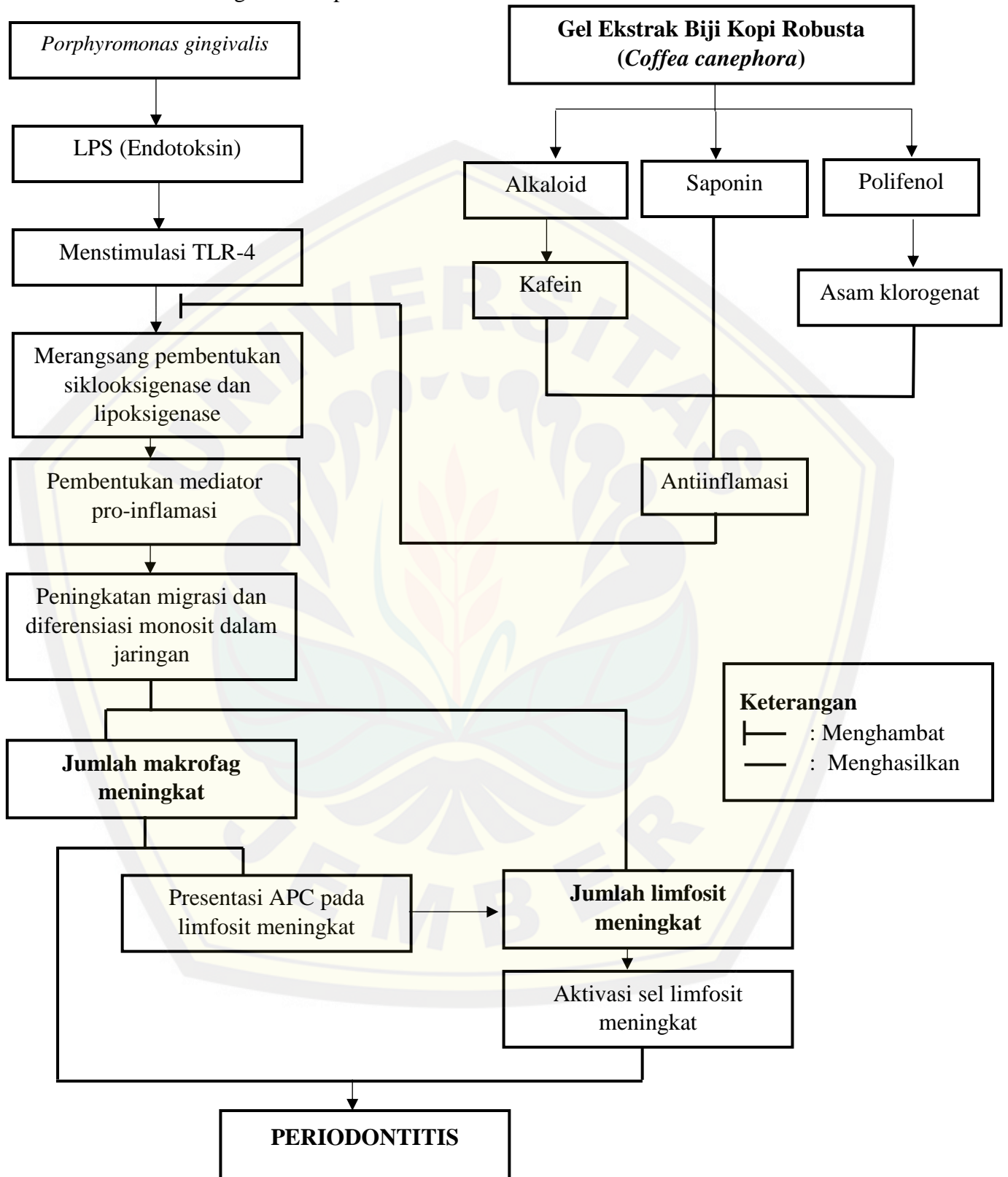
TNF- α dapat diproduksi oleh berbagai sel antara lain makrofag, neutrofil, limfosit dan sel mast. Pada periodontitis, TNF- α berperan dalam degradasi kolagen dan memicu terjadinya resorpsi tulang alveolar. Pada penelitian tersebut mengungkapkan bahwa polifenol pada biji kopi robusta dapat mencegah peningkatan produksi TNF- α oleh sel makrofag dan limfosit yang teraktivasi oleh radikal bebas. Selain itu terdapat asam klorogenat dan asam kafeat yang berfungsi sebagai antioksidan kuat untuk mencegah sel fibroblas untuk menghasilkan TNF- α akibat dari stress oksidatif (Ermawati, 2013).

2.7 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah pemberian dari gel ekstrak biji kopi robusta (*C.canephora*) dapat menurunkan jumlah makrofag dan limfosit jaringan gingiva pada model tikus periodontitis yang diinduksi *Porphyromonas gingivalis* sehingga mencapai batas normal yang tidak memberikan efek destruksi pada jaringan.



2.8 Kerangka Konseptual



Gambar 2.6 Skema kerangka konseptual penelitian

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris. Pemilihan jenis ini karena sampel maupun perlakuan lebih terkendali, terukur dan pengaruh perlakuan lebih dapat dipercaya. Sedangkan, rancangan penelitian yang digunakan adalah jenis *the post test only control group design* yaitu melakukan pengukuran dan observasi pada kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan pada waktu yang telah ditentukan (Notoatmojo, 2010).

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat penelitian

1. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember
2. Pembuatan gel ekstrak biji kopi robusta (*C.canephora*) di Laboratorium Teknologi Sedia Likuida Semisolida Bagian Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember.
3. Pembuatan suspensi dari *P.gingivalis* dilakukan di laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
4. Perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
5. *Processing* jaringan dan pengamatan secara mikroskopis dilakukan di Laboratorium Histologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.2.2 Waktu penelitian

Waktu pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan November 2019–Februari 2020.

3.3. Sampel Penelitian

3.3.1 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan rumus Daniel (2005):

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

Keterangan :

n = besar sampel setiap kelompok

α = standar deviasi setiap kelompok

d = kesalahan yang masih dapat ditolerir

z = nilai pada tingkat kesalahan tertentu, z = 1,96

(Daniel, 2005)

Berdasarkan rumus yang ditentukan, dengan asumsi bahwa kesalahan yang masih dapat diterima (α) sama besar dengan kesalahan yang masih dapat ditolerir (d) maka perhitungan jumlah sampel minimal adalah sebagai berikut :

$$\frac{n \geq (1,96^2) \alpha^2}{d^2}$$

$$n \geq (1,96^2)$$

$$n \geq 3,84 (4)$$

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut, didapatkan jumlah sampel minimal adalah 4 ekor hewan coba pada setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 5 kelompok, sehingga jumlah keseluruhan tikus wistar jantan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 ekor.

3.3.2 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus novergicus*) dengan kriteria inklusi tikus wistar jantan putih (*Rattus novergicus*), berat badan 180–200 gram, umur \pm 2–3 bulan, dan kondisi fisik tikus dalam keadaan sehat (warna bulu putih bersih dan mata tikus merah normal). Sedangkan kriteria eksklusinya yaitu tikus yang mati selama penelitian. Tikus dinyatakan *drop out* jika tikus memiliki kriteria eksklusi dan diganti dengan tikus lain sesuai dengan kriteria inklusi sehingga didapatkan jumlah sampel yang sesuai dengan besar sampel sesuai dengan perhitungan.

3.4. Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah gel ekstrak biji kopi robusta (*C.canephora*) dengan konsentrasi 0,025 g/mL dan 0,05 g/mL.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah makrofag dan limfosit pada jaringan gingiva tikus.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Konsentrasi suspensi *P.gingivalis*
- b. Induksi *P. gingivalis* tiga hari sekali sebanyak 0,05 ml selama 14 hari setiap sore.
- c. Gel ekstrak biji kopi robusta (*C.canephora*) sebanyak 0,05 ml diberikan dengan konsentrasi 0,025 g/mL dan 0,05 g/mL sebanyak satu kali sehari setiap pagi.
- d. Makanan dan minuman tikus secara *ad libitum*.

3.5. Definisi Operasional

3.5.1 Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Gel ekstrak biji kopi robusta adalah sediaan ekstrak biji kopi robusta dalam bentuk semi padat yang digunakan sebagai bahan aplikasi topikal pada tikus yang diinduksi periodontitis dengan konsentrasi 0,025 g/mL dan 0,05 g/mL.

3.5.2 Model Tikus Periodontitis

Model tikus periodontitis adalah tikus wistar jantan yang diinjeksi dengan 0,05 mL *P.gingivalis* dengan jumlah $1,5 \times 10^8$ CFU/mL melalui sulkus gingiva bagian bukal gigi molar pertama kiri bawah. Injeksi diberikan tiga hari sekali selama 14 hari menggunakan *tuberculine syringe* 30 gauge.

3.5.3 Jumlah Sel Makrofag

Makrofag adalah sel yang memiliki bentuk nukleus oval, sitoplasma, dan berisi banyak granul. Jumlah sel makrofag dihitung melalui banyaknya sel makrofag pada jaringan gingiva gigi molar pertama kiri bawah setelah perlakuan yang diamati secara histologis menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

3.5.4 Jumlah Sel Limfosit

Limfosit ditentukan dengan ciri sel mononuklear yang sitoplasmanya tidak mengandung granul, inti berbentuk bulat dan besar, dengan sel hampir memenuhi sitoplasma. Hasil dari pewarnaan HE, limfosit akan terlihat inti sel bewarna kebiruan dan sitoplasma terlihat bewarna merah muda. Jumlah sel limfosit dihitung melalui banyaknya sel limfosit pada jaringan gingiva gigi molar pertama kanan bawah setelah perlakuan yang diamati secara histologis menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang tikus, neraca digital (*Ohaus*), masker (*Diapro*), sarung tangan lateks, *syringe* kecil kapasitas 1ml (*Terumo*, Jepang), *dental rat chair*, blender (*Panasonic*), mortar, tabung

reaksi(Pyrex), *Sentrifuge*, Kawat ose, *decycator*, inkubator, *spektrofotometer*, *shakerbath*, *rotary evaporator*, *Tuberculine syringe*, sonde, pinset, *scalpel*, pot, potongan kayu 2 x 2 cm, lampu spiritus, mikrotom (*Tissue Tek*, Jepang), *object glass* dan penutupnya (*Citoplus*), *waterbath* (*Memmert*), kuas kecil, kompor kecil, kompor listrik (*Maspion*, Indonesia), mikroskop cahaya (*Olympus*, Jepang) dan Optilab (*Optilab Advance*, Indonesia).

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah 20 ekor tikus wistar jantan (*Rattus novergicus*), akuades steril, media BHI-B, media BHI-A, vitamin K, hemin, *yeast extract*, suspensi *P. gingivalis* tipe ATCC 33277 (*MediMark*, Perancis), biji kopi robusta (*C.canephora*) yang diperoleh dari Kopi Rakyat Garahan Jember, etanol 96%, CMC, Propilen glikol, Gliserin, Gel plasebo, Ketamin (KTM 1000), Buffer formalin, Asam formiat 10%, Xylol, Alkohol 70%, 80%, 95%, Gliserin, *Meyer's egg* albumin, Parafin (*Paraplast Plus*), Minyak imersi, pewarna Hematoksilin-eosin, enthelan, kertas saring (*Whatmann filter paper No.1*), makanan tikus wistar (*Feedmill-Malindo*, Gresik), Gel Aloclair™.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Ethical Clearance

Rancangan penelitian telah memenuhi syarat dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember (No.597/UN25.8/KEPK/DL/2019).

3.7.2 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini akan dilakukan pada hewan coba tikus (*Rattus novergicus*) dengan kriteria yang telah ditentukan. Hewan dilakukan aklimatisasi selama satu minggu sebelum diberi perlakuan untuk adaptasi tikus di dalam kandang dan diberi pakan standar dan minum.

3.7.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Hewan coba yang telah diaklimatisasi selama satu minggu akan dibagi menjadi 5 kelompok. Pembagian kelompok sebagai berikut :

1. Kelompok I merupakan kelompok kontrol/normal yang tidak diberi perlakuan selama penelitian dan didekaputasi hari ke-8.
2. Kelompok II merupakan kelompok yang diinduksi *P.gingivalis* selama 14 hari dan diaplikasikan topikal gel plasebo kemudian didekaputasi pada hari ke-8.
3. Kelompok III merupakan kelompok perlakuan yang diinduksi *P.gingivalis* selama 14 hari dan diaplikasikan topikal gel Aloclair™ kemudian didekaputasi pada hari ke-8.
4. Kelompok IV merupakan kelompok perlakuan yang diinduksi *P.gingivalis* selama 14 hari dan diaplikasikan topikal gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 0,025 g/mL kemudian didekaputasi pada hari ke-8.
5. Kelompok V merupakan kelompok perlakuan yang diinduksi *P.gingivalis* selama 14 hari dan diaplikasikan topikal gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 0,05 g/mL kemudian didekaputasi pada hari ke-8.

3.7.4 Pembuatan Suspensi *P.gingivalis*

Pembuatan suspensi dilakukan dengan pengambilan koloni bakteri *P.gingivalis* pada media *blood agar*. Selanjutnya mengambil koloni bakteri sebanyak 1–2 ose dan diletakkan pada campuran BHI-B (*Brain Heart Infusion Broth*) sebanyak 1 mL, Vitamin K, dan hemin. Media BHI-B yang telah terisi dengan koloni bakteri tersebut dilakukan inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam setelah itu dihomogenkan menggunakan *vortex*. Kemudian mengambil 200µL suspensi bakteri dan masukkan ke dalam NaCl 0,45% sebanyak 1 mL setelah itu dihomogenkan lagi menggunakan *vortex*. Suspensi diuji tingkat kekeruhannya

menggunakan *densi-check* hingga konsentrasi 0,5 McFarland (setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ mL).

3.7.5 Pembuatan Model Tikus Periodontitis

Model tikus periodontitis adalah tikus wistar jantan yang diinduksi dengan suspensi *P. gingivalis* pada sulkus gingiva bagian bukal gigi molar pertama kanan bawah dengan 0,05 mL dengan tingkat kekeruhan 0,5 McFarland (setara $1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Injeksi diberikan 3 hari sekali selama 14 hari menggunakan *tuberculine syringe* dengan ukuran jarum 30 gauge. Aplikasi dilakukan pada sore hari karena terdapat ritme sirkadian dimana sitokin pro-inflamasi meningkat sehingga ROS dan TNF- α juga meningkat. Hal tersebut menyebabkan mudahnya terjadi infeksi (Khotimah *et al*, 2018). Tikus dinyatakan periodontitis apabila terdapat tanda klinik peradangan pada jaringan periodontal yang meliputi kemerahan, pembesaran margin gingiva, resesi gingiva dan apabila dilakukan foto rontgen akan tampak resorpsi tulang alveolar (Xu *et al*, 2014).

3.7.6 Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta

Pembuatan gel ekstrak biji kopi robusta diawali dengan memblender biji kopi robusta kering hingga menjadi serpihan kecil dan halus. Selanjutnya bubuk kopi ditimbang sebanyak 375 gram dan dilakukan maserasi dalam larutan etanol 96% sebanyak 1500 mL selama 48 jam. Setelah itu sampel disaring menggunakan kertas saring Whatmann ukuran 40 dan dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dengan tekanan 880 mBar selama 6 jam. Sehingga diperoleh ekstrak pekat 0,1 g/mL sebanyak 28 g.

Proses selanjutnya yaitu pembuatan basis gel dimulai dengan CMC-Na 2% sebanyak 2 g dikembangkan dalam 98 mL air panas dengan suhu 70°C dalam mortar selama 15 menit hingga mengembang. Selanjutnya diaduk sampai terbentuk sediaan jernih 100 g.

Untuk mendapatkan gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 0,025 g/mL dan 0,05 g/mL, pengenceran dilakukan sesuai dengan rumus:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan:

M1 : Konsentrasi awal V1 : Volume awal

M2 : Konsentrasi akhir V2 : Volume akhir

Untuk mendapatkan gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 0,025 g/mL dilakukan dengan pengenceran sebagai berikut:

$$0,1 \text{ g/mL} \times 5 \text{ g} = 0,025 \text{ g/mL} \times V2$$

$$V2 = 20 \text{ g}$$

Sehingga basis gel yang ditambahkan: $V2 - V1$

$$20 \text{ g} - 5 \text{ g} = 15 \text{ g}$$

Kemudian, dilakukan pengadukan hingga homogen pada mortar. Sehingga, didapatkan gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 0,025 g/mL sebanyak 20 gram.

Sedangkan, untuk mendapatkan gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 0,05 g/mL dilakukan dengan pengenceran sebagai berikut:

$$0,1 \text{ g/mL} \times 23 \text{ g} = 0,05 \text{ g/mL} \times V2$$

$$V2 = 46 \text{ g}$$

Sehingga basis gel yang ditambahkan: $V2 - V1$

$$46 \text{ g} - 23 \text{ g} = 23 \text{ g basis gel yang perlu ditambahkan}$$

Kemudian, dilakukan pengadukan hingga homogen pada mortar. Sehingga, didapatkan gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 0,05 g/mL sebanyak 46 gram

3.7.7 Aplikasi Topikal Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Setelah diperoleh model tikus periodontitis dengan ciri-ciri kerusakan epitel sulkular dan tampak resorpsi tulang alveolar, selanjutnya dilakukan aplikasi topikal gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 0,025 g/mL dan 0,05 g/mL pada kelompok perlakuan. Gel tersebut diaplikasikan pada sulkus molar

satu kiri bawah dengan dosis 0,05 ml. Pada penelitian Ermawati (2013), dosis dan konsentrasi tersebut memiliki kemampuan dalam menurunkan sitokin TNF- α yang berhubungan dengan pembentukan makrofag dan limfosit. Aplikasi topikal gel dilakukan sehari sekali pada pagi hari selama 7 hari. Aplikasi dilakukan pagi hari karena tikus merupakan hewan yang beraktivitas di malam hari. Pada pagi hari aktivitas makan dan aktivitas lain tidak sering dilakukan sehingga obat akan mudah menempel pada sulkus (retentif) (Dewi, 2010). Selain itu, aplikasi selama 7 hari dianggap telah mampu menurunkan jumlah makrofag dan limfosit (Swastini *et al*, 2019).

3.7.8 Eutanasia Sampel

Sebanyak 4 ekor tikus wistar pada setiap kelompok kontrol, periodontitis dan perlakuan dilakukan dekaputasi untuk pengambilan sampel jaringan gingiva. Aturan pengambilan jaringan yaitu dari mesial gigi insisivus sampai bagian gigi M3 rahang bawah tikus beserta jaringan lunak (gingiva) bagian bukal dan lingual. Setelah itu sampel dimasukkan dalam larutan *buffer formalin* selama 24 jam agar jaringan yang akan diamati tidak mengalami kerusakan, autolisis, mempertahankan morfologi sel dan mencegah pertumbuhan bakteri dan jamur.

3.7.9 Tahap Dekalsifikasi Jaringan

Sampel yang telah dilakukan eutanasia selanjutnya dilakukan dekalsifikasi dengan tujuan untuk menghilangkan garam – garam kalsium dari tulang dan gigi sebelum pemotongan sehingga akan lebih lunak dan memudahkan dalam pemotongan. Proses ini menggunakan larutan asam formiat 10% dengan tahapan sebagai berikut:

1. Sampel yang telah direndam dalam *buffer formalin* dicuci dengan air bersih yang mengalir pelan selama 30 menit.
2. Kemudian dimasukkan dalam larutan asam formiat 10% selama 14 hari dan dilakukan vibrasi (*shaking*) setiap hari agar proses dekalsifikasi merata.

- Setelah itu, dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa bahan dekalsifikasi

3.7.10 Pembuatan Sediaan Histologis

Setelah melalui tahapan dekalsifikasi, selanjutnya merupakan tahap pembuatan sediaan histologis sebagai berikut:

- Melakukan proses dehidrasi, *clearing*, dan impregnasi dengan mencelupkan jaringan kedalam larutan sesuai dengan petunjuk pada tabel berikut:

Tabel 3.1 Proses Dehidrasi, *Clearing*, dan Impregnasi

Tahapan	Bahan	Waktu	Tujuan
Dehidrasi	Alkohol 70%	± 15 menit	Menarik air dari jaringan yang sudah dicelupkan ke dalam larutan buffer formalin
	Alkohol 80%	1 jam	
	Alkohol 95%	2 jam	
	Alkohol 95%	1 jam	
	Alkohol absolut	1 jam	
	Alkohol absolut	1 jam	
	Alkohol absolut	1 jam	
<i>Clearing</i>	Xylol	1 jam	Menghilangkan alkohol sebelum jaringan ditanam dalam parafin
	Xylol	2 jam	
	Xylol	2 jam	
Impregnasi	Parafin cair (56°C–58°C)	2 jam	Sebagai penyangga sediaan agar dapat dilakukan penyimpanan
	Parafin cair (56°C–58°C)	2 jam	
	Parafin cair (56°C–58°C)	2 jam	
	Parafin cair (56°C–58°C)	2 jam	

2. Pembuatan blok parafin (*embedding*)
 - a. Persiapan alat cetak yang terbuat dari logam yang berbentuk balok bersiku yang ditempatkan pada permukaan kaca. Alat dan alas diolesi dengan gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dengan blok parafin yang sudah beku.
 - b. Parafin cair dalam dua wadah, yaitu parafin untuk *embedding* dan parafin sebagai media penyesuaian temperatur jaringan yang akan ditanam.
 - c. Parafin cair untuk *embedding* dituangkan ke dalam cetakan hingga penuh setinggi permukaan, lalu jaringan ditanamkan pada posisi yang sesuai dan diusahakan jaringan yang menempel pada dasar cetakan dalam kondisi yang rata.
 - d. Setelah parafin setting, cetakan dilepaskan dan blok parafin diberi label dan siap dilakukan pemotongan.
3. Pemotongan jaringan menggunakan mikrotom
 - a. Persiapkan object glass dengan *meyer's egg albumin*.
 - b. Blok parafin dilepaskan dari cetakan.
 - c. Menempelkan blok parafin pada *block holder* mikrotom dengan bantuan pemanasan.
 - d. Setelah persiapan selesai, dilanjutkan dengan penyayatan jaringan menggunakan mikrotom.
 - e. Pisau mikrotom harus dengan keadaan bersih yang sebelumnya dibersihkan dengan menggunakan kertas saring/kasa yang telah dibasahi dengan *Xylol* dengan arah tegak lurus.
 - f. Setelah itu, dilakukan pengaturan indikator ketebalan pisau mikrotom atau sayatan antara 4–6 mikron kemudian dilakukan pemotongan blok parafin sehingga didapatkan hasil pemotongan yang tipis.
 - g. Memindahkan hasil potongan berupa sayatan tipis menggunakan kuas ke atas permukaan air dalam waterbath dengan suhu 37°-40°C agar hasil sayatan dapat mengembang dengan baik.

- h. Hasil sayatan diseleksi dan dipindahkan di atas *object glass* yang telah diolesi *meyer's egg albumin* dan diberi label sesuai dengan label jaringan yang dipotong.
- i. Sediaan jaringan dibiarkan hingga kering dengan *hotplate* suhu 30°C–35°C selama minimal 12 jam dan selanjutnya dilakukan tahap pewarnaan pada jaringan.
4. Pewarnaan Jaringan dengan pewarnaan *Mayer's Hematoksilin-Eosin*.
Proses pewarnaan jaringan melalui tahap sebagai berikut:

Tabel 3.2 Tahapan pewarnaan jaringan

Proses	Larutan	Waktu
Deparafinasi	Xylol	2–3 menit
	Xylol	2–3 menit
	Xylol	2–3 menit
Dehidrasi	Alkohol absolut	3 menit
	Alkohol absolut	3 menit
	Alkohol 95%	3 menit
	Alkohol 95%	3 menit
	Air mengalir	10 menit
Pewarnaan inti	<i>Mayer's hematoksilin</i>	15 menit
	Air mengalir	20 menit
Pewarnaan sitoplasma	Eosin	15 detik–2 menit
Dehidrasi	Alkohol 95%	2–3 menit
	Alkohol 95%	2–3 menit
	Alkohol absolut	2–3 menit
	Alkohol absolut	2–3 menit
<i>Clearing</i>	Xylol	3 menit
	Xylol	3 menit
	Xylol	3 menit
<i>Mounting</i>	Entellan	5 menit

Hasil yang didapatkan dari pewarnaan *Mayer's* hematoksin eosin ini sebagai berikut:

- a). Inti sel bewarna biru
- b). Sitoplasma bewarna kemerahan

3.7.11 Tahap Perhitungan Jumlah Makrofag

Pengamatan sediaan histologis dilakukan dengan mikroskop cahaya (*Olympus*) dengan bantuan OptiLab pada perbesaran 400x. Sel makrofag pada tiap sediaan dihitung dari pojok kiri bawah ke kanan bawah kemudian ditarik ke atas, demikian seterusnya hingga semua lapang pandang terbaca. Jumlah sel makrofag didapatkan dengan menghitung sel makrofag pada tiga sediaan di setiap preparat dengan tiga pengamat selanjutnya dijumlahkan dan diambil rata-rata.

3.7.12 Tahap Perhitungan Jumlah Limfosit

Pengamatan sediaan histologis dilakukan dengan mikroskop cahaya (*Olympus*) dengan bantuan OptiLab pada perbesaran 400x. Sel limfosit pada tiap sediaan dihitung dari pojok kiri bawah ke kanan bawah kemudian ditarik ke atas, demikian seterusnya hingga semua lapang pandang terbaca. Jumlah sel limfosit didapatkan dengan menghitung sel limfosit pada tiga sediaan di setiap preparat dengan tiga pengamat selanjutnya dijumlahkan dan diambil rata-rata.

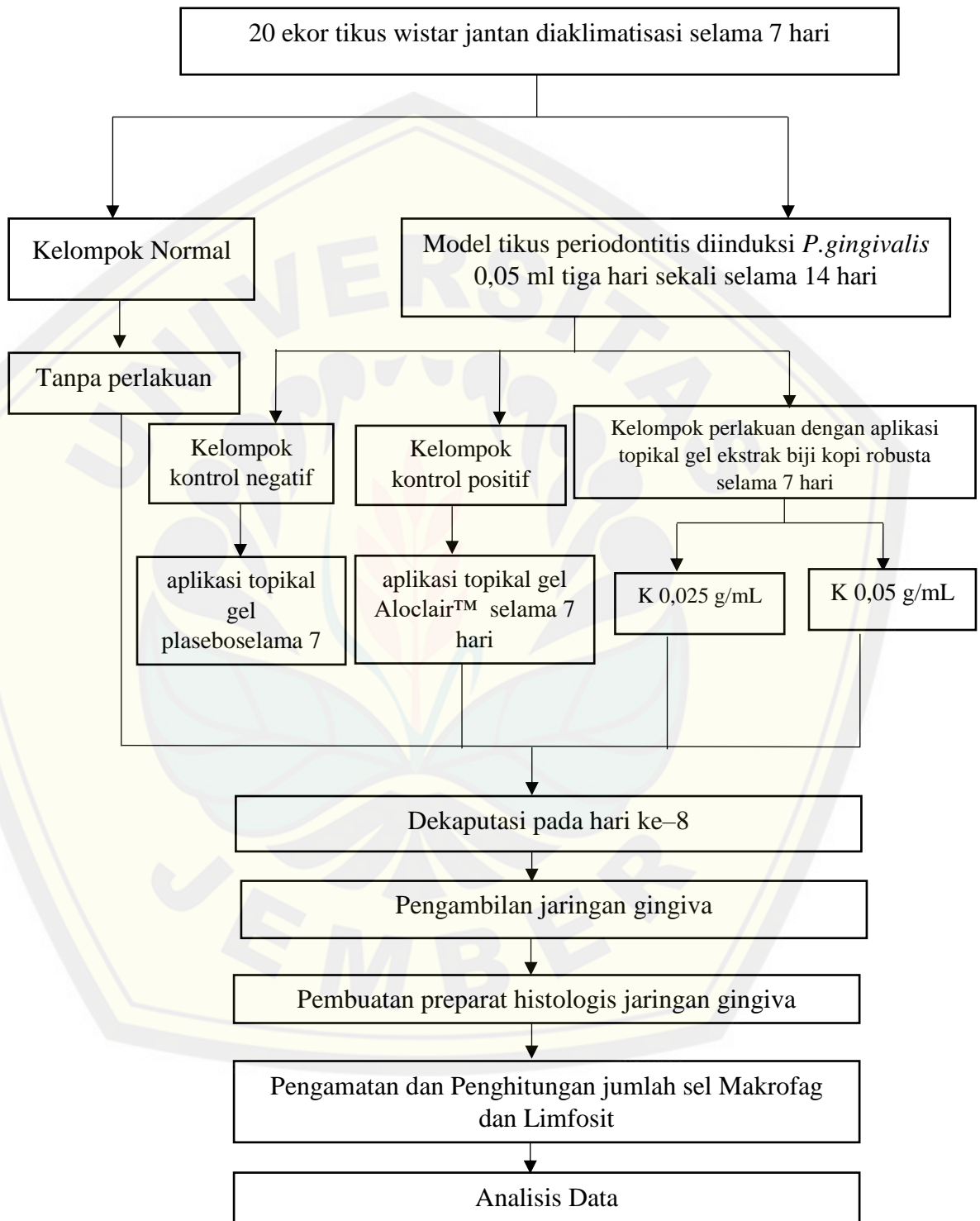
3.8 Analisis Data

Sebelum data hasil penelitian dianalisis, data terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro-wilk* untuk mengetahui distribusi kelompok sampel adalah normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas varian untuk menguji variasi populasi dengan menggunakan uji *Levene*. Hasil uji data yang terdistribusi normal dan homogen dilakukan uji parametrik *One-way* Anova dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significance Difference*) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) untuk mengetahui adanya perbedaan antara tiap – tiap subkelompok perlakuan. Apabila hasil uji data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen maka dilakukan uji

nonparametrik *Kruskall-Wallis* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.



3.9 Alur penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian gel ekstrak biji kopi robusta dapat menurunkan jumlah sel makrofag dan limfosit pada tikus periodontitis yang diinduksi *P. gingivalis*. Sehingga dapat mengurangi terjadi keseimbangan antara jumlah sel makrofag dan limfosit pada gingiva dan mengurangi efek destruktifnya. Hasil ini sesuai dengan hipotesis bahwa gel ekstrak biji kopi robusta menurunkan jumlah makrofag dan limfosit.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan oleh penulis antara lain sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas gel ekstrak biji kopi robusta terhadap sel radang lainnya.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih spesifik mengenai kandungan biji kopi robusta yang berperan dalam proses inflamasi.
3. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas gel ekstrak biji kopi robusta terhadap makhluk hidup.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez, C., Rojas, C., Cafferata, ER. 2018. Regulatory T Lymphocytes in Periodontitis. *A Translational View*. 5(2):1-10.
- Amano, A. 2003. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 74(1):90 – 96.
- Amunulla, A., Venkatesan, R. 2015. Lymphocyte subpopulation in healthy and diseased gingival tissue. *Journal of Indian Social Population*. 12(2):45-50.
- Anshori, M. Fuad. 2014. Analisis Keragaman Morfologi Koleksi Tanaman Kopi Arabika dan Robusta Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar Sukabumi. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Artho L., Wuisan J., Najooan JA. 2015. Efek Serbuk Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) Terhadap Penyembuhan Luka Insisi Pada Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*). *Jurnal e- Biomedik (eBM)*. 3(3):743-748.
- Ayelnig, S., Sabally, K. 2013. The use of Coffee Bean. *Journal of American Research Communication*. 3(1):78-91.
- Bacterial Nomenclature. 2012. Bacterial Nomenclature up to date published by Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Culture at <http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/bacterial-nomenclature-up-to-date.html>. Diakses pada 12 Juni 2019.
- Carranza, F., Takei, N. 2012. *Carranza's Clinical Periodontology 11th ed.* Missouri. Elsevier.
- Chappel, LC., Mealey, BL., Van Dyke, T., Bartold MP., Dommisch, H., Eickholz P., Lang, PN., Holmstrup, P. 2018. Periodontal Health And Gingival Diseases And Conditions On An Intact And A Reduced Periodontium: Consensus Report Of Workgroup 1 Of The 2017 World Workshop On The Classification Of Periodontal And Peri-Implant Diseases And Conditions. *Journal of Periodontology*. 89(Supp.1):S74-S84.
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., Dyke, T. 2014. Inflammatory And Immune Pathways In The Pathogenesis Of Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*. 64(52):57-80.

- Chindo, Alva.2015.Benefits Of *Aloe Vera* Substance as Anti-Inflammatory of Stomatitis.*Journal of Majority*.4(2):83-87.
- Daniel, W.W.2005.Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Science: Eight Edition.Giorgia: Wiley.
- De Kochko, A.2010. Advance in Coffea Genomics.*Journal of Nature*.53(12):ISBN:978-0-12-380872-1.
- Departemen Kesehatan RI.2011 Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT).Jakarta: Badan LitbangKes.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2017. Statistik Perkebunan Indonesia Komoditas Kopi 2015-2017. Jakarta: Direktorat Jenderal Perkebunan.
- Dorland.2002.Kamus Kedokteran.Jakarta: EGC.
- Dumitrescu, A.L.,Inagaki, K.,Kobayashi, J.,Kawamura, M.2010.Etiology and Pathogenesis of Periodontal Disease.*Dental Clinics of North America Journal*.49(3):491-516.
- Eira, M. T. S., E. A. A. da Silva, R. D. de Castro, S. Dussert, C. Walters, J. D. Bewley, and H. W. M.Hilhorst. 2006. Coffee Seed Physiology. Minireview. *Journal of Plant Physiology*.18(1): 149-163.
- Egesie, UG.,Chima, KE.,Galam, NS.2011. Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Aqueous Extract of *Aloe Vera (Aloe barbadensis)* in Rats.*African Journal of Biomedical Research*.14(22):209-217.
- Epelman, S.,Lavine, JK.,Randolph,GJ.2014.Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Elsevier*.41(2):21-35.
- Ermawati, T. 2013. Efek Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap Kemampuan Adhesi dan Viabilitas Neutrofil Yang Dipapar *Porphyromonas gingivalis*.*Penelitian dosen pemula*.Jember:Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Ermawati, T., Meilawaty, Z.,Harmono, H.2018.Inhibiton Activity of Robusta Coffee Beans Polyphenols Extract on the Productions of TNF- α Neutrophills Cells.*Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*.4(2):114-119.
- Ermawati, T.,Nagari, DF.,Praharani, D.,Sari, DS.2019.Effect of Lipopolysaccharide Induction of *Porphyromonas gingivalis* on Osteoclast and Osteoblast Cell Number of Wistar Rats' Alveolar Bone.*International Journal of Applied Pharmaceutics*.11(4):64-67.

- Farhaty, N., Muchtaridi.2016. Tinjauan kimia dan aspek farmakologi senyawa asam klorogenat pada biji kopi: Review. *Farmaka*. 14(1):214 – 227.
- Figueredo, CM.,Junior, LM., Love, RM.2019.T and B Cells in Periodontal Disease: New Function in Complex Scenario.*International Journal of Molecular Science*.20(3949):1-13.
- Ford, P.,Gamonal, J.,Seymour GJ.2010.Immunological Differences And Similarities Between Chronic Periodontitis And Aggressive Periodontitis. *Journal of Periodontology* 2000.53(22):111-123.
- Garg, S.2015. Local drug delivery systems as an adjunct to cure periodontitis; the novel dental applicant. *Pharmateutical Methods*.6(1):1-8.
- Glowczyk, I.,Wong, A.,Potempa, B.,Babyak, O.,Lech, M.,Lamont, RJ.,Potempa, J.,Koziel, J.2017.Inactive Gingipains from P.gingivalis Selectively Skews T Cells toward a Th17 Phenotype in an IL-6 Dependent Manner.*Frontiers in Celuller and Infection Microbiology*.7(140):1-16.
- Golijanin, R.,Milosajivecic, Z.2015.Morphometric analysis of collagen andinflammatory cells in periodontal diseases.*Vojnosanitetski Pregled*.72(3):219-224.
- Gordon, S.R.,Maute, R.L.,Dulken, B,W.,Hutter, G.,George, B.M.,McCracken, M.N.2017.PD-1 expression by tumor-associated macrophages inhibtis phagocyte and tumour immunity.*Journal Nature*.545(7655):495-499.
- Hassan, HS., Sule, MI.,Musa, AM.,Musa, KY.,Abubakar, MS.,Hassan AS.2012.Anti-Inflammatory Activity Of Crude Saponin Extracts From Five Nigerian Medicinal Plants.*Complement Alternative Medicine*.9(2):250-255.
- How, YK.,Song, PK.,Chan GK.2016.Porphyromonas gingivalis: An Overview of periodontopathic patogen below the gum line.*Frontiers in Microbiology*.7(53):1-14.
- Hume, D.A.2008.Macrophages as APC and the dendritic cell myth.*Journal of Immunology*.181(9):5829-5835.
- Hwang, SJ.,Kim, YW.,Park, Y.,Lee, HJ.,Kim, KW.2014. Anti-Inflammatory Effects Of Chlorogenic Acid In Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Journal of Inflammation*.63(1):81-90.

- Hwang, JH., Kim, KJ.,Ryu, SJ.,Lee, BY.2016.Caffeine prevents LPS – induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells and zebrafish.*Chemical Biology Interaction Journal*.25(248):1-7.
- Italiani, P.,Boraschi, D.2015.New Insights Into Tissue Macrophages: From Their Origin to the Development of Memory. *Journal of Immune Networks*.15(4):167-176.
- Kang, CH.,Jayaasooria, RP.,Dilshara, MD.,Choi, YC.,Jeong, KJ. 2012.Caffeine Suppresses Lipopolysaccharide-Stimulated BV2 Microglial Cells By Suppressing Akt-Mediated NF-Kb Activation And ERK Phosphorylation.*Food and Chemical Toxicology*.50(33):4270-4276.
- Kenisa, P.,Istiati,Setyari WJ.2012. Effect Of Robusta Coffee Beans Ointment On Full Thickness Wound Healing.*Dental Journal*.45(1):52-57.
- Kinane, D.F.,Stathopoulou, P.G., Papapanou P.N.2017.Periodontal disease.*Nature Review Disease Primer*.3(17308):334-339.
- Kumar, P.N.,Moideen, K.,Viswanathan, V.,Shruthi B.S.,Babu, S.2018. Elevated levels of matrix metalloproteinases reflect severity and extent of disease in tuberculosis-diabetes co-morbidity and are predominantly reversed following standard antituberculosis or metformin treatment.*BMC Infectious Disease*.18(345):1-10.
- Kuncoro, S., Sutiarmo, L.,Nugroho J.2018. Masithoh E.Kinetika Reaksi Penurunan Kafein dan Asam Klorogenat Biji Kopi Robusta melalui Pengukusan Sistem Tertutup.*Jurnal Agritech*.38(1):105-111.
- Koyasu, S., Moro, K.2012.Role of Innate Lymphocyte in Infections and Inflammation.*Journal of Front Immunology*.3(101):1-13.
- Lara, D. R.2010. Caffeine, Mental Health, And Psychiatric Disorders. *Journal of Alzheimer's Disease*.20(1):<https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1378>.
- LaRosa, DF., Orange, JS.2008.Lymphocyte.*Journal of Allergy and Clinical Immunology*.121(2):S364-S369.
- Li X, Koltveit KM, Tronstad L, Olsen I.2010.Systemic Disease Caused By Oral Infection. *Clinical Microbiology Journal*13(5):47-58.
- Liang, N.,Kitts, DD.2015. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Journal of Nutrition*.8(1):16-52.
- Lindberg, TY.,Bage, T. Inflammatory Mediators In The Pathogenesis Of Periodontitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine Journal*.15(e7):1-22.

- Lingga, RA.,Pato, U.,Rossi, E.2015.Uji Antibakteri Ekstrak Batang Kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.JOM Faperta.2(2):1-15.
- Mariano, SF.,Duque, C.,Jofling, HF.2010.The Role Of Immune System In The Development Of Periodontal Disease: a brief review. *Journal of odonto Science*.25(3):300-305.
- Mescher,AL.2011.Histologi Dasar Junqueira: Teks dan Atlas. Edisi ke – 12.Alih bahasa: Frans Dani. Jakarta:EGC.
- McWhorter, FY.,Davis, CT.,Liu, WF.2015. Physical And Mechanical Regulation Of Macrophage Phenotype And Function. *Cell Molecular Life Scientific*.72(7): 1303–1316.
- Mustafiah, SE.,Fatmawati, D.2011.Indeks Daya Fagosit Makrofag Peritoneum setelah Pemberian Propolis pada Mencit (*Mus musculus*).*Jurnal Unissula*.3(2);121-128.
- Nakayama, M.,Ohara, N.2017.Molecular mechanism of Porphyromonas gingivalis-host cell interaction on periodontal disease.*The Japanese Dental Science Review*.53(4):134-140.
- Newman, MG.,Takei, HH.,Klokkevold, PR.,Carranza, FA.2012.*Carranza's Clinical Periodontology*:11th Edition. ISBN: 978-1-4377-0416-7
- Notoatmojo, S.2010.Metodologi Penelitian Kesehatan. Jakarta: Rineka Cipta.
- Notohartoyo T.I.,Halim, F.2010.Gambaran kebersihan mulut dan gingivitis pada murid sekolah dasar pada puskesmas Sepatan, kabupaten Tangerang.*Media Litbang Kesehatan*.20(4):179 – 187.
- Patay, BE.,Bencsik, T.,Papp, N.2016.Phtochemical Overview and Medicinal Importance of Coffea Species from The Past Until Now.*Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*.9(12):1127-1135.
- Pierce, D.L.,Nishiyama S.I.,Liang, S.,Wang, M.,Demuth, D.R.2009.Host adhesive activities and virulence of novel fimbrial proteins of *Porphyromonas gingivalis*.*Journal of Infection and Immunity*.77(8):3294-3301.
- Prasetya, Rendra C.2013.Jumlah Sel Makrofag Gingiva Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Periodontitis Setelah Pemberian Ekstrak Etanolik Kulit Manggis.*Jurnal Kedokteran Gigi Dentofasial*.12(3):135-138.

- Pruthviraj, P.2011.Evaluation of antibacterial activity of caffeine. *International Journal Of Research In Ayurveda & Pharmacy*.2(4):1354-1357.
- Reef, T.,Ghanem, E.2018. Caffeine: Well-Known As Psychotropic Substance, But Little As Immunomodulator.*Journal of Immunobiology*.4(45):1-8.
- Rius, C.,Abu-taha, M., Hermengildo, C.,Piqueras, L.,Nicolas C.,Issekutz, A.2010.Trans- but Not Cis-Resveratrol Impairs Angiotensin-II-Mediated-Vascular Inflammation through Inhibition Nf- κ B Activation and Peroxisome Proliferator –Activated-Receptor- γ Upregulation.*The Journal of Immunology*.12(23):3719-3730.
- Sherwood, L.2007. Human Physiology From Cells to System. Jakarta: EGC.
- Sherwood, L.2009.Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem.Jakarta:EGC.
- Silva, N.,Abusleme, L.,Bravo, D.,Dutzan, N.2015. Host Response Mechanisms In Periodontal Diseases. *Journal Application Oral Science*.23(3):329-355.
- Singh, B.,Singh, R.2013.Gingivitis: A Silent Disease.*IOSR Journal of Dental and Medicine Sciences (IOSR – JDMS)*.6(5):30-33.
- Singh, P., Rani, B.,Maheswari, R.,Chauhan, A.K.2011.Diverse therapeutic application of Aloe Vera.*Journal of Advance Scientific Research*.2(4):4-11.
- Susanti, M.2019.Farmakokinetika dan Bioavailabilitas Senyawa Golongan Santon Review Komprehensif.*Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia*.8(2):46-51.
- Swastini, AP.,Mahadewa GB.,Widyadharma, IP.2019.Alveolar Bone Osteoclast Profile in the Periodontitis Wistar Rats Model with the Snail Slime (*Achatina fulica*) Application.*Open Access Maced J Med Sci*.7(10):1680-1684.
- Tajik, N.,Tajik, M.,Mack, I.,Enck P.2017. The Potential Effects Of Chlorogenic Acid, The Main PhenolicComponents In Cofee, On Health: A Comprehensive Review Of The Literature.*Springer*.56(33):2215-2244.
- Tangney, C.,Rasmussen, HE.2013. Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Journal of Curr Atherosclerosis*.15(5):324 – 329.
- USDA PLANTS Database.2019.Classification for Kingdom Plantae down to Species *Coffea canephora* 13 April

2020. <https://plants.sc.egov.usda.gov/core/profile?symbol=COCA39>. Diakses pada 13 April 2020.

- Warnasih, S., Yulia W., Yohan B., Artika M., Sasmono TR. 2014. Induksi Ekspresi Gen Sitokin/ Kemokin pada Sel Makrofag Manusia yang Dipapar Virus Dengue Isolat Indonesia. *Jurnal Current Biochemistry IPB*.1(3):146-157.
- Watanabe, Takuya., Yoichi A., Yuki M., Tatsuya K., Wataru O., Yasushi K. 2004. The Blood Pressure-Lowering Effect and Safety of Chlorogenic Acid from Green Coffee Bean Extract in Essential Hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*.28(32):439-449
- Xu, C.S., Chen, H., Zhang, X., Zhai, H.J., Liu, X., Qin, A., Lu, E. 2014. Simvastatin prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis after ovariectomy. *Journal of Translational Medicine*.12(1284):1-9.
- Xue, N., Zhou, Q., Ji, M., Jin, J. 2016. Chlorogenic Acid Inhibits Glioblastoma Growth Through Repolarizing Macrophage From M2 To M1 Phenotype. *Journal of Scientific Reports*.7(39011):1-11.
- Yang, SW., Ko, JK., Kim, E., Kim, HY., Park, JG. 2014. 21-O-Angeloyltheasapogenol E3, a Novel Triterpenoid Saponin from the Seeds of Tea Plants, Inhibits Macrophage-Mediated Inflammatory Responses in a NF- κ B in Dependent Manner. *Mediators of Inflammation*.44(12):1-9.
- Zhang, R., Yang, J., Wu, J., Sun, W.B., Liu, Y. 2016. Effect Of Deletion Of The RgpA Gene On Selected Virulence Of *Porphyromonas Gingivalis*. *Journal of Dental Sciences*.11(3):279-286.


LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat keterangan *Ethical Clearance*

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</p>	
<p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL No.597/UN25.8/KEPK/DL/2019</p>	
Title of research protocol	: *The Effect of Giving Robusta Coffe Bean (<i>coffea canephora</i>) Extract Gel Against the Number of Macrophage and Lymphocytea Gingival Tissue in a Periodontitis Mice with <i>Porphyromonas Ginggivalis</i> Induced*
Document Approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Astrid Ganadya Nurul Iffah
Member of research	: -
Responsible Physician	: Astrid Ganadya Nurul Iffah
Date of approval	: Oktober- November 2019
Place of research	: 1. Lab. Teknik Sedia Likuida Semosoloda Bag. Farmasetika, Fakultas Farmasi UNEJ 2. Lab. Bioscience FKG UNEJ 3. Lab. Hewan Coba Bag. Biomedik FKG UNEJ 4. Lab. Histologi FKG UNEJ
<p>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.</p>	
<p>Jember, October 23th 2019</p>	
 (drg. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros.)	 (dr. Ayu Ratna Dewanti, M.Si.)

Lampiran 2 Surat Identifikasi Tanaman Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0


KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
LABORATORIUM TANAMAN
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 22/PL17.3.1.02/LL/2019

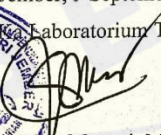
Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 5735/UN25.8/TL/2019 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:


Nama : Astrid Ganadya Nurul Iffah
NIM : 161610101101
Jur/Fak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub Kelas: Asteridae; Ordo: Rubiales; Famili: Rubiaceae; Genus: Coffea; Spesies: Coffea canephora, Pierre.

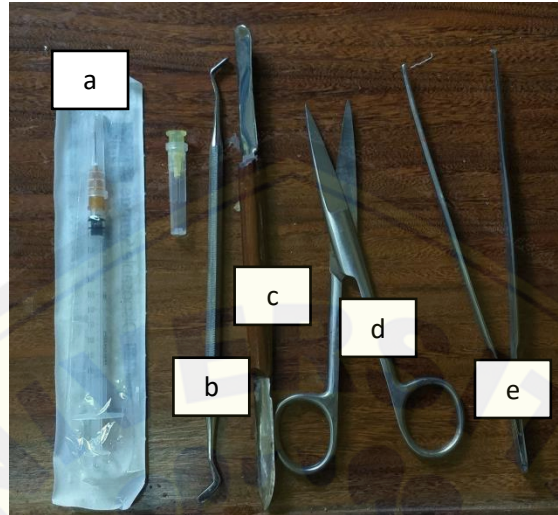
Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 9 September 2019
Laboratorium Tanaman


Lark Mastuti, MP
No. 195808201987032001



Lampiran 3 Alat dan Bahan



Gambar C.1, a. Sduit, b. *Plastis filling instrument*, c. pisau malam, d. Gunting bedah, e. Pinset sirurgis



Gambar C.2, *Dental Rat Chair*



Gambar C.3, Mikrotom



Gambar C.4, *Waterbath*



Gambar C.5. Mikroskop Cahaya



Gambar C.6, Sampel tikus wistar



Gambar C.7, suspensi bakteri *P.gingivalis*



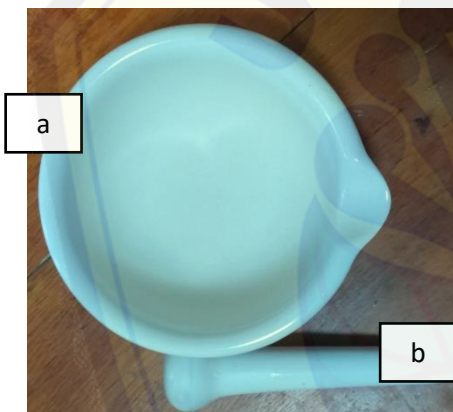
Gambar C.8, Loyang



Gambar C.9, Oven



Gambar C.10 Rotary Evaporator

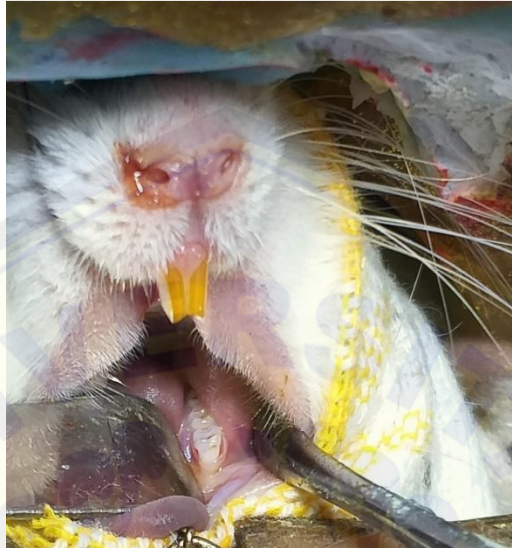


Gambar C.11, a. Mortar dan b. Pestle



Gambar C.12, Neraca

Lampiran 4 Gambaran Klinis dan Radiografi Periodontitis



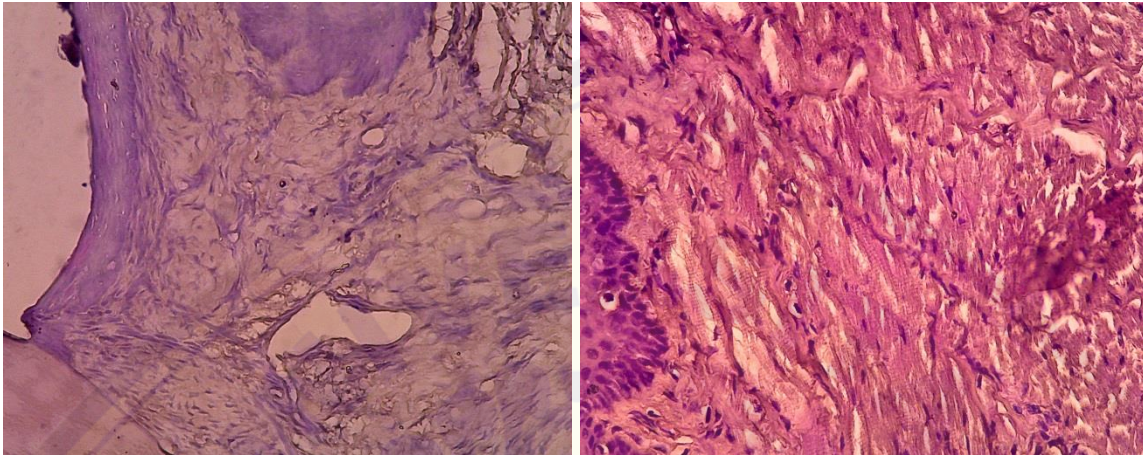
Gambar 4.1 Gambaran klinis periodontitis pada tikus yaitu terdapat kemerahan pada gingiva dan resesi gingiva



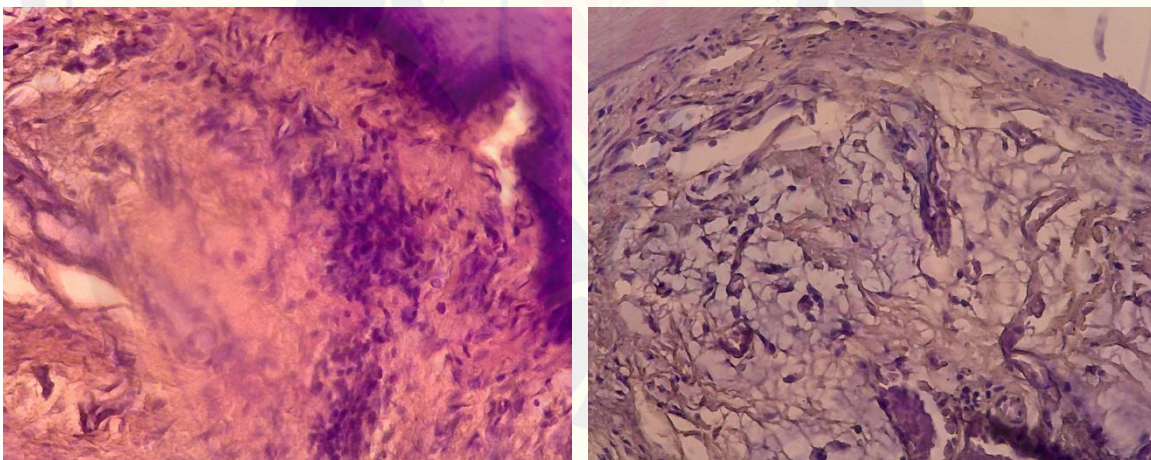
Gambar 4.2 Gambaran ronsenologis periodontitis pada tikus yaitu terdapat resorpsi tulang alveolar

Lampiran 5 Hasil gambar preparat histologi

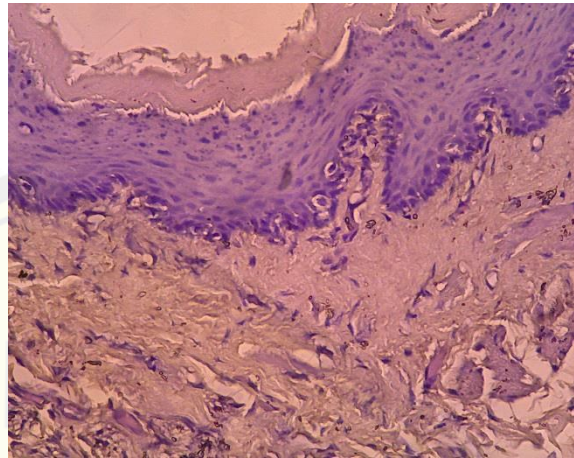
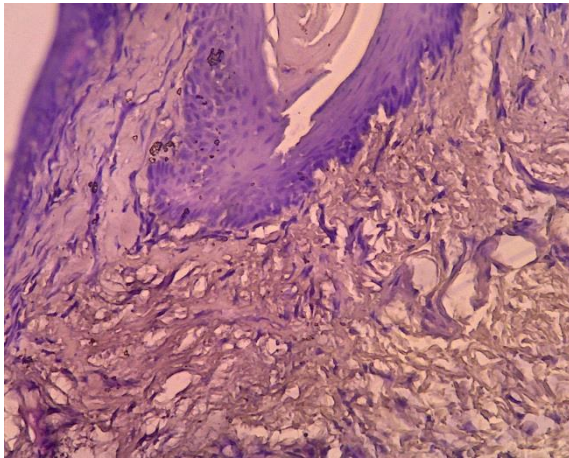
Kelompok Kontrol



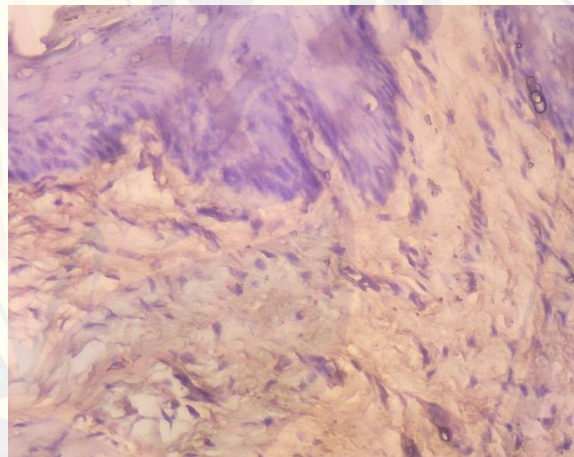
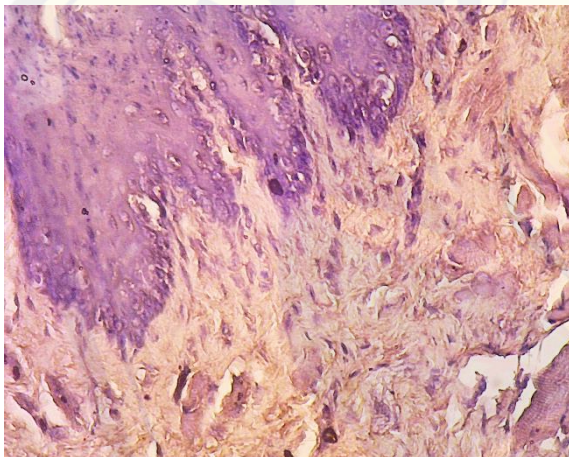
Kelompok Periodontitis



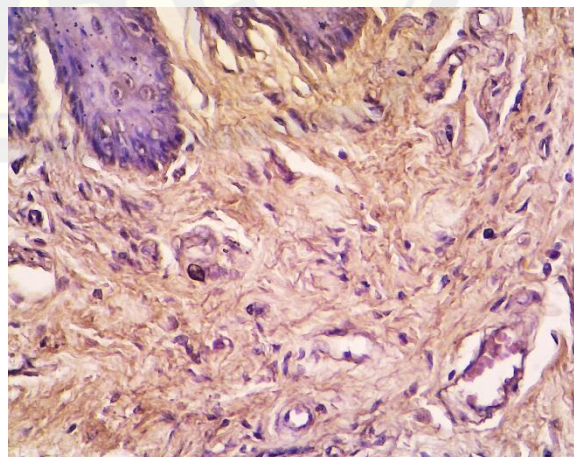
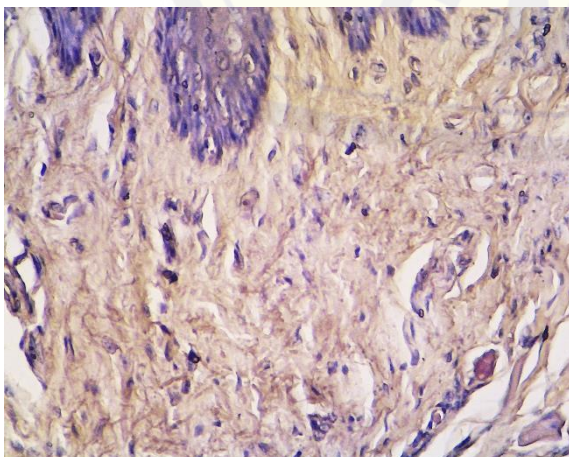
Kelompok periodontitis + gel aloclair



Kelompok Periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL



Kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL



Lampiran 6 Hasil Rerata Jumlah sel Makrofag dan Limfosit

a. Sel makrofag

KELOMPOK KONTROL

Kelompok Pengamatan hari Ke	tikus	Pengamat									Jumlah rata - rata makrofag tikus
		1			2			3			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
7	K1-1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
7	K1-2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0,7
7	K1-3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0,7
7	K1-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
											0,6

KELOMPOK PERIODONTITIS

Kelompok Pengamatan hari Ke	tikus	Pengamat									Jumlah rata - rata makrofag tikus
		1			2			3			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
7	K2-1	5	3	3	5	6	5	4	3	7	13,7
7	K2-2	5	4	4	4	3	4	5	4	3	12,0
7	K2-3	3	5	3	5	4	5	3	5	4	12,3
7	K2-4	5	6	4	4	5	3	6	4	4	13,7
											12,9

KELOMPOK ALOCLAIR GEL

Kelompok Pengamatan hari Ke	tikus	Pengamat									Jumlah rata - rata makrofag tikus
		1			2			3			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
7	K3-1	3	4	3	2	3	3	2	2	3	8,3
7	K3-2	2	2	3	3	1	3	2	1	3	6,7
7	K3-3	2	2	3	5	3	1	3	2	3	8,0
7	K3-4	1	3	5	3	1	2	2	1	3	7,0
											7,5

**KELOMPOK PERIODONTITIS + GEL
EKSTRAK BIJI KOPI 0,025 g/MI**

Kelompok Pengamatan hari Ke	tikus	Pengamat									Jumlah rata - rata makrofag tikus
		1			2			3			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
7	K4-1	4	5	3	4	4	4	2	4	2	10,7
7	K4-2	1	3	3	2	3	2	2	3	2	7,0
7	K4-3	4	2	3	3	3	1	3	2	2	7,7
7	K4-4	4	5	4	5	3	3	4	3	3	11,3
											9,2

**KELOMPOK PERIODONTITIS + GEL
EKSTRAK BIJI KOPI 0,05 g/mL**

Kelompok Pengamatan hari Ke	tikus	Pengamat									Jumlah rata - rata makrofag tikus
		1			2			3			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
7	K5-1	3	3	2	2	1	2	2	3	3	7
7	K5-2	3	4	4	1	2	4	3	4	3	9,3
7	K5-3	3	1	3	4	3	1	3	2	2	7,3
7	K5-4	1	3	3	4	4	2	2	2	1	7,3
											7,8

b. Sel Limfosit

Kelompok Kontrol

Kelompok Pengamatan hari Ke	tikus	Pengamat									Jumlah rata - rata limfosit tikus
		1			2			3			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
7	K1-1	2	0	0	0	0	1	0	1	0	1,3
7	K1-2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1,0
7	K1-3	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1,0
7	K1-4	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1,7
											1,3

Kelompok Periodontitis

Kelompok Pengamatan hari Ke	tikus	Pengamat									Jumlah rata - rata limfosit tikus
		1			2			3			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
7	K2-1	15	11	19	12	13	17	13	18	14	44
7	K2-2	18	18	19	20	17	19	16	19	19	55
7	K2-3	18	25	23	16	22	26	18	24	20	64
7	K2-4	23	17	14	20	14	12	20	19	20	53
											54

Kelompok periodontitis + Gel Aloclair

Kelompok Pengamatan hari Ke	tikus	Pengamat									Jumlah rata - rata limfosit tikus
		1			2			3			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	
7	K3-1	8	2	5	6	2	5	6	4	4	14,0
7	K3-2	5	4	5	6	4	4	4	5	6	14,3
7	K3-3	3	6	5	8	7	6	6	4	6	17,0
7	K3-4	4	8	3	4	3	2	4	3	5	12,0
											14,3

Lampiran 7 Hasil Analisis Data

		Tests of Normality					
kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
makrofag	kelompok kontrol	,343	4	.	,875	4	,316
	kelompok periodontitis	,305	4	.	,802	4	,106
	kelompok periodontitis + gel aloclair	,242	4	.	,900	4	,433
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	,262	4	.	,868	4	,290
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	,406	4	.	,742	4	,032
	kelompok kontrol	,275	4	.	,854	4	,241
limfosit	kelompok periodontitis	,202	4	.	,981	4	,909
	kelompok periodontitis + gel aloclair	,255	4	.	,959	4	,775
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	,217	4	.	,959	4	,776
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	,304	4	.	,807	4	,115

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
makrofag	11,997	4	15	,000
limfosit	2,613	4	15	,077

UJI KRUSKALL-WALLIS

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank
makrofag	kelompok kontrol	4	2,50
	kelompok periodontitis	4	18,50
	kelompok periodontitis + gel aloclair	4	9,25
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	4	12,25
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	4	10,00
	Total	20	

Test Statistics^{a,b}

	makrofag
Chi-Square	15,266
df	4
Asymp. Sig.	,004

a. Kruskal Wallis Test
 b. Grouping Variable: kelompok

UJI MANN-WHITNEY

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
makrofag	kelompok kontrol	4	2,50	10,00
	kelompok periodontitis	4	6,50	26,00
	Total	8		

Test Statistics^a

	makrofag
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,337
Asymp. Sig. (2-tailed)	,019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^b

a. Grouping Variable: kelompok
 b. Not corrected for ties.

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	kelompok kontrol	4	2,50	10,00
	kelompok periodontitis + gel aloclair	4	6,50	26,00

Test Statistics^a

	makrofag
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,323
Asymp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^b

a. Grouping Variable: kelompok
 b. Not corrected for ties.

				Test Statistics ^a	
				makrofag	
makrofag	Total	8		Mann-Whitney U	,000
				Wilcoxon W	10,000
				Z	-2,323
				Asymp. Sig. (2-tailed)	,020
				Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^b
makrofag					

a. Grouping Variable: kelompok
 b. Not corrected for ties.

Ranks					Test Statistics ^a	
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks	makrofag	
makrofag	kelompok kontrol	4	2,50	10,00	Mann-Whitney U	,000
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	4	6,50	26,00	Wilcoxon W	10,000
					Z	-2,337
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,019
					Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^b
	Total	8				

a. Grouping Variable: kelompok
 b. Not corrected for ties.

Ranks					Test Statistics ^a	
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks	makrofag	
makrofag	kelompok periodontitis	4	6,50	26,00	Mann-Whitney U	,000
	kelompok periodontitis + gel aloclair	4	2,50	10,00	Wilcoxon W	10,000
					Z	-2,323
					Asymp. Sig. (2-tailed)	,020
	Total	8			Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^b

a. Grouping Variable: kelompok
 b. Not corrected for ties.

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
makrofag	kelompok periodontitis	4	6,50	26,00
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics^a

	makrofag
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,323
Asymp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
makrofag	kelompok periodontitis	4	6,50	26,00
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics^a

	makrofag
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,337
Asymp. Sig. (2-tailed)	,019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
makrofag	kelompok periodontitis + gel alocclair	4	3,63	14,50
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	4	5,38	21,50
	Total	8		

Test Statistics^a

	makrofag
Mann-Whitney U	4,500
Wilcoxon W	14,500
Z	-1,016
Asymp. Sig. (2-tailed)	,309
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,343 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
makrofag	kelompok periodontitis + gel aloclair	4	4,13	16,50
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	4	4,88	19,50
	Total	8		

Test Statistics^a

	makrofag
Mann-Whitney U	6,500
Wilcoxon W	16,500
Z	-,438
Asymp. Sig. (2-tailed)	,661
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,686 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks

	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
makrofag	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	4	5,38	21,50
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	4	3,63	14,50
	Total	8		

Test Statistics^a

	makrofag
Mann-Whitney U	4,500
Wilcoxon W	14,500
Z	-1,023
Asymp. Sig. (2-tailed)	,306
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,343 ^b

a. Grouping Variable: kelompok

b. Not corrected for ties.

UJI ONE WAY ANOVA

Descriptives

limfosit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kelompok kontrol	4	1,250	,3317	,1658	,722	1,778	1,0	1,7
kelompok periodontitis	4	54,000	8,2057	4,1028	40,943	67,057	44,0	64,0
kelompok periodontitis + gel aloclair	4	14,325	2,0549	1,0274	11,055	17,595	12,0	17,0
kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	4	22,575	3,0082	1,5041	17,788	27,362	19,0	25,7
kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	4	15,975	1,9551	,9776	12,864	19,086	14,3	18,0
Total	20	21,625	18,4265	4,1203	13,001	30,249	1,0	64,0

ANOVA

limfosit

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6197,585	4	1549,396	91,640	,000
Within Groups	253,612	15	16,908		
Total	6451,197	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: limfosit

Digital Repository Universitas Jember

LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kelompok kontrol	kelompok periodontitis	-52,7500*	2,9075	,000	-58,947	-46,553
	kelompok periodontitis + gel aloclair	-13,0750*	2,9075	,000	-19,272	-6,878
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	-21,3250*	2,9075	,000	-27,522	-15,128
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	-14,7250*	2,9075	,000	-20,922	-8,528
kelompok periodontitis	kelompok kontrol	52,7500*	2,9075	,000	46,553	58,947
	kelompok periodontitis + gel aloclair	39,6750*	2,9075	,000	33,478	45,872
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	31,4250*	2,9075	,000	25,228	37,622
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	38,0250*	2,9075	,000	31,828	44,222
kelompok periodontitis + gel aloclair	kelompok kontrol	13,0750*	2,9075	,000	6,878	19,272
	kelompok periodontitis	-39,6750*	2,9075	,000	-45,872	-33,478
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	-8,2500*	2,9075	,012	-14,447	-2,053
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	-1,6500	2,9075	,579	-7,847	4,547
kelompok periodontitis + gel aloclair	kelompok kontrol	21,3250*	2,9075	,000	15,128	27,522

gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	kelompok periodontitis	-31,4250*	2,9075	,000	-37,622	-25,228
	kelompok periodontitis + gel aloclair	8,2500*	2,9075	,012	2,053	14,447
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	6,6000*	2,9075	,038	,403	12,797
	kelompok periodontitis	14,7250*	2,9075	,000	8,528	20,922
kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,05 g/mL	kelompok periodontitis	-38,0250*	2,9075	,000	-44,222	-31,828
	kelompok periodontitis + gel aloclair	1,6500	2,9075	,579	-4,547	7,847
	kelompok periodontitis + gel ekstrak biji kopi robusta 0,025 g/mL	-6,6000*	2,9075	,038	-12,797	-,403

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