



**POTENSI GEL EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA TERHADAP  
JUMLAH PEMBULUH DARAH PADA PENYEMBUHAN  
LUKA PASCA GINGIVEKTOMI PADA  
TIKUS WISTAR**

**SKRIPSI**

Oleh  
**Raquel Ananda Hasa**  
**NIM 161610101100**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**



**POTENSI GEL EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA TERHADAP  
JUMLAH PEMBULUH DARAH PADA PENYEMBUHAN  
LUKA PASCA GINGIVEKTOMI PADA  
TIKUS WISTAR**

**SKRIPSI**

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

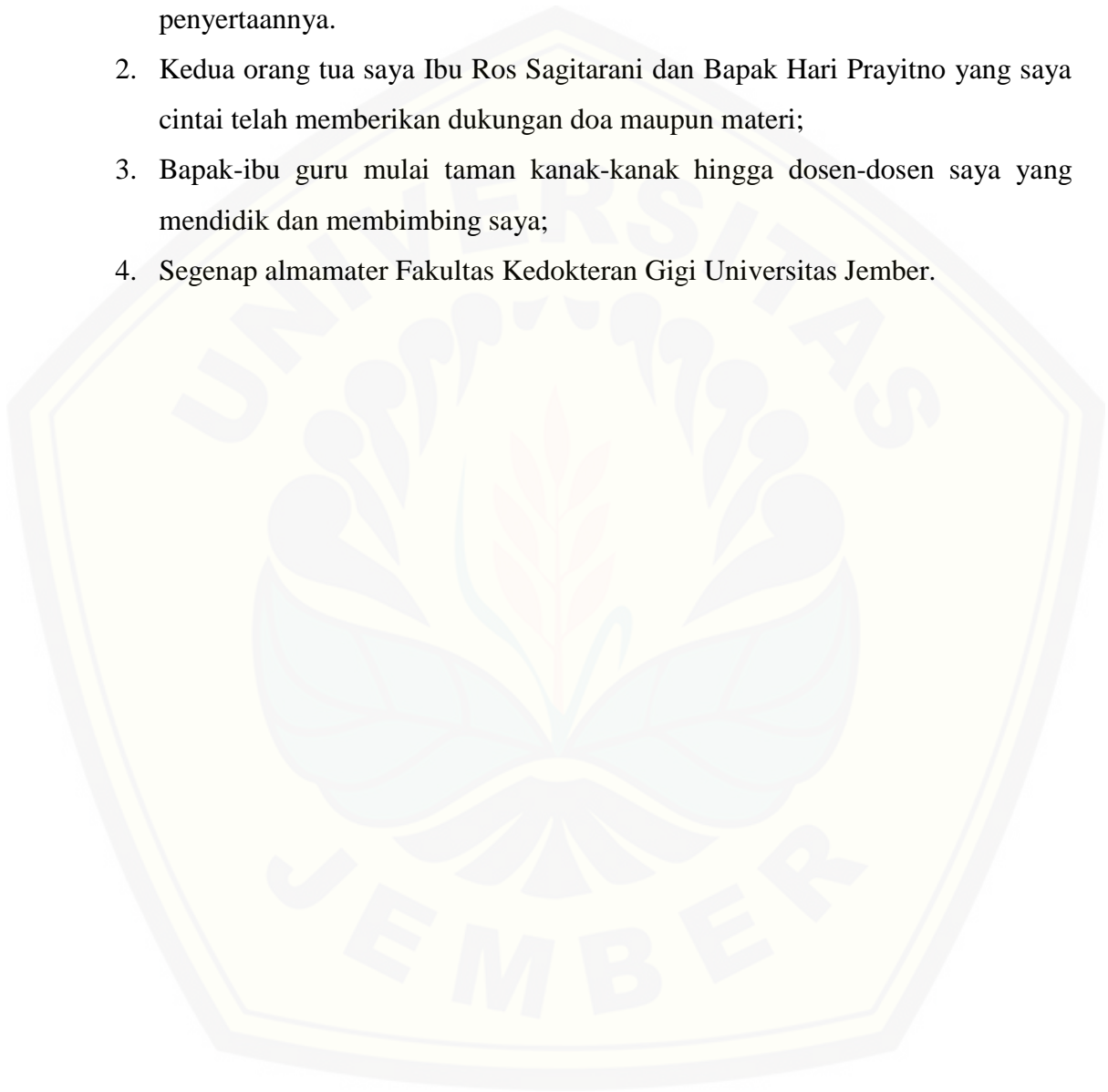
Oleh  
**Raquel Ananda Hasa**  
**NIM 161610101100**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Tuhan Yang Maha Kuasa yang senantiasa melimpahkan kasih dan penyertaannya.
2. Kedua orang tua saya Ibu Ros Sagitarani dan Bapak Hari Prayitno yang saya cintai telah memberikan dukungan doa maupun materi;
3. Bapak-ibu guru mulai taman kanak-kanak hingga dosen-dosen saya yang mendidik dan membimbing saya;
4. Segenap almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



**MOTTO**

Aku menjawab: Jika engkau makan atau engkau minum, atau jika engkau  
Melakukan segala sesuatu yang lain, lakukanlah semuanya itu  
untuk kemuliaan Allah.  
(1 Korintus 10:31)<sup>\*)</sup>

Sebab bagi Allah tidak ada yang mustahil.  
(Lukas 1:37)<sup>\*)</sup>

This too shall pass.  
(anonim)

---

<sup>\*)</sup> Lembaga Alkitab Indonesia. 2008. Alkitab Terjemahan Baru. Jakarta: Lembaga Alkitab Indonesia.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Raquel Ananda Hasa

NIM : 161610101100

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Skripsi yang berjudul “Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta terhadap Jumlah Pembuluh Darah pada Penyembuhan Luka Pasca Gingivektomi pada Tikus Wistar” adalah benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan 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 dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 Juli 2020

Yang menyatakan,

Raquel Ananda Hasa

NIM 161610101100

**SKRIPSI**

**POTENSI GEL EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA TERHADAP JUMLAH  
PEMBULUH DARAH PADA PENYEMBUHAN LUKA PASCA  
GINGIVECTOMI PADA  
TIKUS WISTAR**

Oleh

**Raquel Ananda Hasa**

**NIM 161610101100**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Melok Aris Wahyukundari, M.Kes., Sp.Perio

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Pudji Astuti, M.Kes.

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul “Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta terhadap Jumlah Pembuluh Darah pada Penyembuhan Luka Pasca Gingivektomi pada Tikus Wistar” telah di uji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi pada :

Hari, tanggal :

Tempat :

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

Dr. drg. Iin Eliana T, M.Kes.

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes.

NIP. 197512022003122001

NIP. 197005091999032001

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drg. Melok Aris Wahyukundari, M.Kes, Sp.Perio. drg. Pudji Astuti, M.Kes.

NIP.197104092005012002

NIP. 196810201996012001

Mengesahkan

Dekan,

drg. R Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prod.

NIP.196901121996011001

## RINGKASAN

**Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta terhadap Jumlah Pembuluh Darah pada Penyembuhan Luka Pasca Gingivektomi pada Tikus Wistar;** Raquel Ananda Hasa; 161610101100; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Gingivektomi merupakan salah satu bedah periodontal. Gingivektomi biasanya digunakan untuk menghilangkan jaringan gingiva yang membesar dan menghilangkan dinding poket periodontal dan menciptakan bentuk anatomis yang fisiologis dan fungsional. Pasca tindakan bedah gingivektomi, maka akan terjadi jejas luka pada jaringan periodontal terutama gingiva. Penyembuhan luka pada gingivektomi merupakan proses yang lambat. Penggunaan bahan alami sebagai obat yang dapat digunakan untuk membantu proses penyembuhan luka mulai banyak diteliti dan dikembangkan, salah satunya adalah kopi.

Kopi mengandung alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin yang memiliki efek yang baik pada tubuh. Saponin dapat meningkatkan pembentukan pembuluh darah baru dengan cara meningkatkan aktivitas VEGF yang dapat menginduksi terjadinya mitosis pembuluh darah baru. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai ekstrak biji kopi robusta dalam sediaan gel dalam mempercepat proses penyembuhan luka pasca gingivektomi.

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories*, dengan sampel total sejumlah 32 ekor tikus wistar jantan yang dibagi dalam 4 kelompok yaitu dengan medikasi pasca gingivektomi menggunakan gel dengan konsentrasi 40%, 50%, 60% dan kelompok tanpa perlakuan atau kelompok kontrol negatif. Pengamatan pada masing-masing kelompok dilakukan dua kali yaitu pada hari ketiga dan hari ketujuh dimana tikus wistar akan dikorbankan dan diambil rahangnya untuk dijadikan sediaan histologi. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop binokular perbesaran 1000x, pembuluh darah dihitung dan dirata-rata. Data hasil penelitian selanjutnya dianalisa menggunakan *One Way Anova* dengan taraf signifikansi 95% ( $\alpha = 0,05$ ) dan *LSD* ( $\alpha = 0,05$ ) untuk melihat perbedaan lebih lanjut jumlah pembuluh darah antar kelompoknya.



Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok dengan pemberian medikasi gel ekstrak biji kopi robusta memiliki jumlah rata-rata pembuluh darah lebih tinggi dibandingkan dengan jumlah rata-rata pembuluh darah pada kelompok kontrol negatif. Hasil pengamatan kelompok dengan perlakuan pemberian medikasi gel ekstrak biji kopi robusta 50% memiliki jumlah rata-rata pembuluh darah tertinggi jika dibandingkan dengan kelompok lainnya. Berdasarkan penelitian tersebut dapat diambil kesimpulan bahwa gel ekstrak biji kopi robusta memiliki efek meningkatkan jumlah pembuluh darah pada luka pasca gingivektomi, dan konsentrasi optimum konsentrasi 50%.

## PRAKATA

Mengucapkan puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena hanya dengan kasih karunia-Nya penyusunan tugas akhir dengan judul "Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta terhadap Jumlah Pembuluh Darah pada Penyembuhan Luka Pasca Gingivektomi pada Tikus Wistar" dapat terselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat penyelesaian pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Terselesainya seluruh tugas akhir ini tidak lepas dari bantuan, motivasi dan semangat dari banyak pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan banyak-banyak terimakasih kepada:

1. Kedua orangtua saya, bapak Hari Prayitno dan ibu Ros Sagitarani yang memberikan doa, kasih, semangat serta dukungan moril dan materiil pada penulis selama masa penyusunan tugas akhir ini;
2. Keluarga besar Wintjoko dan Sukarno yang selalu mendukung sepenuh hati selama masa penyusunan tugas akhir;
3. dr. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp. Pros. Selaku dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
4. drg. Melok Aris Wahyukundari, M. Kes, Sp. Perio selaku dosen pembimbing utama dan drg. Pudji Astuti, M.Kes. selaku dosen pembimbing pendamping yang sudah dengan sabar membimbing selama penyusunan tugas akhir;
5. Dr. drg. Iin Eliana T, M.Kes selaku dosen penguji ketua dan Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes. selaku dosen penguji anggota yang telah banyak membantu dan meluangkan waktu untuk berdiskusi, memberikan saran, masukan, serta kritik yang sangat berharga dalam menyempurnakan skripsi ini;
6. Dr. drg. Purwanto, M.Kes. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama saya kuliah di FKG;
7. Seluruh dosen dan staff laboratorium tanaman Politeknik Jember, laboratorium CDAST, Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi

Universitas Jember yang banyak membantu dalam proses penelitian dan penyusunan tugas akhir

8. Seluruh dosen dan staff laboratorium Fisiologi, Histologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi yang banyak membantu dalam proses penelitian dan penyusunan tugas akhir;
9. Prof. drg. Mei Syafriadi, M.DSc., Ph.D, Sp.PMM(K) yang sudah turut membantu dalam proses penelitian hingga berjalan baik;
10. Seluruh staf pengajar dan karyawan FKG Universitas Jember;
11. Teman-teman satu penelitian yang sudah bersemangat, berdiskusi dan bekerja sama dengan baik; Nailah, Dania dan Aruni;
12. Teman-teman baik saya yang juga tidak lelah mendengar keluh kesah saya dan membantu sebaik mungkin; Nandita, Dara, Annisa, Firmansyah, Diska, Arba, Syifa, Rafi, Anggi, Qonita, Okta, Jevina, Bintang, Yenny, Kartika, Shania, Alfan.
13. Seluruh teman-teman Dextra 2016 yang tidak mampu disebut satu persatu yang turut menemani, bekerja sama dan belajar bersama hingga bisa sampai ke tahap tugas akhir ini.

Penulis menyadari keterbatasan dan kekurangan penulisan skripsi ini, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan. Penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 20 Juli 2020

Penulis

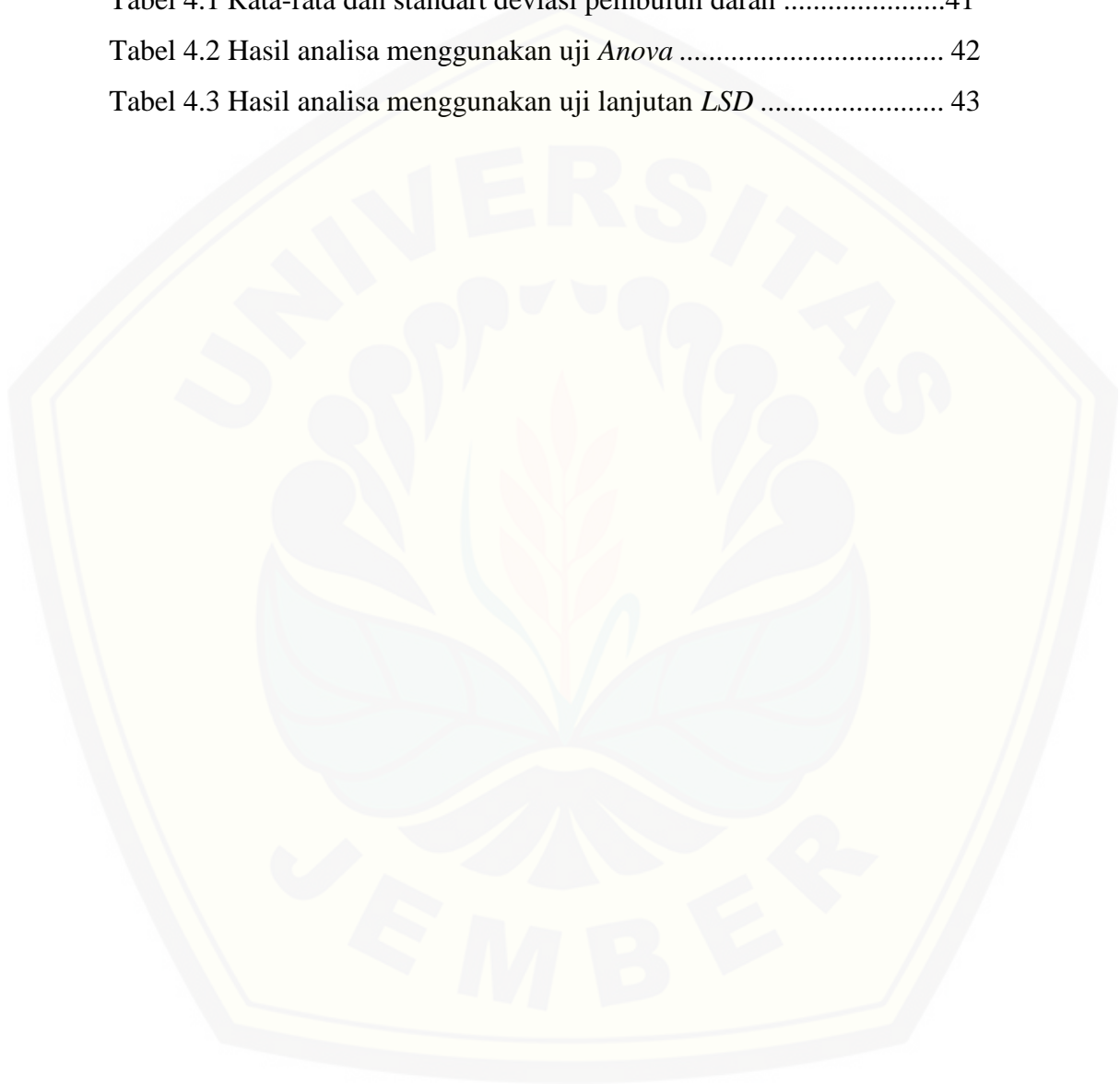
DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN BIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTARGAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 <b>Latar Belakang</b> .....	1
1.2 <b>Masalah Penelitian</b> .....	3
1.3 <b>Tujuan Penelitian</b> .....	3
1.4 <b>Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1 <b>Kopi Robusta</b> .....	5
2.1.1 <b>Klasifikasi Kopi Robusta</b> .....	5
2.1.2 <b>Kandungan Kopi Robusta</b> .....	7
2.2 <b>Penelitian Terdahulu</b> .....	8
2.3 <b>Gingivektomi</b> .....	9
2.4 <b>Proses Penyembuhan Luka</b> .....	11
2.4.1 <i>Healing Cascade</i> .....	11
2.4.2 <b>Fase Inflamasi</b> .....	12
2.4.3 <b>Fase proliferasi</b> .....	12
2.4.4 <i>Fase Remodeling</i> .....	13
2.5 <b>Proses Pembentukan Pembuluh Darah</b> .....	14
2.5.1 <b>Tahapan</b> .....	14
2.6 <b>Pembuluh Darah</b> .....	16
2.6.1 <b>Pembuluh Darah Kapiler</b> .....	16
2.6.2 <b>Pembuluh Darah Arteri</b> .....	17
2.6.3 <b>Pembuluh Darah Vena</b> .....	18
2.7 <b>Peran Kopi terhadap Jumlah Pembuluh Darah</b> .....	20
2.8 <b>Bentuk Sediaan Obat untuk Penyembuhan Luka Gingiva</b> .....	20
2.9 <b>Kerangka Konseptual</b> .....	23
2.10 <b>Hipotesa</b> .....	23
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	24
3.1 <b>Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian</b> .....	24

3.2	<b>Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	24
3.2.1	Tempat Penelitian.....	24
3.2.2	Waktu Penelitian.....	24
3.3	<b>Variabel Penelitian</b> .....	24
3.3.1	Variabel Bebas.....	24
3.3.2	Variabel Terikat.....	24
3.3.3	Variabel Terkendali.....	25
3.4	<b>Definisi Operasional Penelitian</b> .....	25
3.4.1	Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta.....	25
3.4.2	Gingivektomi.....	25
3.4.3	Jumlah Pembuluh Darah.....	26
3.5	<b>Sampel Penelitian</b> .....	26
3.5.1	Besar Sampel.....	26
3.6	<b>Kriteria Hewan Coba</b> .....	27
3.7	<b>Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	28
3.7.1	Alat.....	28
3.7.2	Bahan.....	29
3.8	<b>Perhitungan Dosis</b>	
	<b>Anestesi</b> .....	29
3.9	<b>Prosedur Penelitian</b> .....	30
3.9.1	Pembuatan Ethical Clearance.....	30
3.9.2	Identifikasi Tanaman.....	30
3.9.3	Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta.....	30
3.9.4	Persiapan Hewan Coba.....	31
3.9.5	Perlakuan Hewan Coba.....	32
3.9.6	Pengelompokan Hewan Coba.....	32
3.9.7	Tahap Pembuatan Sediaan.....	34
3.9.8	Tahap Pengecatan <i>Hematoksin Eosin</i> .....	35
3.10	<b>Perhitungan Jumlah Pembuluh Darah</b> .....	36
3.11	<b>Analisis Data</b> .....	36
3.12	<b>Alur Penelitian</b> .....	38
<b>BAB 4.</b>	<b>Hasil dan Pembahasan</b> .....	39
4.1.	<b>Hasil Penelitian</b> .....	39
4.2.	<b>Analisis Data</b> .....	42
4.3.	<b>Pembahasan</b> .....	43
<b>BAB 5.</b>	<b>Kesimpulan dan Saran</b> .....	47
5.1.	<b>Kesimpulan</b> .....	47
5.2.	<b>Saran</b> .....	47
	<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	48
	<b>LAMPIRAN</b> .....	54

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 2.1 Kandungan Kimia pada Kopi Robusta .....	7
Tabel 3. 1 Formulasi Konsentrasi Gel.....	31
Tabel 4.1 Rata-rata dan standart deviasi pembuluh darah .....	41
Tabel 4.2 Hasil analisa menggunakan uji <i>Anova</i> .....	42
Tabel 4.3 Hasil analisa menggunakan uji lanjutan <i>LSD</i> .....	43



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 prosedur gingivektomi .....	11
Gambar 2.2 pembuluh darah dan limfatik pada jaringan adiposa.....	17
Gambar 2.3 arteri kecil dan vena kecil.....	18
Gambar 2.4 Vena sedang dengan katup.....	19
Gambar 2.5 Dinding pembuluh darah vena besar.....	19
Gambar 2.6 Skema Kerangka Konseptual.....	21
Gambar 3.1 Gingivektomi.....	25
Gambar 3.2 Alur Penelitian.....	37
Gambar 4.1 Gambaran histologis luka gingivektomi hari ke-3.....	39
Gambar 4.2 Gambaran histologis luka gingivektomi hari ke-7 .....	40
Gambar 4.3 Histogram rata-rata jumlah pembuluh darah.....	41

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran A Sertifikat Ethical Clearance.....	54
Lampiran B Surat Ijin Identifikasi Tanaman.....	55
Lampiran C Surat Hasil Identifikasi Tanaman.....	56
Lampiran D Surat Ijin Pembuatan Gel.....	57
Lampiran E Surat Ijin Biomedik.....	58
Lampiran F Perhitungan Dosis Anestesi.....	59
Lampiran G Formulasi Gel.....	60
Lampiran H Alat dan Bahan.....	61
Lampiran I Prosedur.....	65
Lampiran J Gambaran Histologis.....	68
Lampiran K Hasil Data.....	92
Lampiran L Analisis Data.....	94



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Gingivektomi merupakan salah satu bedah periodontal. Gingivektomi biasanya digunakan untuk menghilangkan jaringan gingiva yang membesar dan menghilangkan dinding poket periodontal dan menciptakan bentuk anatomis yang fisiologis dan fungsional. Estetik juga menjadi pertimbangan dilakukannya gingivektomi (Newman *et al.*, 2019). Keuntungan dari teknik gingivektomi adalah tekniknya sederhana, dapat mengeliminasi poket serta peradangan gingiva, lapang pandang yang baik serta bentuk gingiva yang dapat disesuaikan (Trijani, 1996).

Pasca tindakan bedah gingivektomi, maka akan terjadi jejas luka pada jaringan periodontal terutama gingiva. Luka merupakan diskontinuitas dari jaringan tubuh (Indaswary, 2011). Ketika terjadi jejas luka pada tubuh, maka akan direspon dengan terjadinya proses regenerasi dengan menggantikan jaringan yang telah mati dengan jaringan baru yang sehat oleh tubuh. Penyembuhan luka pada gingivektomi merupakan proses yang lambat. Pembentukan kembali kontur gingiva yang normal memerlukan waktu beberapa minggu (Meenwat *et al.*, 2013). Penyembuhan luka memiliki beberapa fase, yaitu fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase remodeling.

Segera sesudah terjadi perlukaan maka akan terjadi vasokonstriksi pembuluh darah yang akan dilanjutkan dengan vasodilatasi. Selanjutnya akan terjadi proses inflamasi yaitu munculnya sel-sel radang seperti neutrofil dan makrofag yang akan mengeliminasi benda-benda asing serta sel-sel tubuh yang mati, serta akan membawa mediator-mediator inflamasi seperti prostaglandin dan histamin pada daerah sekitar jejas (Eming *et al.*, 2007). Fase proliferasi terdiri atas proses reepitelialisasi, neovaskularisasi, dan pembentukan jaringan granulasi. (Diegelmann, 2004). Proses pembentukan pembuluh darah baru juga diinisiasi oleh *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang ada ketika terjadi luka (Strodtbeck, 2001; Velnar *et al.*, 2009). Angiogenesis atau pembentukan pembuluh darah baru sangat dibutuhkan pada proses penyembuhan luka.

Pembentukan pembuluh darah baru berperan memberikan suplai oksigen, nutrisi, sel inflamasi, dan menghilangkan jaringan yang mengalami nekrosis (Figg *et al.*, 2008). Penggunaan bahan alami sebagai obat yang dapat digunakan untuk membantu proses penyembuhan luka mulai banyak diteliti dan dikembangkan, salah satunya adalah kopi.

Kopi adalah salah satu minuman paling populer tidak hanya di Indonesia namun juga di dunia. Dua spesies kopi yang sering dibudidayakan dan memberikan nilai ekonomis yaitu *Coffea arabica* yang dikenal sebagai kopi Arabica dan *Coffea canephora* atau kopi Robusta (Farah, 2012). Penelitian mengenai kopi robusta sudah mulai banyak dilakukan untuk mengetahui dan memaksimalkan penggunaan zat-zat yang ada didalamnya.

Komponen kimia yang terkandung di dalam kopi seperti kafein, asam klorogenat, trigonelin, karbohidrat, lemak, asam amino, asam organik, aroma volatile dan mineral dapat menghasilkan efek yang positif dan negatif bagi kesehatan penikmat kopi (Hidgon, 2006). Biji kopi robusta memiliki kandungan antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan kopi lainnya (Winarsi, 2007). Kandungan asam klorogenat pada biji kopi robusta juga lebih tinggi dibandingkan pada kopi arabika. Asam klorogenat sendiri bermanfaat membantu dalam proses pembentukan pembuluh darah saat terjadi luka, kadarnya lebih tinggi pada keadaan *greenbean* dibandingkan dengan pada *roasted bean* (Farah, 2008). Kopi juga mengandung alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin yang juga memiliki efek yang baik pada tubuh (Wigati *et al.*, 2018). Saponin dapat meningkatkan pembentukan pembuluh darah baru dengan cara meningkatkan aktivitas VEGF yang dapat menginduksi terjadinya mitosis pembuluh darah baru (Majewska, 2011). Bahan yang terdapat pada kopi inilah yang juga mungkin di manfaatkan menjadi bahan dasar obat.

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Kenisa *et al.* tahun 2012 mengamati penyembuhan luka yang dilakukan pada *Cavia cabaya* yang diberi perlakuan berupa insisi pada bagian punggung lalu diberi ekstrak biji kopi robusta dalam sediaan salep. Konsentrasi ekstrak biji kopi robusta yang digunakan yaitu

22,5%, 45% dan 90%. Hasil dari penelitian ini didapatkan bahwa penyembuhan dapat terjadi dengan baik pada konsentrasi 45% (Kenisa *et al.*, 2012).

Berdasarkan latar belakang di atas, untuk mengetahui lebih lanjut potensi kandungan dalam kopi terutama jenis Robusta untuk mempercepat penyembuhan luka gingiva, maka diperlukan suatu penelitian tentang potensi kopi robusta terhadap jumlah pembuluh darah pasca gingivektomi pada tikus wistar. Pada penelitian ini akan digunakan ekstrak kopi robusta dalam sediaan gel dengan konsentrasi 40%, 50% dan 60%. Pemilihan konsentrasi ini guna mempersempit rentang dosis pada masing-masing kelompok sehingga didapatkan konsentrasi paling optimal untuk penyembuhan luka. Pemilihan sediaan gel pada penelitian ini dikarenakan bahan gel memiliki pelepasan obat yang baik serta waktu yang dibutuhkan untuk berpenetrasi dalam jaringan mukosa cepat (Rezeki *et al.*, 2012)

### **1.2 Masalah Penelitian**

1. Apakah terdapat potensi pemberian gel ekstrak biji kopi robusta secara topikal terhadap jumlah pembuluh darah pada penyembuhan luka pasca gingivektomi pada tikus wistar.
2. Berapakah konsentrasi yang optimum dari gel ekstrak kopi robusta untuk meningkatkan jumlah pembuluh darah pada penyembuhan luka pasca gingivektomi pada tikus wistar.

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui:

1. Potensi pemberian gel ekstrak biji kopi robusta secara topikal terhadap jumlah pembuluh darah pada tikus wistar yang pasca gingivektomi.
2. Konsentrasi yang optimum dari gel ekstrak kopi robusta untuk meningkatkan jumlah pembuluh darah pada penyembuhan luka pasca gingivektomi pada tikus wistar

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Sebagai informasi ilmiah tentang efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta secara topikal terhadap jumlah pembuluh darah pada tikus wistar yang pasca gingivektomi.
2. Sebagai upaya pemanfaatan gel ekstrak kopi robusta pada terapi penyembuhan luka pasca gingivektomi.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Kopi Robusta

Kopi robusta (*Coffea robusta*) adalah tanaman yang masuk dalam keluarga Rubiaceae dan genus *Coffea*. Daunnya berbentuk membulat dan ujung agak meruncing bertulang daun menyirip serta berwarna hijau. Daun tumbuh berhadapan dengan batang, cabang, dan ranting-rantingnya. Akar dari tanaman kopi robusta adalah akar tunggang dengan kedalaman akar yang relatif tidak terlalu dalam menembus tanah serta lebih dari 90% dari berat akar terdapat pada lapisan tanah 0-30 cm (Najiyati dan Danarti, 2012). Batang kopi merupakan tumbuhan berkayu, tumbuh tegak dan berwarna agak keabu-abuan. Batang kopi memiliki tunas yaitu tunas seri (tunas reproduksi) yang selalu tumbuh searah dengan tempat tumbuh asalnya dan tunas legitim yang hanya dapat tumbuh sekali dengan arah tumbuh yang membentuk sudut nyata dengan tempat aslinya (Arief *et al.*, 2011). Kopi robusta memiliki karakteristik fisik biji agak bulat, lengkungan tebal dan garis tengah dari atas kebawah hampir rata (Rukmana, 2014).

#### 2.1.1 Klasifikasi Kopi Robusta

Klasifikasi kopi adalah sebagai berikut:

Regnum : Plantae

Divisio : Magnoliophyta

Sub Divisio : Spermatophyta

Class : Magnoliopsida

Sub Class : Asteridae

Order : Rubiales

Family : Rubiaceae

Genus : *Coffea*

Species : *Coffea robusta*

Organ generatif kopi terdiri atas 3 bagian yaitu bunga, buah, dan biji. Bunga pada kopi robusta berukuran kecil, mahkotanya bunganya putih dan berbau harum dan kelopak bunga berwarna hijau. Apabila bunga sudah dewasa, kelopak dan mahkotanya akan mekar dan terjadi penyerbukan dan membentuk buah. Butuh

waktu sekitar 8 hingga 11 bulan mulai terbentuknya bunga hingga menjadi buah yang matang (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2009). Buah tanaman kopi terdiri dari daging buah dan biji. Daging buah terdiri atas 3 bagian yaitu lapisan kulit luar (*eksokarp*), lapisan daging (*mesokarp*), dan lapisan kulit tanduk (*endokarp*) yang tipis tetapi keras. Terdapat dua butir biji dalam buah pada umumnya tetapi ada juga buah yang tidak menghasilkan biji atau hanya menghasilkan satu butir biji. Biji kopi terdiri atas kulit biji dan lembaga. Bentuk dari biji adalah bulat telur yang keras, dan berwarna putih kotor (Najiyati dan Danarti, 2012).

Kopi robusta masuk ke Indonesia pada tahun 1900, kopi ini tahan penyakit karat daun, dan memerlukan syarat tumbuh dan pemeliharaan cukup mudah sedangkan hasil panen jauh lebih tinggi. Oleh karena itu kopi ini cepat berkembang dan mendesak kopi-kopi lainnya. Saat ini area perkebunan kopi di Indonesia didominasi oleh kopi robusta yaitu lebih dari 90% dari areal pertanaman kopi Indonesia terdiri atas kopi robusta (Prastowo *et al.*, 2010). Kopi robusta dapat beradaptasi lebih baik dibanding kopi Arabika. Areal perkebunan kopi robusta di Indonesia relatif luas karena dapat tumbuh baik pada daerah yang lebih rendah. (Rukmana, 2014).

Tanaman kopi robusta mulai dapat berproduksi pada umur 2,5 tahun. Umur ekonomis kopi robusta biasanya hingga umur 15 tahun. Pemeliharaan dari kopi robusta sangat memengaruhi hasil produksi (Haryanto, 2012). Panen pertama buah kopi biasanya sedikit dan akan bertambah pada tahun-tahun berikutnya dan pada umur 5 tahun ke atas produksi buah tinggi (Rukmana, 2014). Sebagian besar kopi robusta diproduksi secara kering. Rasa-rasa asam yang berasal dari hasil fermentasi harus dihilangkan agar mendapatkan rasa yang kuat. Kopi robusta memiliki kelebihan yaitu lebih kental dan warna yang kuat (Siswoputranto, 1993).

### 2.1.2 Kandungan Kopi Robusta

Tabel 2.1 Kandungan Kimia pada Kopi Robusta

Komponen	Biji Kopi	Kopi Bubuk
Mineral	4.0-4.5	4.6-5.0
Kafein	1.6-2.4	2.0
Trigonelline	0.6-0.75	0.3-0.6
Lipid	9.0-13.0	6.0-11.0
Total Asam Klorogenat	7.0-10.0	3.9-4.6
Asam Alifatik	1.5-7.0	1.0-1.5
Oligosakarida	5.0-7.0	0-3.5
Total Polisakarida	37.0-47.0	-
Asam Amino	2.0	0
Protein	11.0-13.0	13.0-15.0
Asam Humin	-	16.0-17.0

(Sumber: Yusianto, 1999 dalam Panggabean, 2011)

Selain itu, penelitian juga membuktikan bahwa adanya kandungan alkaloid pada ekstrak biji kopi robusta. Hasil ini didapatkan dari uji pereaksi Bouchardat dengan timbulnya endapan coklat dan pereaksi Dragendorff juga dengan adanya endapan coklat. Analisis tanin pada ekstrak biji kopi robusta juga ditemukan positif dengan dihasilkannya warna hijau kecoklatan pada penambahan pereaksi  $\text{FeCl}_3$ . Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak biji kopi robusta positif mengandung senyawa tanin yang merupakan tanin terkondensasi. Selain  $\text{FeCl}_3$  digunakan gelatin 1% dan  $\text{NaCl}$  10% yang ditandai dengan adanya endapan putih yang menunjukkan bahwa sampel mengandung tanin. Hal tersebut menunjukkan bahwa sifat tanin dapat mengendapkan protein (Hanani, 2015).

Analisis senyawa saponin pada ekstrak biji kopi robusta dilakukan dengan mengocok kuat sampel dengan akuades selama 30 detik hingga terbentuk buih stabil dengan penambahan  $\text{HCl}$  2 N. Saponin pada umumnya berada dalam bentuk glikosida, sehingga mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air. Analisis senyawa flavanoid pada ekstrak biji kopi robusta menghasilkan hasil yang positif karena terjadinya perubahan warna menjadi merah setelah ditambahkan serbuk Magnesium. Hasil ini menunjukkan adanya senyawa flavanoid pada sampel (Hanani, 2015).

Hasil penelitian sebelumnya dilihat bahwa kandungan yang terdapat pada ekstrak biji kopi robusta yang dibuat menjadi sediaan salep dapat membantu

mempercepat penyembuhan luka *full thickness* pada *Cavia cabaya* (Kenisa *et al.*, 2012). Belum ada penelitian yang melihat secara histopatologi mengenai pengaruh gel ekstrak biji kopi robusta terhadap jumlah pembuluh darah pada penyembuhan luka.

## 2.2 Penelitian Terdahulu Mengenai Kopi Robusta

Penelitian Kenisa *et al.* tahun 2012 yang berjudul *Effect of Robusta Coffee Beans Ointment on Fullthickness Wound Healing* bertujuan meneliti efek ekstrak biji kopi robusta untuk penyembuhan luka *fullthickness* dalam sediaan salep. Penelitian ini menggunakan beberapa konsentrasi ekstrak biji kopi robusta yaitu 22,5%, 45% dan 90% serta menggunakan bahan dasar salep untuk kelompok kontrol. Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cavia cabaya* sebanyak 20 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok. Hewan coba diberi sayatan pada daerah punggungnya lalu diberikan salep dengan konsentrasi yang berbeda pada tiap kelompok. Sampel lalu dieutanasia dan jaringannya diproses menjadi preparat lalu diberi pewarnaan HE guna mengamati penyembuhan luka. Hasil dari penelitian ini menunjukkan pada konsentrasi 90% menunjukkan angka rata-rata tertinggi untuk limfosit, pembuluh darah kapiler dan makrofag namun tidak pada plasma sel dan fibroblas bila dibandingkan dengan konsentrasi 22,5%. Konsentrasi 45% menunjukkan efek yang baik dalam penyembuhan luka dan dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa salep ekstrak biji kopi robusta dapat mempercepat proses penyembuhan luka pada *cavia cabaya*.

Penelitian Artho *et al* tahun 2015 bertujuan untuk meneliti pengaruh serbuk kopi robusta pada penyembuhan luka insisi pada punggung kelinci. Punggung kelinci diberi luka insisi sepanjang 5cm dengan kedalaman 0,3cm pada bagian kanan dan kiri. Pasca dilakukannya insisi, luka dibersihkan dan ditutup menggunakan kassa steril. Luka pada bagian punggung kanan diberi 1 sendok teh serbuk kopi robusta secara merata setiap pagi dan sore hari selama 14 hari sedangkan luka pada bagian punggung kiri tidak diberikan perlakuan apapun. Penyembuhan luka diamati secara makroskopis. Hasil penelitian ini dapat dilihat



bahwa serbuk kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki efek untuk mempercepat penyembuhan luka insisi pada kulit kelinci.

### 2.3 Gingivektomi

Gingivektomi adalah pemotongan jaringan gingiva dengan menghilangkan dinding lateral poket yang bertujuan untuk mengeliminasi poket dan peradangan gingiva inflamasi sehingga didapat gingiva yang fisiologis, fungsional dan estetik baik (Newman *et al.*, 2019). Keuntungan teknik gingivektomi adalah teknik sederhana, dapat mengeliminasi poket secara sempurna, lapang pandang baik, morfologi gingiva dapat disesuaikan keinginan (Trijani, 1996). Gingivektomi masuk dalam perawatan periodontal fase kedua yaitu fase bedah.

Indikasi dilakukannya gingivektomi adalah pembesaran gingiva yang tumbuh berlebih, jaringan yang fibrosis dan poket supraboni. Pembesaran gingiva yang tidak mengecil sesudah dilakukan *scaling, curettage, root planing dan polishing* maka perlu dilakukan gingivektomi (Chapple, 2002). Gingivektomi atau tindakan bedah periodontal hanya bisa dilakukan apabila indeks plak mencapai 10%, sehingga akan memperoleh penyembuhan yang optimal dan mencegah terjadinya rekurensi pembesaran gingiva. *Dental Health Education* (DHE) dan motivasi tetap dilakukan setelah gingivektomi agar pasien dapat menjaga kebersihan mulutnya dan dapat mencegah rekurensi (Iwan, 2005).

Kontraindikasi gingivektomi adalah jika dasar poket berada pada atau lebih ke apikal dari pertautan mukogingiva, apabila dinding jaringan lunak yang membentuk poket terbentuk oleh mukosaa alveolar, bila frenulum berada pada daerah yang akan dibedah, apabila ada indikasi perawatan yang akan menyebabkan adanya cacat infraboni, jika gingivektomi diperkirakan menghasilkan estetik yang kurang baik serta bila gingiva cekat atau berkeratin tidak cukup tersedia sehingga jika gingivektomi dilakukan, tepi gingiva terbentuk dari mukosa alveolar (Fedi, 2004).

Teknik gingivektomi (Fedi *et al.*, 2004):

1. Melakukan anestesi lokal dengan teknik infiltrasi maupun teknik blok

2. Mengukur kedalaman poket di daerah operasi menggunakan probe yang telah terkalibrasi. Kedalaman poket ditandai dengan membuat titik-titik perdarahan dengan cara menusuk dinding luar jaringan gingiva dengan menggunakan poket marker. Titik- titik perdarahan yang telah dibuat nantinya akan membentuk sebuah ragangan (outline) insisi yang harus dilakukan.
3. Insisi dibevel pada sudut kurang lebih  $45^{\circ}$  terhadap akar gigi dan berakhir pada ujung atau lebih ke bawah dari ujung apikal perlekatan epitel. Kadang-kadang, akses sangat terbatas atau sulit dicapai sehingga bevel yang cukup tidak dapat dibuat pada insisi awal. Pada keadaan ini, bevel dapat diperbaiki dengan menggunakan pisau bermata lebar atau bur intan kasar.
4. Jaringan gingiva yang telah dieksisi dibuang.
5. Membersihkan jaringan yang tersisa pada permukaan akar dengan *scaling* dan *root planing*. Pembersihan permukaan akar pada tahap ini menentukan keberhasilan seluruh prosedur bedah.
6. Menyempurnakan kontur gingiva seperti yang diinginkan dengan bur intan atau pisau bermata lebar untuk mengerok jaringan.
7. Melakukan irigasi pada daerah bedah dengan air steril atau larutan saline untuk membersihkan pertikel yang tersisa.
8. Menekan daerah luka dengan kain kasa yang telah dibasahi dengan air steril atau larutan saline selama 2-3 menit, untuk menghentikan perdarahan.
9. Memasang *dressing* periodontal, dimulai dengan ukuran kecil, bersudut di daerah interproksimal, menggunakan instrumen plastik. Selanjutnya, pasang gulungan yang lebih panjang di bagian fasial, lingual, dan palatal serta hubungkan dengan *dressing* yang telah terpasang di daerah interproksimal sebelumnya. Seluruh daerah luka ditutup dengan dresing tanpa mengganggu oklusi atau daerah perlekatan otot.
10. Mengganti *dressing* dan membuang debris pada daerah luka setiap minggu hingga jaringan sembuh.
11. Setelah *dressing* terakhir dilepas, poles gigi dan instruksikan pasien untuk melakukan kontrol plak dengan baik.



Gambar 2.1 prosedur gingivektomi (Sumber: Carranza,2012)

## 2.4 Proses Penyembuhan Luka

### 2.4.1 *Healing Cascade*

*Healing cascade* dimulai segera setelah terjadi luka, maka akan ada kontak antara Trombosit dengan kolagen dari jaringan yang terpapar darah, yang akan menyebabkan pelepasan faktor pembekuan darah serta deposisi fibrin ke daerah luka, proses ini berfungsi untuk menghentikan perdarahan, serta menjadi matrik dan mendasari proses lanjutan penyembuhan luka. Platelet akan melepaskan faktor pembekuan dan mediator-mediator inflamasi atau sitokin serta *growth factor*, terutama PDGF dan TGF- $\beta$  (Rajan dan Murray, 2008).

PDGF akan memicu proses kemotaksis dari neutrofil, makrofag, otot polos dan fibroblas, dan juga memulai proses pembelahan sel dari sel fibroblas dan otot polos. TGF- $\beta$  berperan dalam memanggil makrofag dan menstimulasi pelepasan mediator kimia lain seperti FGF, TNF- $\alpha$ , dan IL-1. Proses ini secara keseluruhan akan menyebabkan deposisi jaringan ikat baru kedalam lokasi luka yang dikenal

sebagai fase proliferasi dan nantinya jika fase proliferasi sudah selesai akan dilanjutkan dengan fase remodeling (Eming *et al.*, 2007).

#### 2.4.2 Fase Inflamasi

Neutrofil adalah sel radang pertama ada pada daerah luka, biasanya mulai muncul dalam 24 jam pertama pasca terjadinya luka, fungsi utamanya untuk mengeliminasi benda asing baik bakteri, sel ataupun matrik jaringan yang rusak. Sel *mast* merupakan sel yang kaya dengan granula berisi berbagai macam enzim, histamin serta mediator kimia lain bertanggung jawab terhadap terjadinya inflamasi pada daerah sekitar jejas. Bahan aktif yang dilepaskan akan memicu proses yang menyebabkan meningkatnya permeabilitas pembuluh darah sehingga sel monosit bisa bermigrasi masuk dalam jaringan yang luka (Eming *et al.* 2007).

Sel monosit dalam darah akan aktif dan berubah menjadi makrofag setelah 48 jam, yang berperan besar dalam tahap inflamasi. Gangguan pada makrofag juga akan menghambat penyembuhan luka. Setelah teraktivasi, sel makrofag sendiri juga akan menghasilkan PDGF dan TGF- $\beta$ . Makrofag juga memiliki sifat fagositosis bertujuan untuk mengeliminasi sel dan matrik selular yang rusak serta neutrofil yang penuh dengan patogen, benda asing dan sisa bakteri yang masih tersisa. Adanya *Wound Macrophage* menandakan akhir proses inflamasi dan segera dimulainya proses proliferasi. (Rajan dan Murray, 2008).

#### 2.4.3 Fase proliferasi

Fase proliferasi terdiri atas proses reepitelialisasi, neovaskularisasi, dan pembentukan jaringan granulasi. Makrofag memegang peranan penting sebagai pengatur fungsi fibroblas. TGF- $\beta$  yang dilepaskan trombosit memiliki peran dalam membentuk matrik ekstraselular, yaitu meningkatkan pergerakan sel epidermis, pembentukan kolagen, proteoglikan, dan fibronectin, serta mengurangi produksi dari enzim protease yang merusak matrik (Diegelmann, 2004).

Pembentukan kembali epitel yang rusak akan terjadi beberapa jam pasca terjadinya perlukaan. Sitokin yang berperan adalah EGF dan TGF $\alpha$  yang dihasilkan oleh platelet, makrofag, dan keratinosit. Proses pembentukan kembali epitel atau reepitelisasi membutuhkan banyak oksigen dan nutrisi. Penurunan pH, *oxygen tension*, dan peningkatan laktat dilokasi sekitar luka memicu proses yang

mendorong terbentuknya pembuluh darah baru atau yang lazim dikenal sebagai angiogenesis atau neovaskularisasi, yang banyak dipengaruhi oleh VEGF, bFGF dan TGF- $\beta$ . Proses ini sangat penting untuk proses selanjutnya yaitu pembentuk jaringan granulasi (Diegelman, 2004; Rajan dan Murray, 2008).

Trauma akan menimbulkan kerusakan jaringan, dan bFGF akan segera dilepaskan oleh makrofag dan VEGF oleh sel epidermis yang mengalami hipoksia adalah awal dari proses angiogenesis. Enzim proteolitik akan merusak protein matrik ekstraselular, dan fragmen protein yang dihasilkan akan berfungsi untuk mendatangkan sel monosit menuju lokasi kerusakan jaringan. Monosit yang teraktivasi akan berubah menjadi makrofag. Makrofag tersebut akan menghasilkan beberapa sitokin seperti bFGF yang akan menstimulasi endotel untuk melepas tPA yang mengubah plasminogen menjadi plasmin dan prokolagenase yang mengaktifkan polagenase. Kedua enzim proteolitik ini akan merusak membran basalis, sehingga memungkinkan sel endotel yang terstimulasi untuk bergerak dan membentuk pembuluh darah baru di tempat terjadinya jejas. Proses angiogenesis akan terhenti setelah terbentuk granulasi dan pembuluh darah baru yang banyak tersebut akan mengalami disintegrasi akibat apoptosis, dengan berakhirnya tahap ini, proses penyembuhan dilanjutkan oleh fase *remodeling* (Epstein et. al, 1999; Wulff, 2012).

#### 2.4.4 Fase *Remodeling*

Sebagian molekul kolagen terdegradasi oleh enzim kolagenase yang diperoleh dari fibroblas, makrofag, dan neutrofil pada *fase remodeling*, disamping itu juga terjadi kontraksi luka (*wound contraction*) yaitu proses kompleks yang melibatkan berbagai jenis sel, matrik, dan sitokin. Fibroblas memiliki suatu gambaran fenotipe yang disebut myofibroblas, yang mampu melakukan kontraksi, adanya fenomena ini menunjukkan adanya pepadatan dari jaringan ikat dan kontraksi dari luka. Proses ini diduga dipicu oleh TGF  $\beta$ 1 atau  $\beta$ 2 dan PDFG (Rajan dan Murray, 2008).

*Remodeling* dari kolagen dipengaruhi oleh keseimbangan antara sintesis dan katabolisme kolagen. Degradasi kolagen pada luka juga dipengaruhi oleh beberapa enzim proteolitik yang disebut MMP yang dihasilkan oleh sel makrofag,

epidermis, endothel dan Fibroblas. Keseimbangan antara MMP dan inhibitor dari MMP akan menentukan perkembangan penyembuhan luka. Setelah 3 minggu pasca cedera jaringan baru yang terbentuk akan mendekati kekuatan aslinya. Terjadi penggantian serabut kolagen dengan serabut yang lebih besar disertai oleh penguatan *crosslinking* dari masing masing serabut yang membentuk jaringan yang lebih kuat. (Demidova-Rice, *et al.* 2012; Epstein *et. al.*, 1999).

## 2.5 Proses Pembentukan Pembuluh Darah

Pertumbuhan pembuluh darah baru atau yang biasa disebut angiogenesis merupakan terjadi secara alami di dalam tubuh, baik dalam kondisi sehat maupun patologi (sakit). Proses angiogenesis tersusun dari beberapa tahapan yang dimulai dari proses inisiasi, yaitu dilepaskannya enzim protease dari sel endotel yang teraktivasi; pembentukan pembuluh darah vaskular, antara lain terjadinya degradasi matriks ekstraseluler (*Extra Cellular Matrix*, ECM), migrasi dan proliferasi sel endotel, serta pembuatan ECM baru; yang kemudian dilanjutkan dengan maturasi/ stabilisasi pembuluh darah yang terkontrol dan dimodulasi untuk memenuhi kebutuhan jaringan (Plank, 2004). Proses pembentukan pembuluh darah terjadi pada fase proliferasi dimulai pada hari ke-3 sampai hari ke-7 dan mulai berkurang pada hari ke-10 (Schreml *et al.*, 2010).

### 2.5.1 Tahapan Pembentukan Pembuluh Darah

Tahapan-tahapan pembentukan pembuluh darah dapat dijelaskan sebagai berikut:

#### A. Pelepasan faktor stimulus angiogenik

Kumpulan sel pada jaringan yang mengalami jejas luka atau mengalami hipoksia, akan melepaskan faktor angiogenik yaitu berupa faktor pertumbuhan serta protein rantai pendek lainnya yang dapat berdifusi ke sel-sel yang berada di jaringan sekitarnya. Setelah proses tersebut, terjadi pula proses inflamasi (Carmeliet *et al.*, 1998). Pada proses inflamasi, pembuluh darah kecil yang terdapat secara lokal penting dalam proses yang terjadi selanjutnya karena pembuluh darah merupakan suatu jaringan yang dilapisi oleh sel endotel, yang akan berinteraksi dengan faktor peradangan dan angiogenik. Faktor-faktor

angiogenik tersebut dapat menarik dan mendorong terjadinya proliferasi sel endotel dan sel radang. Menjelang proses migrasi, sel-sel radang juga mensekresi molekul yang juga berperan sebagai stimulus angiogenik.

#### B. Pelepasan enzim protease dari sel endotel yang teraktivasi

Faktor angiogenik berupa faktor pertumbuhan akan berikatan dengan reseptor yang spesifik terdapat pada reseptor sel endotel (EC) di sekitar lokasi pembuluh darah lama. Ketika faktor angiogenik berikatan dengan reseptornya, sel endotel akan teraktivasi dan menghasilkan sinyal yang kemudian dikirim dari permukaan sel ke inti sel yang mengakibatkan organel-organel sel endotel mulai memproduksi molekul baru antara lain adalah enzim protease yang berperan penting dalam degradasi matriks ekstraseluler untuk mengakomodasi percabangan pembuluh darah.

#### C. Disosiasi sel endotel dan degradasi ECM yang melapisi pembuluh darah lama

Disosiasi sel endotel dari sel-sel di sekitarnya, yang distimulasi oleh faktor pertumbuhan angiopoietin dan aktivitas enzim-enzim yang dihasilkan oleh sel endotel yang teraktivasi, seperti *urokinase-plasminogen activator* (uPA) dan *matrix metalloproteinases* (MMPs), dibutuhkan untuk menginisiasi terbentuknya pembuluh darah baru. Dengan sistem enzimatik tersebut, sel endotel dari pembuluh darah lama akan mendegradasi ECM dan menginvasi stroma dari jaringan sekitar sehingga sel-sel endotel yang terlepas dari ECM ini akan sangat responsif terhadap sinyal angiogenik (Polverini, 2002)

#### D. Migrasi dan proliferasi sel endotel

Degradasi proteolitik dari ECM diikuti dengan bermigrasinya sel endotel ke matriks yang terdegradasi. Proliferasi sel endotel yang distimulasi oleh faktor angiogenik, yang beberapa di antaranya dilepaskan dari hasil degradasi ECM, seperti fragmen peptide, fibrin, atau asam hialuronik akan terjadi selanjutnya.

#### E. Pembentukan lumen dan pembuatan ECM baru

Sel endotel yang bermigrasi tersebut kemudian mengalami elongasi dan sejajar dengan sel endotel lain untuk membuat struktur percabangan pembuluh darah yang kuat. Proliferasi sel endotel meningkat sepanjang percabangan

vaskular. Lumen kemudian terbentuk dengan pembengkokan (pelengkungan) dari sel-sel endotel. Pada tahap ini kontak antar sel endotel mutlak dibutuhkan.

#### F. Fusi pembuluh darah baru dan inisiasi aliran darah

Struktur pembuluh darah yang terhubung satu sama lain akan membentuk rangkaian atau jalinan pembuluh darah untuk memediasi terjadinya sirkulasi darah. Pada tahap akhir, pembentukan struktur pembuluh darah baru akan distabilkan oleh sel mural yaitu sel otot polos dan *pericytes* yang menyangga pembuluh darah yang baru. Tanpa adanya sel mural, struktur dan jaringan antar pembuluh darah akan mudah rusak (Carmeliet *et al.*, 1998).

## 2.6 Pembuluh Darah

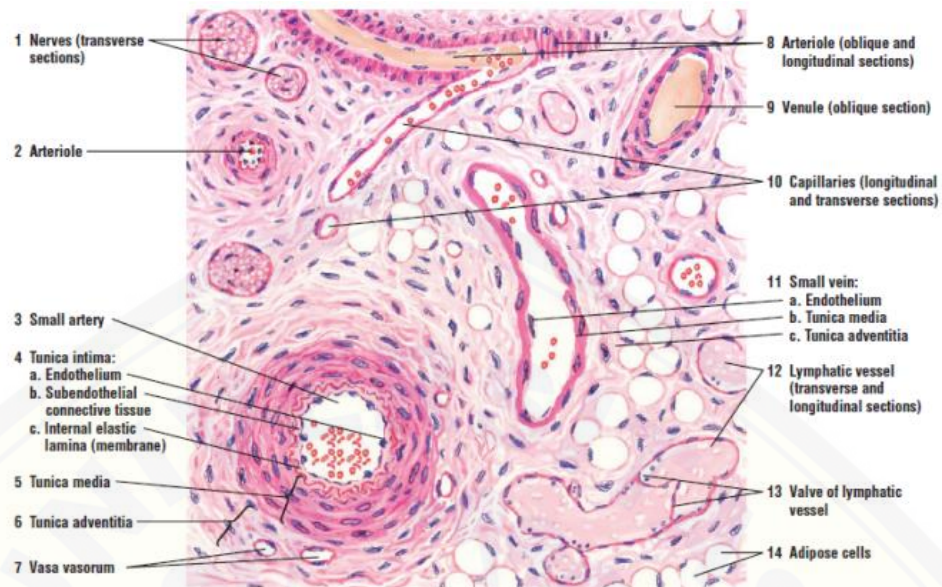
Pembuluh darah adalah bagian dari sistem sirkulasi yang mengangkut darah ke seluruh tubuh. Dinding pembuluh darah terdiri dari tiga lapisan utama yaitu tunika eksterna atau *adventisia*, tunika media dan tunika intima. Lapisan terdalam adalah tunika intima yang terdiri dari epitel selapis gepeng atau endotel, dan jaringan ikat subendotel dibawahnya. Lapisan tengah adalah tunika media, terdiri dari serat otot polos. Otot polos pada tunika media juga menghasilkan matriks ekstraselular. Lapisan terluar adalah tunika *adventisia* yang terdiri atas jaringan penyambung dengan serabut-serabut elastin (Eroschenko, 2010).

### 2.6.1 Pembuluh Darah Kapiler

Pembuluh darah kapiler adalah pembuluh darah yang memiliki ukuran paling kecil. Lumennya hanya cukup untuk satu atau paling banyak dua eritrosit dengan dinding yang terdiri dari selapis tipis sel endotel. Jika terpotong secara memanjang maka kapiler akan tampak sebagai pembuluh panjang yang dibatasi oleh sel endotel saja dengan inti pipih (Wonodirekso, 2010)



### 2.6.2 Pembuluh Darah Arteri



Gambar 2.2 pembuluh darah dan limfatik pada jaringan adiposa (Sumber: Eroschenko, 2010)

#### a. Arteriol

Arteriol adalah pembuluh arteri yang berukuran paling kecil yang umumnya memiliki lumen bundar atau agak lonjong (gambar 2.2). Tunika intima terdiri atas selapis tipis endotel. Bagian bawah dari lapisan endotel terdapat lapisan tambahan yaitu tunika elastika interna yang terdiri atas serta serat elastin yang berkelok-kelok melingkari dinding pembuluh. Beberapa lapis serat otot polos yang melingkari dinding pembuluh menyusun tunika medianya (Wonodirekso, 2010).

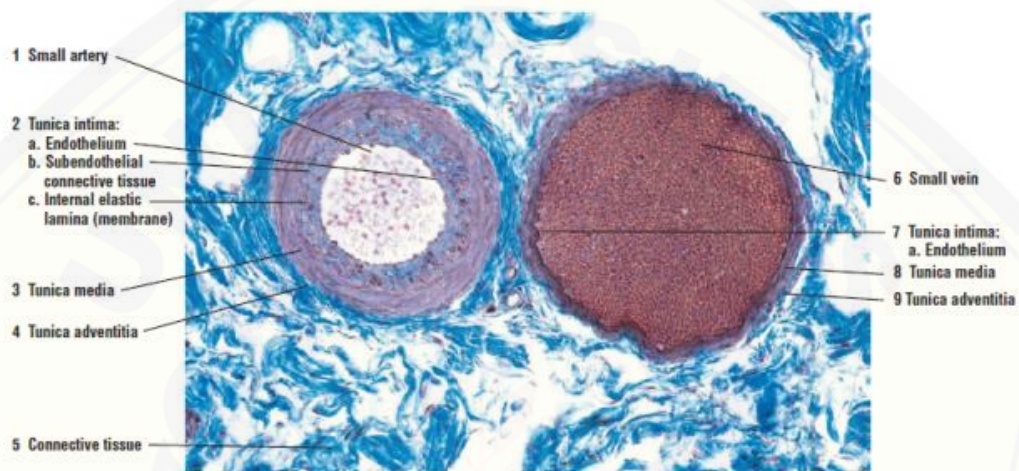
#### b. Arteri Sedang

Arteri sedang termasuk tipe muskuler dengan Tunika intima terdiri atas selapis sel endotel dengan jaringan ikat longgar yang tipis di bawahnya. Sel endotel berjajar mengikuti bentuk tunika elastika interna yang berkelok mengikuti bentukan dari lumen. Arteri sedang memiliki tunika media yang tebal dan terdiri atas banyak serat otot polos yang tersusun melingkar. Tunika elastika eksternanya nampak jelas namun tidak membentuk lapisan sepadat tunika elastika interna (Wonodirekso, 2010).

### c. Arteri besar

Arteri besar atau aorta tidak memiliki lapisan tambahan yang membatasi dindingnya dengan jelas. Tunika internanya tebal dan terdiri atas selapis sel endotel dengan jaringan ikat longgar subendotel yang cukup tebal dibawahnya. Tunika medianya terdiri dari serat elastis yang membentuk lembaran yang diantaranya terdapat berkas otot polos (Wonodirekso, 2010).

### 2.6.3 Pembuluh Darah Vena



Gambar 2.3 arteri kecil dan vena kecil (Sumber: Eroschenko, 2010)

### a. Venula

Bentuk lumen venula kebanyakan mengarah gepeng atau tidak jarang dindingnya nampak bergelombang. Biasanya venula (gambar 2.3) nampak lebih besar daripada arteriol. Tunika intima terdiri atas sel endotel. Tunika media merupakan lapisan tipis yang terdiri atas otot polos. Tunika adventisiannya relatif lebih tebal (Wonodirekso, 2010).

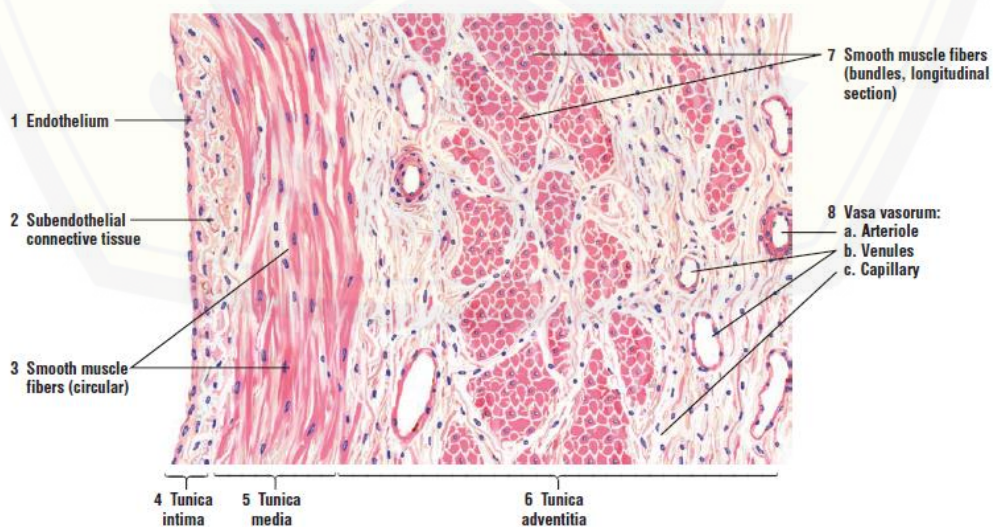
## b. Vena Sedang



Gambar 2.4 Vena sedang dengan adanya lipatan katup yang ditunjuk oleh anak panah (Sumber: Junqueira *et al.*, 2007).

Vena sedang (gambar 2.4) berdinding lebih tipis daripada arteri sedang. Lumennya jauh lebih lebar dan biasanya bergelombang. Tunika intima sama seperti arteri sedang tetapi tunika elastika interanya tidak ada. Tunika medianya lebih tipis daripada arteri sedang. Tunika elastika eksterna tidak ada sedangkan tunika adventisianya terdiri atas jaringan ikat longgar (Wonodirekso, 2010).

## c. Vena Besar



Gambar 2.5 dinding pembuluh darah vena besar (Sumber: Eroschenko, 2010)

Ciri yang mencolok pada vena besar adalah tunika adventisiannya tebal dengan serat-serat otot polos yang tersusun memanjang. Tunika media merupakan lapisan yang tipis, terdiri dari serat-serat otot polos melingkar dan sedikit jaringan ikat yang lebih longgar. Tunika intimanya merupakan bagian endotel dengan sedikit jaringan penyokong. Vena besar (gambar 2.5) umumnya memiliki lamina elastika interna yang tidak begitu berkembang seperti pada arteri (Eroschenko, 2003).

### **2.7 Peran Kopi terhadap Pembentukan Pembuluh Darah**

Biji kopi robusta (*C. robusta*) mengandung senyawa aktif, yakni polifenol dan flavonoid yang adalah bagian dari fenol, alkaloid dan saponin (Wigati, 2018). Senyawa polifenol (asam klorogenat) dalam biji kopi robusta (*C. robusta*) memiliki efek sebagai antiinflamasi dan antioksidan yang juga membantu dalam proses penyembuhan luka (Sato, 2011). Saponin dapat menstimulasi pembentukan pembuluh darah dengan meningkatkan produksi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Majewska, 2011).

Pasca dilakukannya gingivektomi akan terjadi luka pada jaringan. Tubuh akan merespon terjadinya luka dengan sistem perbaikan tubuh. Pembentukan pembuluh darah baru atau angiogenesis pasca luka diperlukan karena pembuluh darah sangat membantu dalam perbaikan jaringan karena membantu menyediakan oksigen dan juga nitrisi. Adanya kandungan akan saponin, flavonoid dan antioksidan dari polifenol membantu pembentukan pembuluh darah baru pasca luka yang disebabkan oleh perawatan gingivektomi. Penelitian yang akan dilakukan akan menggunakan ekstrak dari biji kopi robusta dengan bentuk sediaan gel dengan pemberian secara topikal.

### **2.8 Bentuk Sediaan Obat untuk Penyembuhan Luka Gingiva**

Gel umumnya merupakan suatu sediaan semipadat yang jernih, tembus cahaya dan mengandung zat aktif, merupakan dispersi koloid mempunyai kekuatan yang disebabkan oleh jaringan yang saling berikatan pada fase terdispersi (Ansel, 2008). Zat-zat pembentuk gel digunakan sebagai pengikat

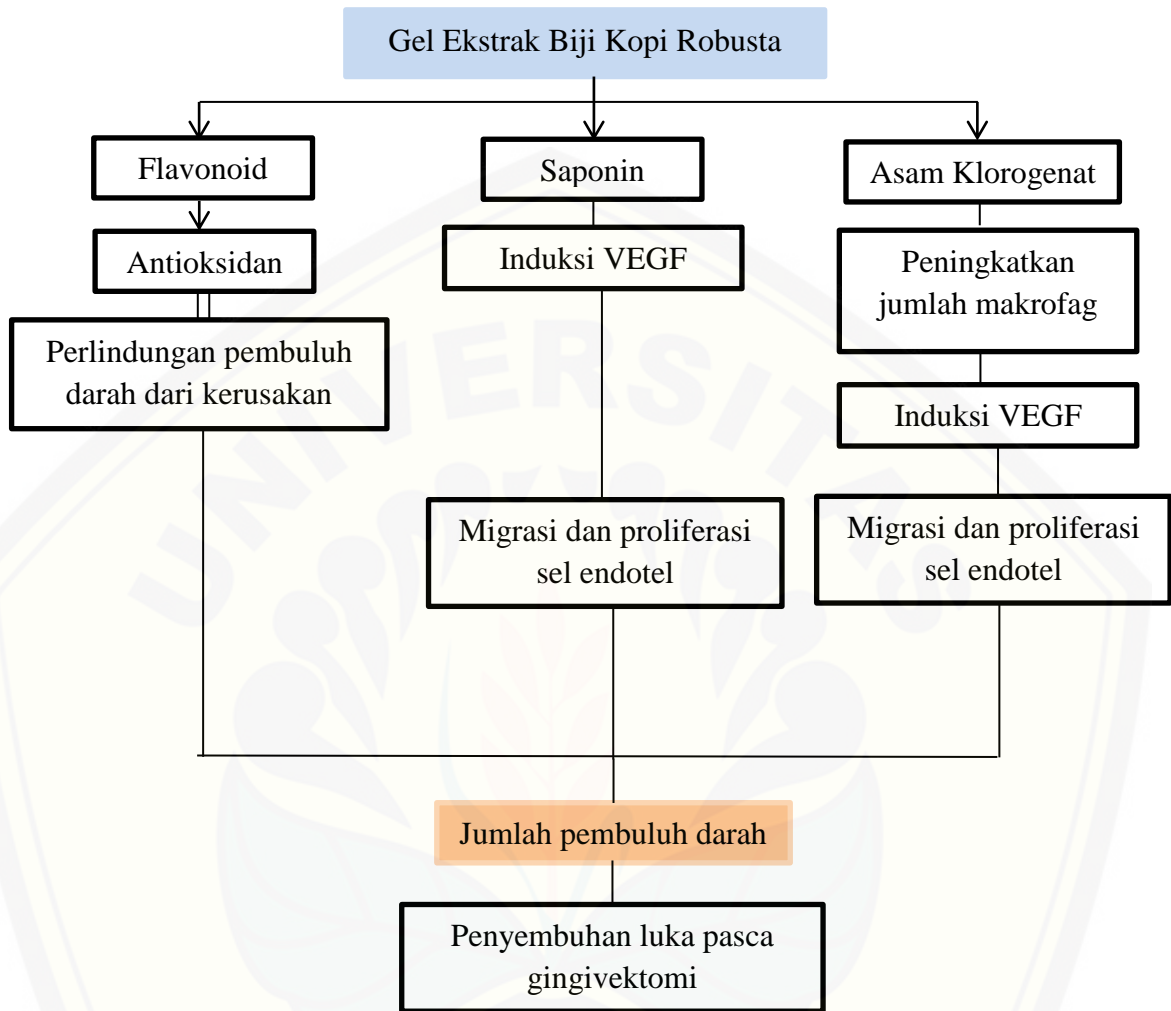
dalam granulasi, koloid pelindung dalam suspensi, pengental untuk sediaan oral dan sebagai basis supositoria. Secara luas sediaan gel banyak digunakan pada produk obat-obatan, kosmetik dan makanan juga pada beberapa proses industri. Pada kosmetik yaitu sebagai sediaan untuk perawatan kulit, sampo, sediaan pewangi dan pasta gigi (Herdiana, 2007).

Makromolekul pada sediaan gel disebarkan keseluruh cairan sampai tidak terlihat ada batas diantaranya, disebut dengan gel satu fase. Jika masa gel terdiri dari kelompok-kelompok partikel kecil yang berbeda, maka gel ini dikelompokkan dalam sistem dua fase (Ansel, 2008). Polimer-polimer yang biasa digunakan untuk membuat gel-gel farmasetik meliputi gom alam tragakan, pektin, karagen, agar, asam alginat, serta bahan-bahan sintesis dan semisintesis seperti metil selulosa, hidroksietil selulosa, karboksimetil selulosa, dan karbopol yang merupakan polimer vinil sintesis dengan gugus karboksil yang terionisasi. Gel dibuat dengan proses peleburan, atau diperlukan suatu prosedur khusus berkenaan dengan sifat mengembang dari gel (Lachman *et al.*, 1994).

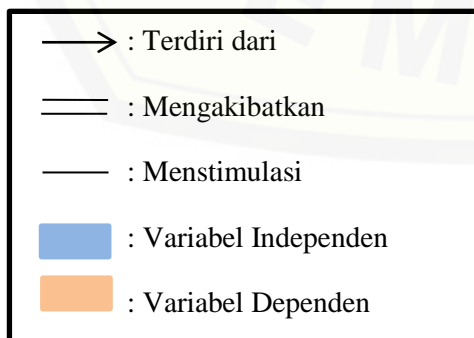
Beberapa keuntungan sediaan gel (Voigt, 1994) adalah sebagai berikut:

- a. kemampuan penyebarannya baik pada kulit
- b. efek dingin, yang dijelaskan melalui penguapan lambat dari kulit
- c. tidak ada penghambatan fungsi rambut secara fisiologis
- d. kemudahan pencuciannya dengan air yang baik
- e. pelepasan obatnya baik

**Kerangka Konseptual**



Gambar 2.6 Skema Kerangka Konseptual



## 2.9 Kerangka Konseptual

Gel ekstrak kopi robusta memiliki beberapa kandungan didalamnya yaitu flavonoid, saponin dan asam klorogenat. Kandungan flavonoid membantu melindungi pembuluh darah kapiler terhadap kerusakan sehingga dapat menstimulasi jumlah pembuluh darah. Saponin dalam gel ekstrak kopi robusta dapat mengakibatkan peningkatan VEGF pada proses penyembuhan luka yang dapat membantu untuk menstimulasi pembentukan pembuluh darah oleh tubuh. Asam klorogenat dapat menyebabkan peningkatan jumlah makrofag yang dapat menstimulasi induksi VEGF sehingga mempengaruhi jumlah pembuluh darah. Berdasarkan hal tersebut kandungan dalam gel ekstrak biji kopi robusta dapat mempercepat penyembuhan luka gingiva yang dikarenakan tindakan gingivektomi.

## 2.10 Hipotesa

Pemberian gel ekstrak biji kopi robusta dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah pasca gingivektomi karena dalam kopi terdapat senyawa aktif yang dapat meningkatkan aktivitas pembentukan pembuluh darah dalam penyembuhan luka dan konsentrasi 60% adalah konsentrasi optimum dalam meningkatkan jumlah pembuluh darah pasca gingivektomi, hal ini karena Peningkatan konsentrasi sediaan obat topikal akan menjadi daya pendorong molekul obat, sehingga akan meningkatkan penyerapannya.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Post Test Only Control Group Designs* yaitu melakukan pengukuran setelah perlakuan diberikan, kemudian hasilnya dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2005).

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa tempat, yaitu:

- a. Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember untuk identifikasi biji kopi robusta
- b. Laboratorium Center for Development of Advance Science and Technology Universitas Jember untuk pembuatan ekstrak biji kopi robusta
- c. Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan gel ekstrak biji kopi robusta
- d. Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk perlakuan terhadap hewan coba
- e. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pembuatan preparat dan pengamatan jaringan

#### 3.2.2 Waktu penelitian

Penelitian akan dilaksanakan November 2019 hingga Maret 2020

### 3.3 Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel Bebas

Gel ekstrak biji kopi robusta.

#### 3.3.2 Variabel Terikat

Jumlah pembuluh darah pada proses penyembuhan luka pasca gingivektomi pada tikus wistar.



### 3.3.3 Variabel Terkendali

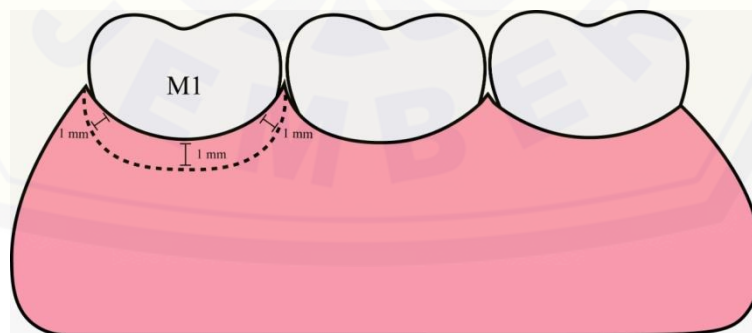
1. Sampel Penelitian
2. Tempat dan cara pemeliharaan hewan coba
3. Pembilahan biji kopi yang digunakan
4. Cara pembuatan gel ekstrak biji kopi robusta
5. Cara Gingivektomi pada Hewan Coba
6. Cara pemberian, waktu, dan dosis gel ekstrak biji kopi robusta yang diberikan
7. Cara pengambilan jaringan luka
8. Cara pembuatan sediaan jaringan
9. Pengecatan sediaan
10. Cara pengamatan jumlah pembuluh darah

### 3.4 Definisi Operasional Penelitian

#### 3.4.1 Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta

Gel ekstrak biji kopi robusta adalah ekstrak yang terbuat dari biji kopi robusta kering. Biji kopi robusta kering dibuat serbuk, kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% hingga diperoleh hasil ekstrak. Selanjutnya ekstrak biji kopi robusta tersebut dibuat sediaan gel dengan konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 40%, 50% dan 60% yang diberikan secara topikal pada sampel kelompok perlakuan.

#### 3.4.2 Gingivektomi



Gambar 3.1 gingivektomi

Gingivektomi adalah pemotongan gingiva pada tikus Wistar jantan pada regio posterior kiri bawah yang dilakukan pengukuran terlebih dahulu secara vertikal dan horisontal. Panjang vertikal ditentukan 1 mm dari koronal ke apikal.

Panjang horisontal ditentukan dari lebar mesial sampai distal gigi molar satu. Kemudian dilakukan pemotongan gingiva dengan menggunakan insersi blade skalpel menyudut sebesar  $45^\circ$  dengan permukaan gigi.

#### 3.4.3 Jumlah Pembuluh Darah

Jumlah pembuluh adalah total pembuluh darah yang berada pada daerah luka untuk mensuplai oksigen dan nutrisi pada proses penyembuhan luka.

### 3.5 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jenis kelamin jantan dengan strain Wistar.

#### 3.5.1 Besar Sampel

Besar sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari perhitungan rumus Federer sebagai berikut (Ihwah *et al.*, 2015).

$$(n - 1)(f - 1) \geq 15$$

Keterangan:

n : besar sampel tiap kelompok

f : jumlah kelompok

$$(n - 1)(8 - 1) \geq 15$$

$$(n - 1)(7) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

Berdasarkan perhitungan rumus di atas, maka jumlah sampel minimal yang didapatkan sebanyak 3. Sehingga besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel untuk setiap kelompok. Jadi, jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 24 ekor.

Untuk mengantisipasi hilangnya unit eksperimen maka dilakukan koreksi dengan:

$$N = \frac{n}{(1 - f)}$$

Keterangan:

N = Besar sampel koreksi

n = Besar sampel awal

f = Perkiraan proporsi drop out sebesar 20%

Sehingga,

$$\begin{aligned} N &= \frac{n}{(1-f)} \\ &= \frac{3}{(1-0,2)} \\ &= \frac{3}{0,8} \\ &= 3,75 \end{aligned}$$

Jadi, sampel yang digunakan tiap kelompok percobaan sebanyak 4 ekor. Penelitian terdiri dari 4 kelompok dengan 2 kali pengamatan sehingga dibutuhkan total sampel sebanyak 32 ekor tikus. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol negatif. Kelompok yang kedua adalah kelompok perlakuan menggunakan gel ekstrak biji kopi robusta 40% sebagai obat topikal. Kelompok yang ketiga merupakan kelompok perlakuan menggunakan gel ekstrak biji kopi robusta 50% sebagai obat topikal serta kelompok keempat merupakan kelompok perlakuan menggunakan gel ekstrak biji kopi robusta 60% sebagai obat topikal.

### 3.6 Kriteria Sampel

Kriteria sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Tikus putih dengan jenis kelamin jantan strain *Wistar*.
- Tikus Wistar dengan berat 175-200 gram.
- Berusia 2-3 bulan.
- Tikus Wistar dengan keadaan umum meliputi pergerakan baik dan tidak ada luka pada tubuhnya.

### 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.7.1 Alat

##### A. Perlakuan Hewan Coba

1. Kandang hewan coba
2. Tempat makan hewan coba
3. Tempat minum hewan coba
4. Timbangan hewan coba
5. Disposable syringe
6. Pinset berkerat kedokteran gigi
7. Ekskavator
8. Sonde setengah bulan
9. Handle Scalpel
10. Surgical blade no. 11
11. Petridisk
12. Alat Fiksasi Tikus

##### B. Pembuatan Gel Ekstrak Kopi robusta

1. Mortar dan alu
2. Maserator
3. *Orbital Shaker*
4. Tabung reaksi
5. Gelas ukur
6. Timbangan analitik

##### C. Pembuatan Preparat jaringan dan pengecatan Hematoksilin-Eosin

1. Kuas, kertas saring, dan label identitas
2. *Tissue Automatic Processing*
3. *Tissue Cassette*
4. Mikrotom (Leica)
5. *Slide warmer*
6. Oven
7. *Waterbath*
8. *Object glass*

9. *Deck glass*
10. *Beaker glass*
11. Pinset
12. Mikroskop Binokuler (Olympus photo slide BX51 with Cam DP71 12 mpx)
13. Optilab

### 3.7.2 Bahan

#### A. Perlakuan hewan coba

1. Hewan coba
2. Pakan standar hewan coba
3. Bahan anestetikum Ketamine dan Xylazene
4. Kloroform sebagai bahan euthanasia

#### B. Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta

1. Biji Kopi Robusta
2. Etanol 96%
3. Na CMC
4. Aquadest

#### C. Pembuatan preparat jaringan dan pengecatan Hematoksin-Eosin

1. Larutan Buffer Neutral Formalin 10%
2. Formic Acid 10%
3. Paraffin
4. Alkohol 95%, 80%, 75%, 70% dan alkohol absolut
5. Xylol
6. Aquadest steril

### 3.8 Perhitungan Dosis Anestesi

Bahan anestesi yang digunakan berupa campuran ketamine dan xylazine. Ketamine 10% (dosis 50mg/kg, Pantex Holland) dan Xylazine 2% (dosis 5mg/kg, Pantex holland) secara Intramuskular (Hartiningsih *et al.*, 2015) (Lampiran F).

#### A. Dosis Ketamin Anestesi

$$\text{Konsentrasi } 10\% = \frac{10\text{gr}}{100\text{ml}} = \frac{10.000\text{mg}}{100\text{ml}} = 100\text{mg/ml}$$

Berat badan hewan coba 175-200gr dikonversikan menjadi 0,175-0,2 kg

$$\text{Rumus} = \frac{\text{dosis} \times \text{berat badan}}{\text{konsentrasi}}$$

Jadi, dosis ketamine yang digunakan adalah 0,0875-0,1ml.

B. Dosis Xylazine

$$\text{Konsentrasi } 2\% = \frac{2gr}{100ml} = \frac{2000mg}{100ml} = 20mg/ml$$

Berat badan hewan coba 175-200gr dikonversikan menjadi 0,175-0,2 kg

$$\text{Rumus} = \frac{\text{dosis} \times \text{berat badan}}{\text{konsentrasi}}$$

Jadi, dosis xylazine yang digunakan adalah 0,04-0,05ml

### 3.9 Prosedur Penelitian

#### 3.9.1 Pembuatan Ethical Clearance

Permohonon ijin diajukan terlebih dahulu sebelum melaksanakan penelitian. Permohonan ijin ditujukan untuk Komite Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember sebagai tempat uji kelayakan etik. Penelitian akan dilaksanakan setelah surat kelayakan ethical clearance dikeluarkan.

#### 3.9.2 Identifikasi Tanaman

Proses Identifikasi biji kopi robusta akan dilakukan sebelum dilakukannya pembuatan sediaan gel. Identifikasi biji kopi robusta akan dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember. Penelitian akan dilaksanakan setelah biji kopi robusta teridentifikasi.

#### 3.9.3 Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta

Sampel biji kopi robusta kering dihaluskan dengan mesin pencacah biji hingga menjadi serbuk. Serbuk biji kopi robusta tersebut ditimbang sebanyak 1000 gram dan dilakukan maserasi dalam larutan etanol 96% dengan perbandingan antara serbuk dan pelarut 1:3 selama 72 jam dengan pengadukan menggunakan alat *orbital shaker*. Setelah itu sampel didiamkan selama 6 jam, kemudian diaduk agar homogen. Setelah itu sampel disaring menggunakan kertas saring dan etanol diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga ekstrak menjadi pekat dengan cara dipanaskan pada suhu 40-45° celcius, lalu uap etanol yang menyentuh kondensor yang dingin akan terkondensasi dan menjadi cair lagi

yang akan menetes ke labu penampung pelarut. Penguapan dilakukan selama tujuh setengah jam hingga tidak ada lagi etanol yang mengalir ke labu penampung pelarut. Ekstrak pekat didapatkan sebanyak 114,42gram.

Proses selanjutnya yaitu pembuatan basis gel dimulai dengan Na CMC sebanyak 2 gram. Basis gel dikembangkan dalam 100 ml air panas dengan suhu 70°C dalam mortar selama 15 menit hingga mengembang. Selanjutnya diaduk sampai terbentuk sediaan berwarna jernih.

Ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 40%, 50%, 60% didapatkan dengan melakukan pencampuran ekstrak biji kopi robusta dengan basis gel, maka akan dibuat 25gram gel menggunakan pengenceran dengan cara ekstrak biji kopi robusta dicampurkan dengan basis gel dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

(Sumber: Syamsuni, 2006)

ekstrak biji kopi robusta dengan tiga variasi konsentrasi yang dapat dilihat pada Tabel 3. 1 Formulasi Konsentrasi Gel

	Konsentrasi 40%	Konsentrasi 50%	Konsentrasi 60%
Ekstrak Biji Kopi Robusta	10gram	12,5gram	15gram
Basis Gel Na CMC	15gram	12,5gram	10gram
Total	25gram	25gram	25gram

#### 3.9.4 Persiapan Hewan Coba

Setiap kelompok hewan percobaan disiapkan dalam kandang yang terpisah dan beradaptasi selama dua minggu sebelum dilakukan penelitian. Setiap kandang berisi 2-3 ekor hewan coba. Makanan berupa pakan standar hewan coba (turbo) dan minuman berupa air bersih hewan coba diberikan secara *ad libitum*. Sebelum perlakuan, setiap tikus Wistar jantan ditimbang berat badannya terlebih dahulu dan diamati kesehatan fisiknya meliputi: gerakannya, berat badan, makanan dan minumannya. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan keseragaman sebelum dilakukan penelitian dan untuk mengontrol hewan coba.

### 3.9.5 Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba dianastesi selanjutnya dilakukan gingivektomi pada hari ke-0. Prosedur gingivektomi dilakukan pada mandibula tikus Wistar jantan pada regio posterior kiri mandibula yang sebelumnya dilakukan pengukuran terlebih dahulu secara vertikal dan horisontal. Panjang vertikal ditentukan 1 mm dari koronal ke apikal dan horisontal ditentukan dari lebar mesial sampai distal gigi molar pertama pada daerah bukal. Kemudian dilakukan pemotongan gingiva dengan menggunakan insersi *blade* skalpel menyudut sebesar 45° dengan permukaan gigi (Fedi *et al.*, 2004). Setelah perlakuan gingivektomi, luka dibersihkan menggunakan larutan fisiologis lalu ditahan menggunakan *cotton pellets* untuk menghentikan perdarahan, setelah perdarahan berhenti, hewan coba diberikan perlakuan. Kelompok I tidak diberi perlakuan apapun, pemberian gel ekstrak biji kopi robusta 40% pada kelompok II, gel ekstrak biji kopi robusta 50% pada kelompok III dan gel ekstrak biji kopi robusta 60% pada kelompok IV. Pemberian perlakuan dilakukan setiap pagi hari (sekitar pukul 08.00-10.00 WIB) dan sore hari (sekitar pukul 15.00-17.00) pengaplikasian menggunakan syringe 1ml yang jarumnya sudah dilepas sebanyak 0,05ml. Pasca pengaplikasian bahan tersebut, dibiarkan dan dijaga agar bahan tidak larut atau tersentuh dengan tidak memberi minum pada hewan coba kurang lebih selama setengah jam pasca pengaplikasian gel ekstrak biji kopi robusta.

### 3.9.6 Pengelompokan Hewan Coba

Hewan coba tikus Wistar jantan sebanyak 32 ekor akan dibagi menjadi 4 kelompok. Pembagian kelompok sebagai berikut:

#### A. Kelompok I

1. Merupakan kelompok kontrol negatif yang terdiri dari 8 ekor hewan coba, tanpa adanya perlakuan pasca gingivektomi.
2. Subkelompok hari ke-3 terdiri dari 4 ekor tikus Wistar jantan yang dikorbankan pada hari ke-3 dengan menggunakan kloroform 10%, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan preparat jaringan.



3. Subkelompok hari ke-7 terdiri dari 4 ekor tikus Wistar jantan yang dikorbkan pada hari ke-7 dengan menggunakan kloroform 10%, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan preparat jaringan

#### B. Kelompok II

1. Merupakan kelompok perlakuan yang terdiri dari 8 ekor hewan coba, dengan perlakuan berupa pemberian gel ekstrak biji kopi robusta 40% pasca gingivektomi.
2. Subkelompok hari ke-3 terdiri dari 4 ekor tikus Wistar jantan yang dikorbkan pada hari ke-3 dengan menggunakan kloroform 10%, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan preparat jaringan.
3. Subkelompok hari ke-7 terdiri dari 4 ekor tikus Wistar jantan yang dikorbkan pada hari ke-7 dengan menggunakan kloroform 10%, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan preparat jaringan

#### C. Kelompok III

1. Merupakan kelompok perlakuan yang terdiri dari 8 ekor hewan coba dengan perlakuan berupa pemberian gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 50% pasca gingivektomi.
2. Subkelompok hari ke-3 terdiri dari 4 ekor tikus Wistar jantan yang dikorbkan pada hari ke-3 dengan menggunakan kloroform 10%, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan preparat jaringan.
3. Subkelompok hari ke-7 terdiri dari 4 ekor tikus Wistar jantan yang dikorbkan pada hari ke-7 dengan menggunakan kloroform 10%, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan preparat jaringan.

#### D. Kelompok IV

1. Merupakan kelompok perlakuan yang terdiri dari 8 ekor hewan coba dengan perlakuan berupa pemberian gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 50% pasca gingivektomi.
2. Subkelompok hari ke-3 terdiri dari 4 ekor tikus Wistar jantan yang dikorbkan pada hari ke-3 dengan menggunakan kloroform 10%, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan preparat jaringan.

3. Subkelompok hari ke-7 terdiri dari 4 ekor tikus Wistar jantan yang dikorbkan pada hari ke-7 dengan menggunakan kloroform 10%, kemudian dilanjutkan dengan pembuatan preparat jaringan.

#### 3.9.7 Tahap Pembuatan Sediaan

Pemrosesan jaringan dilakukan untuk mempersiapkan jaringan sebelum dilakukan penyayatan menggunakan mikrotom. Kelompok hewan coba yang sudah dilakukan eutanasia, rahang kiri bawah dipotong mulai dari mesial gigi insisivus sampai bagian posterior kiri tikus beserta jaringan lunak (gingiva) bagian bukal dan lingual. Potongan rahang bawah tersebut harus segera difiksasi untuk mencegah terjadinya degenerasi. Fiksasi dilakukan dengan menggunakan larutan formalin 10% selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan tahap dekalsifikasi jaringan menggunakan asam formiat 10% selama 14 hari dengan cara potongan rahang bawah diambil dari larutan fiksasi kemudian dicuci menggunakan *xylol*. Setelah itu potongan rahang bawah dimasukkan dalam larutan dekalsifikasi sampai jaringan lunak mudah dipotong dengan cara ditusuk menggunakan jarum sampai dapat menembus jaringan dan menembus tulang. Setelah dilakukan dekalsifikasi, jaringan dipotong hingga menyisakan daerah mesial molar pertama rahang kiri bawah hingga distal molar satu rahang kiri bawah dan selanjutnya dilakukan pemrosesan menjadi bentuk sediaan histologi. Berikut tahapan pemrosesan jaringan menurut Syafriadi *et al* (2007) :

##### A. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan penarikan air dari dalam jaringan menggunakan alkohol yang konsentrasinya dari rendah ke tinggi. Dimulai dengan konsentrasi alkohol 70% selama 15 menit, 80% selama 1 jam, 95% selama 2 jam, dan 100% selama 3 jam.

##### B. Clearing

*Clearing* menggunakan bahan *xylol* sebanyak 3 kali masing-masing selama 1 jam, 2 jam, 2 jam.

### C. Impregnasi

Tahap ini menggunakan paraffin cair bersuhu 56-60 derajat Celsius sebanyak 3 kali masing-masing 2 jam. Impregnasi adalah proses infiltrasi bahan *embedding* dalam jaringan

### D. *Embedding*

*Embedding* merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding* yaitu paraffin. Tahapan *embedding* antara lain :

1. Mempersiapkan alat cetak blok paraffin (*base mould*). Alat cetak tersebut terbuat dari logam berbentuk siku-siku disusun di atas permukaan kaca. Alat cetak diolesi gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dengan blok paraffin.
2. Paraffin cair dituangkan ke dalam *base mould*, kemudian masukkan jaringan yang telah diimpregnasi menggunakan pinset sehingga didapatkan penampang jaringan dengan arah pemotong secara koronal.
3. Paraffin blok siap dipotong setelah dilepas dari alat cetakan.

### E. Penyayatan

1. Penyayatan menggunakan mikrotom, sebelumnya dibersihkan pisau mikrotom dengan kasa atau kertas saring yang dibasahi dengan *xylol* arah tegak lurus.
2. Mengatur ketebalan sayatan mikrotom setebal 5  $\mu\text{m}$ .
3. Mengambil sayatan yang telah diperoleh dengan kuas lalu letakkan di atas permukaan air *waterbath* dengan temperature tetap 56-58 derajat Celsius hingga sayatan mekar.
4. Mengambil sayatan yang sudah mekar dengan *object glass* yang diolesi dengan *meyer egg albumin*, dikeringkan dengan suhu 30-35 derajat Celsius minimal selama 12 jam

#### 3.9.8 Tahap Pengecatan *Hematoksilin Eosin*

Tahap pengecatan menggunakan Haematoksilin-Eosin. Pengecatan sediaan menurut Syafriadi *et al* (2007) sebagai berikut:

1. Xylol : 2 menit
2. Xylol : 2 menit

3. Alkohol absolut : 3 menit
4. Alkohol absolut : 3 menit
5. Alkohol 95% : 3 menit
6. Alkohol 95% : 3 menit
7. Air mengalir : 10-15 menit
8. Mayer's hematoxylin : 15 menit
9. Air mengalir : 20 menit
10. Eosin : 15 detik - 2 menit
11. Alkohol 95% : 2-3 menit
12. Alkohol 95% : 2-3 menit
13. Alkohol absolut : 2-3 menit
14. Alkohol absolut : 2-3 menit
15. Xylol : 3 menit
16. Xylol : 3 menit
17. Xylol : 3 menit

### **3.10 Perhitungan Jumlah Pembuluh Darah**

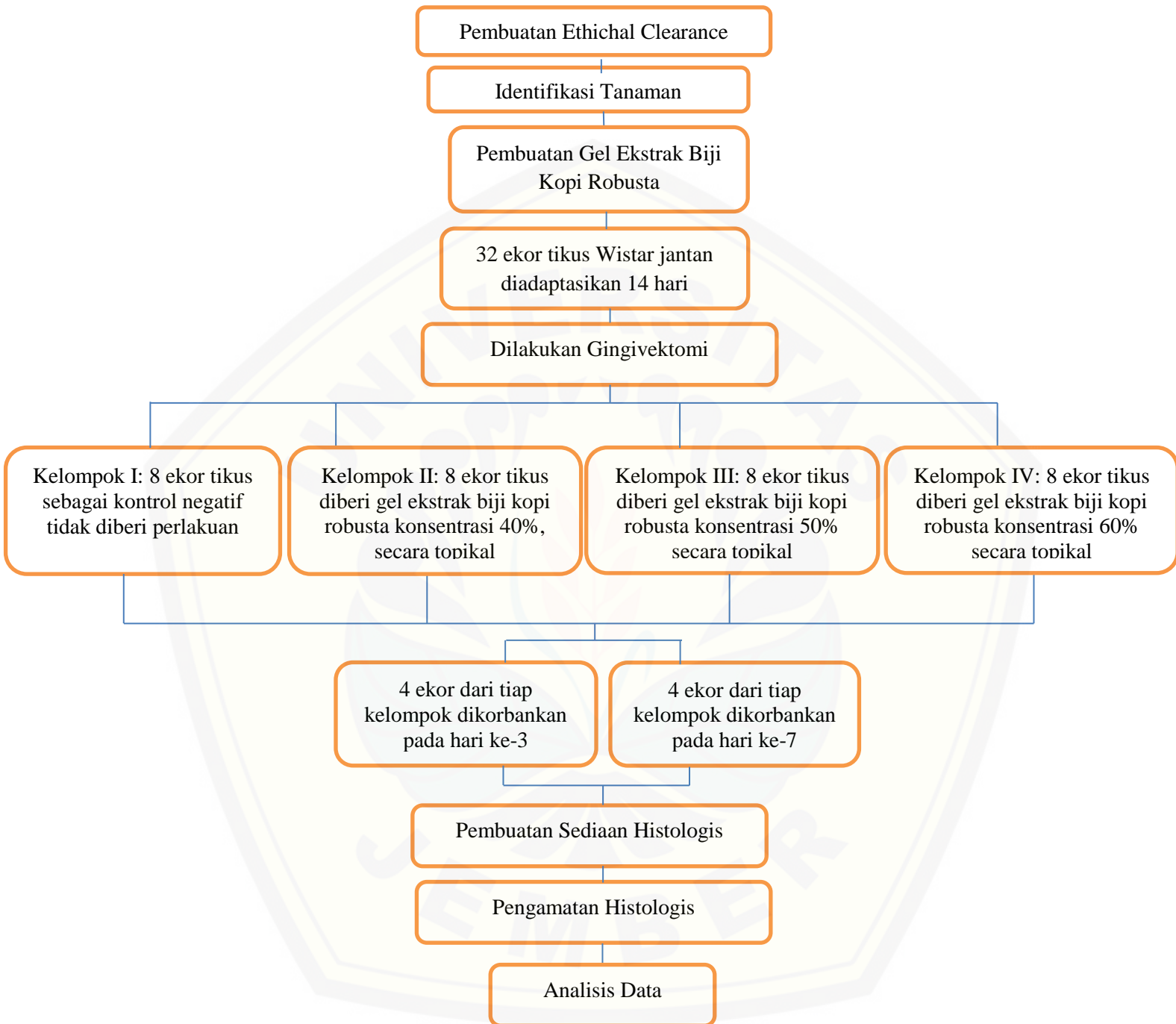
Pehitungan dilakukan 3 pengamat menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000x. Dilakukan penghitungan 3 lapang pandang terpilih pada 3 preparat dari masing-masing sampel. Pembuluh darah yang dihitung mulai dari pembuluh kapiler, pembuluh vena ataupun arteri pada daerah gingiva yang dilakukan gingivektomi dengan bentuk bulat atau oval yang terlihat seperti lumen dikelilingi sel endotel dan betuk memanjang tampak sebagai pembuluh panjang yang dibatasi oleh sel endotel. Sel endotel tampak berinti gepeng. Di dalam lumen bisa terdapat sel darah atau tidak ada. Pada setiap lapang pandang, perhitungan dilakukan secara manual. Selanjutnya hasil pembacaan dijumlah kemudian dirata-rata. Jika rata-rata pembuluh darah berada direntang antara 0-0,5 maka akan dibulatkan menjadi 0, jika rata-rata pembuluh darah berada direntang antara 0,6-1 maka dibulatkan menjadi 1.

### 3.11 Analisis Data

Data hasil penelitian terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normalitas menggunakan test *Shapiro Wilk* dan uji homogenitasnya *Levene test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95%, jika data yang diperoleh terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok, maka dilakukan uji beda dengan *LSD (Least Significance Difference)* dengan tingkat kepercayaan 95% (Notoatmojo, 2005).



### 3.12 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil adalah sebagai berikut:

1. Pemberian gel ekstrak biji kopi robusta dapat meningkatkan jumlah pembuluh darah pada luka pasca gingivektomi.
2. Dosis optimal gel ekstrak biji kopi robusta guna meningkatkan jumlah pembuluh darah adalah gel dengan konsentrasi 50%.

### 5.2 Saran

Saran-saran yang peneliti berikan adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek gel ekstrak biji kopi robusta dengan dosis yang berbeda pada penyembuhan luka.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas dan bioviabilitas pada penggunaan ekstrak biji kopi robusta.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Adair dan Montani. 2012. *Angiogenesis*. San Rafael:Morgan Clay Pool Life Science. Hal 2
- Ansel, H. C. 2008. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. ed IV, Alih bahasa Ibrahim, F. Jakarta : UI Press.
- Arief M. Candra Wirawan. 2011. *Panduan Sekolah Lapangan Budidaya Kopi Konservasi*. Jakarta: Conservation International Indonesia.
- Artho N. L., J. Wuisan, dan J. A. Najoan. 2015. Efek Serbuk Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) Terhadap Penyembuhan Luka Insisi Pada Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*). *Jurnal e-Biomedik (eBm)*3(3).
- Barrientos, S. Olievera, M. S. Golinko, H. Brem, M. C. Tomic. 2008. Growth Factors and Cytokines in Wound Healing. *J Wound Repair and Regeneration*;16: 585-601.
- Belay, Abebe and A. V Gholap. 2009. Characterization and Determination of Chlorogenic Acids (CGA) in Coffee Beans by UV-Vis Spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*.; 3(11) : 234-240
- Berman HM, J. Westbrook, Z. Feng , G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov. 2000. Bourne PE: The protein data bank. *Nucleic acids research* 2000; 28: 235-42.
- Budiawan. 2008. Peran Toksikologi Forensik dalam Mengungkap Kasus Keracunan dan pencemaran Lingkungan. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences* 1(1):35-39.
- Carmeliet P, D. Collen. 1998. *Vascular development and disorders : molecular analysis and pathogenic insights*. Kidney Int.
- Carranza FA, E.L. Hogan. 2012. *Clinical periodontology*. 11th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 2012.
- Chapple I dan A. Gilbert. 2002. *Understanding Periodontal Diseases: Assessment and Diagnostic Procedures in Practice*, QuitEssentials Publishing Co.Ltd.,p.1-10.
- Deshmane, S.L. Kremlev, S. Amini, S. and Sawaya, B.E., 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research*, 29(6), pp.313-326.



- Demidova-Rice TN, J.T. Durham, I.M. Herman. 2012. Wound Healing Angiogenesis: Inovation and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing. *Advances In Wound Care* 1(1).
- Daniel W. 2005. *Biostatic a Foundation for Analytic in The Health Science 6th Edition*. Canada: John Wiley dan Sons, Inc.
- Diegelman R.F., dan M.C. Evans. 2004. Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing, *Frontiers in Bioscience*.
- Direktorat Jendral Perkebunan. 2009. Musuh Alami, *Hama dan Penyakit Tanaman Kopi. Proyek Pengendalian Hama Terpadu Perkebunan Rakyat*. Direktorat Perlindungan Perkebunan. Direktorat Jenderal Bina Produksi Perkebunan. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Eming, S. A, T. Krieg , dan J. M. Davidson, 2007. *Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms*, J. Invest. Dermatol.
- Epstein. 1999. Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*. 341(10).
- Ermawati, T. 2015. *Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (Coffea Robusta) Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  pada Tikus Periodontitis yang Diinduksi Porphyromonas gingivalis*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Eroschenko V. P. 2010. *Atlas Histologi diFiore: Dengan Korelasi Fungsional, Ed. 11*. ed., D. Dharmawan and N. Yesdelita, Eds., Jakarta: EGC,.
- Farah, Adriana, Monteiro, Mariana, Donangelo, M. Carmen, Lafay, Sophie. 2008. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. *The Journal of Nutrition* 138: 2309-2315.
- Farah, Adriana. *Coffee :Emerging Health Effects and Disease Prevention, First Edition*. John Willey & Sons, Inc and Institute of Food Technologists (USA) : Wiley- Blackwell Publising Ltd; 2012.
- Fedi P.F, A.R. Vernino, J.L Gray. 2004. *Silabus Periodonti*. EGC, Jakarta.
- Folkman J, M. Klagsbrun. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-7.
- Folkman J, Y. Shing Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 1992;267(16):10931-34.
- Frisca, C.T. Sardjono, F. Sandra. *Angiogenesis: Patofisiologi dan Aplikasi Klinis*. JKM. 2009; Vol. 8 (2): 174-187.
- Gilbert S. G. 2005. *A Small Dose of Toxicology*. Seattle: CRC Press.

- Goldman HM, D.W. Cohen. 1980. *Periodontal therapy. 6th ed.* The CV Mosby Company; p. 640–90, 773–93.
- Goren H. G. , S. Soker, I. Vlodavsky, G. Neufeld. 1992. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J Biol Chem.* 267(9): 6093-8.
- Hanani E. 2015. *Analisis Fitokimia.* Jakarta: ECG.
- Haryanto B. 2012. *Prospek Tinggi Bertanam Kopi.* Yogyakarta: Pustaka Baru Press.
- Herdiana Y. 2007. *Formulasi Gel Uudesilenil Fenilalanin Dalam Aktivitas Sebagai Pencerah Kulit,* Universitas Padjajaran.
- Hidgon, J.V., B. Frei. 2006. Coffee and Health : a Review of Recent Human Research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* ; 46 :101-123
- Iwan R., A. Izzatul. 2005. Kekambuhan gingivitis hiperplasi setelah gingivektomi, *Majalah Kedokteran Gigi Unair (Dent. J)*, Vol 38, No. 3. Juli- September, 108- 111.
- Jeon H, H. Kim, D. Choi, D. Kim, S.Y. Park, Y.J. Kim, Y.M. Kim, Y. Jung. 2007. Quercetin Activates an Angiogenic Pathway, Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1-Vascular Endothelial Growth Factor, by Inhibiting HIF-Prolyl Hydroxylase: a Structural Analysis of Quercetin for Inhibiting HIF Prolyl Hydroxylase. *Mol Pharmacol.*; 71: 1676-1684
- Junqueira L.C., J. Carneiro, R.O. Kelley. 2007. *Histologi Dasar.* Edisi ke-5. Tambayang J., penerjemah. Terjemahan dari Basic Histology. EGC. Jakarta
- Kenisa, Y.P., Istiati, W.J. Setyari. 2012. Effect of Robusta Coffee Beans Ointment on Full Thickness Wound Healing. *Majalah Kedokteran Gigi* vol. 45(1).
- Kusumawati D. 2004. *Bersahabat Dengan Hewan Coba.* Yogyakarta: Gajah Mada Press.
- Lachman L, H.A. Lieberman, dan J.L. Karig. 1994. *Teori dan Praktek Farmas Industri,* Edisi ketiga, Terjemahan : S. Suyatmi, Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Martin A.J.S., Swarbrick, dan A. Cammarata. 1993. *Farmasi Fisika.* Edisi 3, diterjemahkan oleh Yoshita. UI-Press. Jakarta.

- Majewska I, E. Gendaszewska-Darmach. 2011. Proangiogenic Activity of Plant Extracts in Accelerating Wound Healing-a New Face of Old Phytomedicines. *Biochimica Polonica.*; 58(4): 449-460.
- Meenawat A, Verma SC, Govila V, Srivastava V, Punn K. 2013. Histological and clinical evaluation of gingival healing following gingivectomy using different treatment modalities. *J Int Clin Dent Res Organ.*
- Najiyati, S dan Danarti. 2012. *Kopi, Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. PT. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Newman MG, H.H. Takei, F.A. Carranza. 2019. *Clinical periodontology. 9th ed.* Philadelphia: WB Saunders Co; p. 74–94, 263–9, 432–53, 631–50, 749–61.
- Notoatmodjo S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Panggabean, Edy. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta Selatan: Rineka Cipta.
- Plank MJ, B.D. Sleeman. 2004. Tumour-induced angiogenesis: a review. *J. Theo. Med.*; 5: 137–53.
- Polverini P.J. 2002. Angiogenesis in health and disease : insight into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *J Dental Edu.*; 66: 962-75.
- Prastowo, B., E. Karmawati, Rubiyo, Siswanto, C. Indrawanto, S.J. Munarso. 2010. *Budidaya dan pascapanen kopi* (p. 62). Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Rajan V., R.Z Murray. 2008. *The Duplication Nature of Inflammation in Wound Repair Wound*. Wound Practice Research.
- Rezeki, S., R.F. Hakim, dan P. Rahmina. 2012. Pengaruh Ekstrak Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis*) 7,5% terhadap Penyembuhan Ulkus Traumatik pada Mukosa Oral (Penelitian pada Tikus Model). *Cakradonya Dental Journal*. 4(2): 475-542.
- Rini BI, E.J. Small. 2005. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.*; 23:1028-43.
- Rukmana, H. R. 2014. *Untung Selangit dari Agribisnis Kopi*. Lily Publisher, Jakarta.
- Sato, Yuki, I. Shirou, K. Toshimitsu, O. Jiro, K. Masaki, H. Takeshi. 2011. In bitro and In Vitro Antioxidant properties of Chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 403 : 136-138.

- Schreml S., R. Szeimies, L. Prantl, M. Landthaler, P. Babilas. 2010. Wound Healing in the 21st Century. *J Am Acad Dermatol*.
- Siswoputranto, P.S. 1993. *Kopi Internasional dan Indonesia*. Kanisius. Yogyakarta
- Strodtbeck F. 2001. Physiology of Wound Healing. *New Inf Nurs Rev* **1**: 43–52.
- Sunilson, A.J. James, J. Thomas, J. Jayaraj, P. Varatharajan, R. Muthappan. Antibacterial and Wound Healing Activities of *Melastoma malabathricum* Linn. *Arf. J. Infect.* 2008; **2**(2): Hal 68-73.
- Syafriadi M, B. Kusumawardani, D. Setyorini, dan R. Joelianto. 2007. *Petunjuk Praktikum Patologi Anatomi: Degenerasi dan Radang*. Tidak Diterbitkan. Buku Petunjuk Praktikum. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Syamsuni. 2006. *Farmasetika Dasar dan Hitungan Farmasi*, Jakarta: EGC.
- Tan Y. T. F., K. K. Peh, O. Al-Hanbali. 2000. Effect of Carbopol and Polyvinylpyrrolidone on the Mechanical, Rheological, and Release Properties of Bioadhesive Polyethylene Glycol Gels, *AAPS PharmSciTech*, 1 (3), 1-9.
- Trijani S. 1996. Evaluasi kesembuhan klinis setelah tindakan gingivektomi dengan atau tanpa peck periodontal pada kasus gingivitis pubertas. *TIMNAS* 1996; 416–23.
- Tsakiroglou, P. VandenAkker, N.E. Del Bo', C. Riso, P. Klimis-Zakas, D. 2019. Role of Berry Antocyanins and Phenolic Acids on Cell Migration and Angiogenesis. *Nutriens* 11(1075).
- Velnar T, T. Bailey, V. Smorkolj. 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* **37**: 1528–1542
- Vinay Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, J. Aster. *Tissue renewal, regeneration, and repair*. Elsevier Inc. 2012.
- Voight R. 1994. *Buku Pengantar Teknologi Farmasi, 572-574*, diterjemahkan oleh Soedani, N., Edisi V, Yogyakarta, Universitas Gadjah Mada Press.
- Wang Neng. Ellagic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenesis effects via VEGFR-2 signaling pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2012) 134:943–955

- Wigati, Pratiwi, Nissa, Utami. 2018. Uji Karakteristik Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre) dari Bogor, Bandung dan Garut dengan Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). FMIPA Universitas Pakuan Bogor. *Fitofarmaka*, Vol.8, No.1, Juni 2018.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Wonodirekso, Sugito. 2010. *Penuntun Praktikum Histologi*. Jakarta: Dian Rakyat
- Wulff B, T. Wilgus. 2012. Mast Cell Activity in the Healing Wound: More the meets the eye. *Exp Dermatol* 22(8).
- Yagiela J.A., F.J. Dowd, E.A. Neidle. 2004. *Pharmacology and theurapeutics for dentistry 5th ed*. St. Louis: Mosby.
- Zazuli Z., T. Hendrayana, B. Pratiwi, C. Rahayu. 2017. Analisis Kesesuaian Dosis pada Pasien Gangguan Fungsi Ginjal di Suatu Rumah Sakit Pendidikan di Kota Bandung. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, (42)1: 42-49.

## Lampiran

## A. Sertifikat 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><b>ETHIC COMMITTEE APPROVAL</b>  <u>No.745/UN25.8/KEPK/DL/2019</u></p>	
<p>Title of research protocol : "Effect of Robusta Coffee Bean Extract Gel Againsts the Number of Blood Vessel in Wound Healing After Gingivectomy"</p>	
Document Approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Raquel Ananda Hasa
Member of research	: -
Responsible Physician	: Raquel Ananda Hasa
Date of approval	: Desember 2019- Selesai
Place of research	: 1. Lab. Farmakologi Ruang Hewan FKG UNEJ 2. 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, December 12<sup>th</sup> 2019</p>	
 Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember (Dr. R. Ramardyan P. M. Kes, Sp. Pros.)	 Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember (Prof. Dr. Irig. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si.)

## B. Surat Ijin Identifikasi Tanaman



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

---

Nomor : 4258 /UN25.8.TL/2019  
Perihal : Izin Identifikasi Tanaman

15 OCT 2019

Kepada Yth  
Ketua Bagian Laboratorium Tanaman  
Politeknik Negeri Jember  
Di Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan izin identifikasi tanaman bagi mahasiswa kami di bawah ini:

1	Nama	: Raquel Ananda
2	NIM	: 161610101100
3	Semester/Tahun	: VII/2019
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Mastrip II no.29c, Jember
6	Judul Penelitian	: Efektivitas Gel Ekstrak Kopi Robusta terhadap Angiogenesis pada Penyembuhan Luka Pasca Gingivektomi pada Tikus Wistar
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember
8	Data/alat yg di pinjam	: -
9	Waktu	: September 2019 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Menganalisis Efektivitas Kopi Robusta sebagai Bahan Gel terhadap Angiogenesis pada Penyembuhan Luka Pasca Gingivektomi pada Tikus Wistar
11	Dosen Pembimbing	: 1. drg. Melok Aris Wahyukundari, M.Kes, Sp.Perio : 2. drg. Pudji Astuti, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an. Dekan  
Wakil Dekan I  
**Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes, Sp.OF**  
NIP. 196811251999032001

## C. Hasil Identifikasi Tanaman

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](mailto:Polije@polije.ac.id) Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

---

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN**

No: 32/PL.17.3.1.02/LL/2019

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 6358/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 : Raquel Ananda  
NIM : 161610101100  
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, 22 Oktober 2019

Ka. Laboratorium Tanaman

H. Lili Mastuti, MP  
NIP. 195808201987032001




## D. Surat Ijin Pembuatan Gel

	KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS JEMBER FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991	
Nomor	: 635/UN25.8.TL/2019	15 OCT 2019
Perihal	: Izin Pembuatan Sediaan Gel	
<p>Kepada Yth Ketua Bagian Farmasetika Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember Di Jember</p>		
<p>Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan izin identifikasi tanaman bagi mahasiswa kami di bawah ini:</p>		
1	Nama	: Raquel Ananda Hasa
2	NIM	: 161610101100
3	Semester/Tahun	: VII/2019
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Mastrip II no.29c, Jember
6	Judul Penelitian	: Efektivitas Gel Ekstrak Kopi Robusta terhadap Angiogenesis pada Penyembuhan Luka Pasca Gingivektomi pada Tikus Wistar
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember
8	Data/alat yg di pinjam	: -
9	Waktu	: September 2019 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Menganalisis Efektivitas Kopi Robusta sebagai Bahan Gel terhadap Angiogenesis pada Penyembuhan Luka Pasca Gingivektomi pada Tikus Wistar
11	Dosen Pembimbing	: 1. drg. Melok Aris Wahyukundari, M.Kes, Sp.Perio : 2. drg. Pudji Astuti, M.Kes
<p>Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih</p>		
<p>an. Dekan Wakil Dekan I,</p>  <p><b>Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes, Sp.OF</b> NIP. 196811251999032001</p>		

## E. Surat Ijin Penelitian Lab Biomedik

321

**FORM 02 LEMBAR DISPOSISI**



**BAGIAN BIOMEDIK FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**


Jl. Kalimantan no. 37-Kampus Bumi Tegal Boto Jember 68121  
Telp. (0331) 333536

**Form 02**

---

<b>Surat Dari</b>	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
<b>Nomor Surat</b>	: 0326/UN25.8.TL/2020
<b>Tanggal Surat</b>	: 28 Januari 2020
<b>Perihal</b>	: Izin Penelitian
<b>Tanggal Terima</b>	: 29 Januari 2020
<b>Nomor Agenda</b>	: 321
<b>Disposisi Kepada</b>	: 1. Kalab/PJMK ..... 2. Koordinator R.Hewan Coba 3. PLP Laboratorium Hewan Coba (P.Akus) + Histologi (B. Wahyu)
<b>Isi Disposisi</b>	: <p>Proposal penelitian telah diterima. Memberikan ijin penelitian kepada:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nama (NIM/NIP) : Raquel Ananda Hasa (161610101100)</li> <li>• Fakultas/Prodi : Fakultas Kedokteran Gigi / Pendidikan Dokter Gigi</li> <li>• Universitas : Universitas Jember</li> <li>• Judul penelitian : Efensi Gel Ekstrak Kopi Robusta terhadap Peningkatan Jumlah Pembuluh Darah pada Penyembuhan Luka Pasca Gingivektomi</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Waktu Penelitian : Januari 2020 s/d selesai</li> <li>• Penelitian di Laboratorium : 1. Laboratorium Hewan Coba 2. Laboratorium Histologi</li> </ul>

Jember, 29 Januari 2020  
Ketua Bagian Biomedik

  
 (drg. Amandia Dewi P.S., M.Biomed)

## F. Perhitungan Dosis Anestesi

Perhitungan dosis ketamine

$$\text{Konsentrasi } 10\% = \frac{10\text{gr}}{100\text{ml}} = \frac{10.000\text{mg}}{100\text{ml}} = 100\text{mg/ml}$$

Berat badan hewan coba 175-200gr dikonversikan menjadi 0,175-0,2 kg

$$\begin{aligned} \text{Rumus} &= \frac{\text{dosis} \times \text{berat badan}}{\text{konsentrasi}} \\ &= \frac{50 \times 0,175}{100} = 0,0875 \dots\dots (1) \qquad = \frac{50 \times 0,2}{100} = 0,1\dots\dots (2) \end{aligned}$$

Jadi, dosis ketamine yang digunakan adalah 0,0875-0,1ml

Perhitungan dosis xylazene

$$\text{Konsentrasi } 2\% = \frac{2\text{gr}}{100\text{ml}} = \frac{2000\text{mg}}{100\text{ml}} = 20\text{mg/ml}$$

Berat badan hewan coba 175-200gr dikonversikan menjadi 0,175-0,2 kg

$$\begin{aligned} \text{Rumus} &= \frac{\text{dosis} \times \text{berat badan}}{\text{konsentrasi}} \\ &= \frac{5 \times 0,175}{20} = 0,04\text{ml} \dots\dots(1) \qquad = \frac{5 \times 0,2}{20} = 0,05\text{ml}\dots\dots(2) \end{aligned}$$

Jadi, dosis xylazene yang digunakan adalah 0,04-0,05ml

## G. Formulasi Pembuatan Gel

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$M_1$  = konsentrasi awal

$V_1$  = volume awal

$M_2$  = konsentrasi akhir

$V_2$  = volume akhir

Konsentrasi 40%

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$\begin{aligned} 100\% V_1 &= 40\% \times 25 \\ &= 10\text{gr} \end{aligned}$$

Jadi dibutuhkan 10 gram ekstrak biji kopi robusta pekat untuk membuat 25 gram gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 40%.

Konsentrasi 50%

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$\begin{aligned} 100\% V_1 &= 50\% \times 25 \\ &= 12,5\text{gr} \end{aligned}$$

Jadi dibutuhkan 12,5 gram ekstrak biji kopi robusta pekat untuk membuat 25 gram gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 50%.

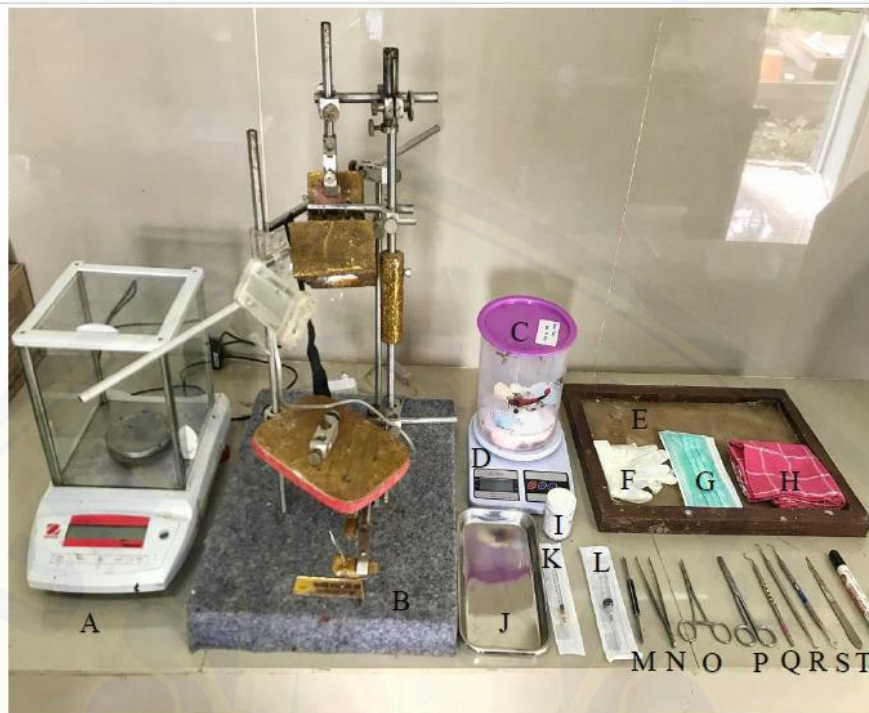
Konsentrasi 60%

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$\begin{aligned} 100\% V_1 &= 60\% \times 25 \\ &= 15\text{gr} \end{aligned}$$

Jadi dibutuhkan 15 gram ekstrak biji kopi robusta pekat untuk membuat 25 gram gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 60%.

## H.1 Alat dan Bahan Perlakuan Hewan Coba



Keterangan :

- |                                   |                               |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| A. Neraca digital                 | M. Pisau malam                |
| B. Dental rat chair               | N. Pinset                     |
| C. Tabung plastik                 | O. Arteri clam                |
| D. Timbangan digital              | P. Gunting bedah              |
| E. Papan bedah                    | Q. Sonde setengah lingkaran   |
| F. <i>Handscoon</i>               | R. Eskavator kecil            |
| G. Masker                         | S. Eskavator besar            |
| H. Kain lap                       | T. Blade no11, handle scalpel |
| I. <i>Cotton roll</i>             | U. Spidol                     |
| J. Baki stainless steel           |                               |
| K. <i>Disossible syringe</i> 1 ml |                               |
| L. <i>Disossible syringe</i> 5 ml |                               |

## H.2 Alat dan Bahan Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta



Pencacah Biji Kopi



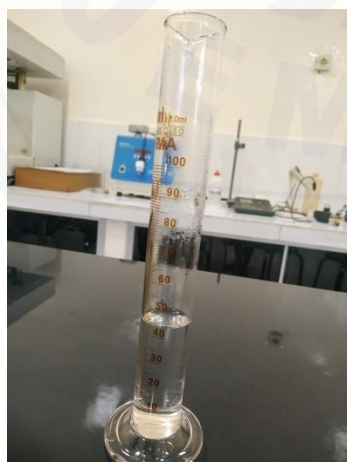
Rotary Evaporator



Orbital Shaker



Timbangan



Gelas Ukur



Lumpang dan Alu

### H.3 Alat dan Bahan Pembuatan Sediaan



Tissue Processing



Slide Warmer



Water Bath



Microtom



Mikroskop Binokular



Optilab

## H.4 Alat dan Bahan Pembuatan Sediaan

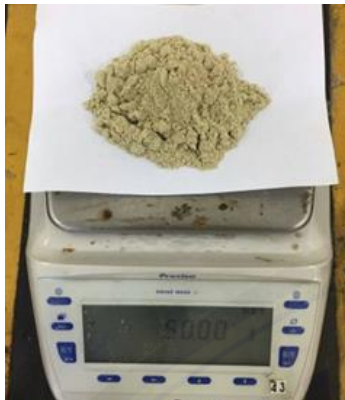


Keterangan :

- |                 |                  |
|-----------------|------------------|
| 1. Xylol        | 7. Entelan       |
| 2. Ethanol      | 8. Eosin         |
| 3. Alkohol 96%  | 9. Hemaktosilin  |
| 4. Aquades      | 10. Object glass |
| 5. Alkohol 70%  | 11. Deck glass   |
| 6. Asam formiat |                  |



I.1 Prosedur Ekstraksi



Serbuk kopi ditimbang



Pengekstrakan dengan etanol 96%



Pengadukan dengan Orbital Shaker



Proses Penyaringan

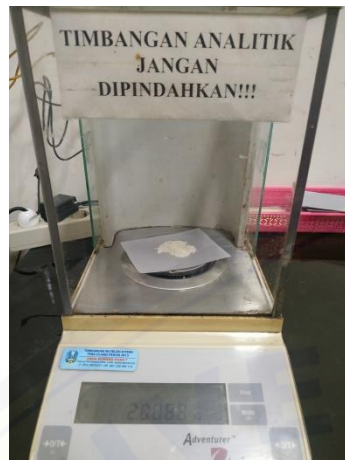


Evaporasi untuk menghilangkan pelarut



Ekstrak biji kopi robusta

I.2 Prosedur Pembuatan Gel



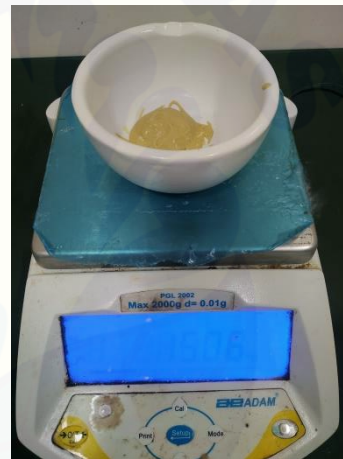
Na CMC ditimbang sebanyak 2gr



Air hangat 80ml untuk



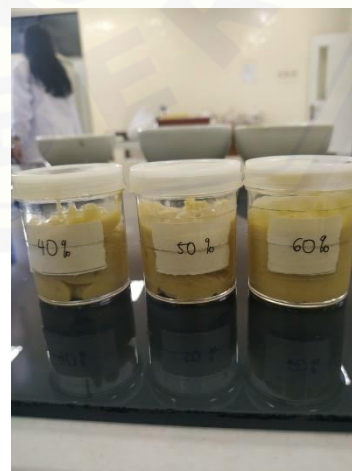
Na CMC dekembangkan dengan air hangat ditimbang



Ekstrak biji kopi robusta



Ekstrak dicampur dengan Na CMC



Gel ekstrak biji kopi robusta

### I.3 Perlakuan Hewan Coba



Adaptasi Hewan Coba



Anestesi sebelum gingivektomi



Tindakan Gingivektomi



Pemberian gel



Euthanasia dan pengambilan jaringan

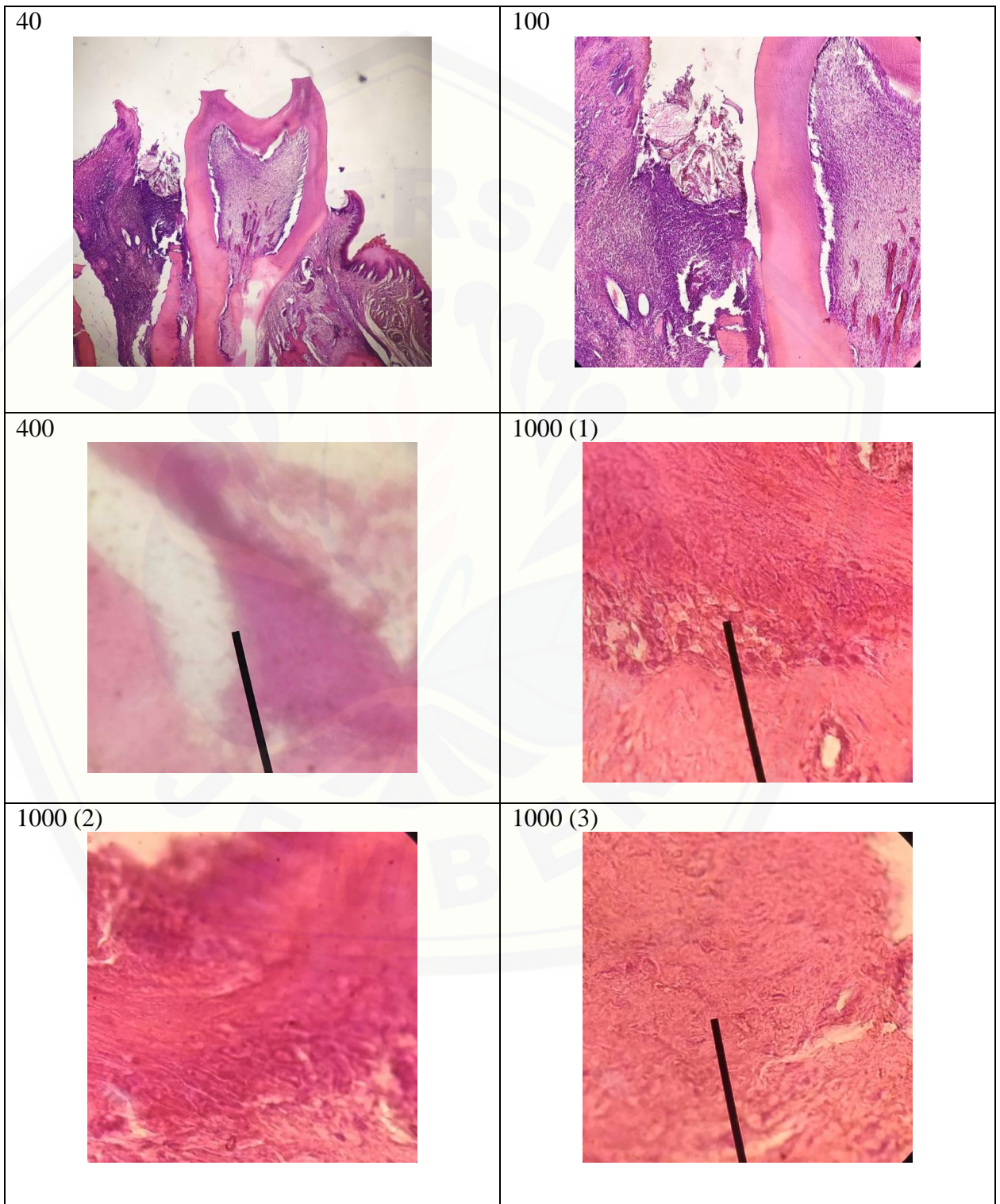


Perendaman Jaringan

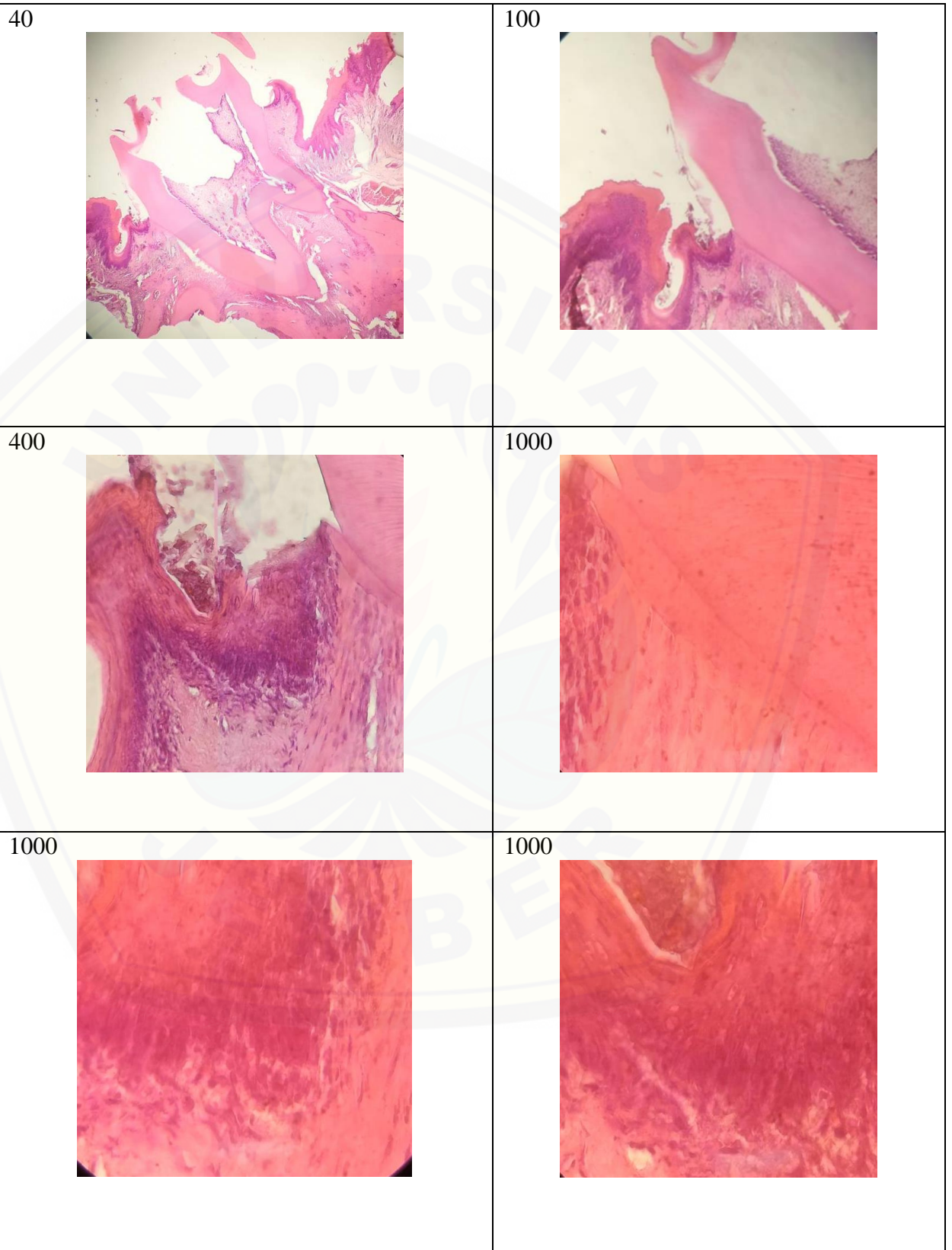
J. Gambaran Histologi Pembuluh Darah

Gambaran Histologi Hari ketiga kontrol negatif

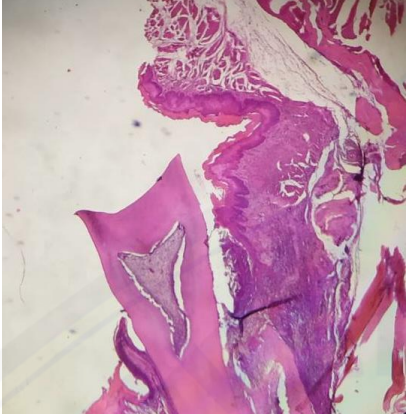
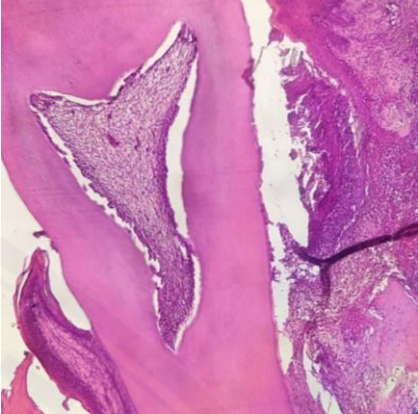
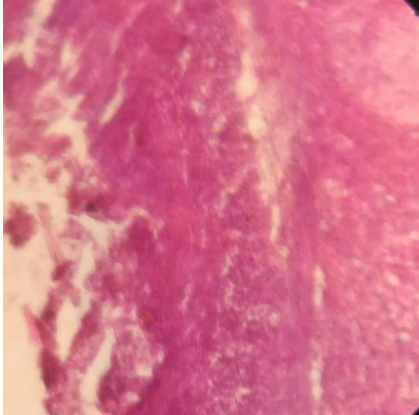
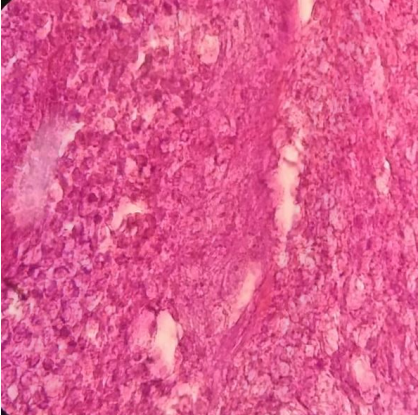
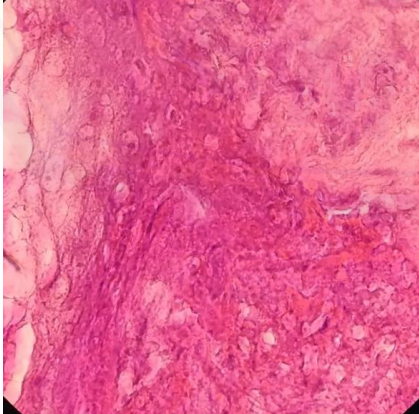
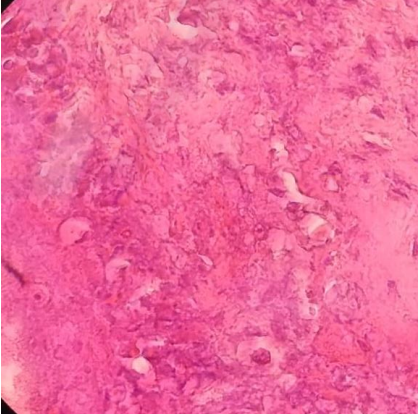
Sampel 1



Sampel 2

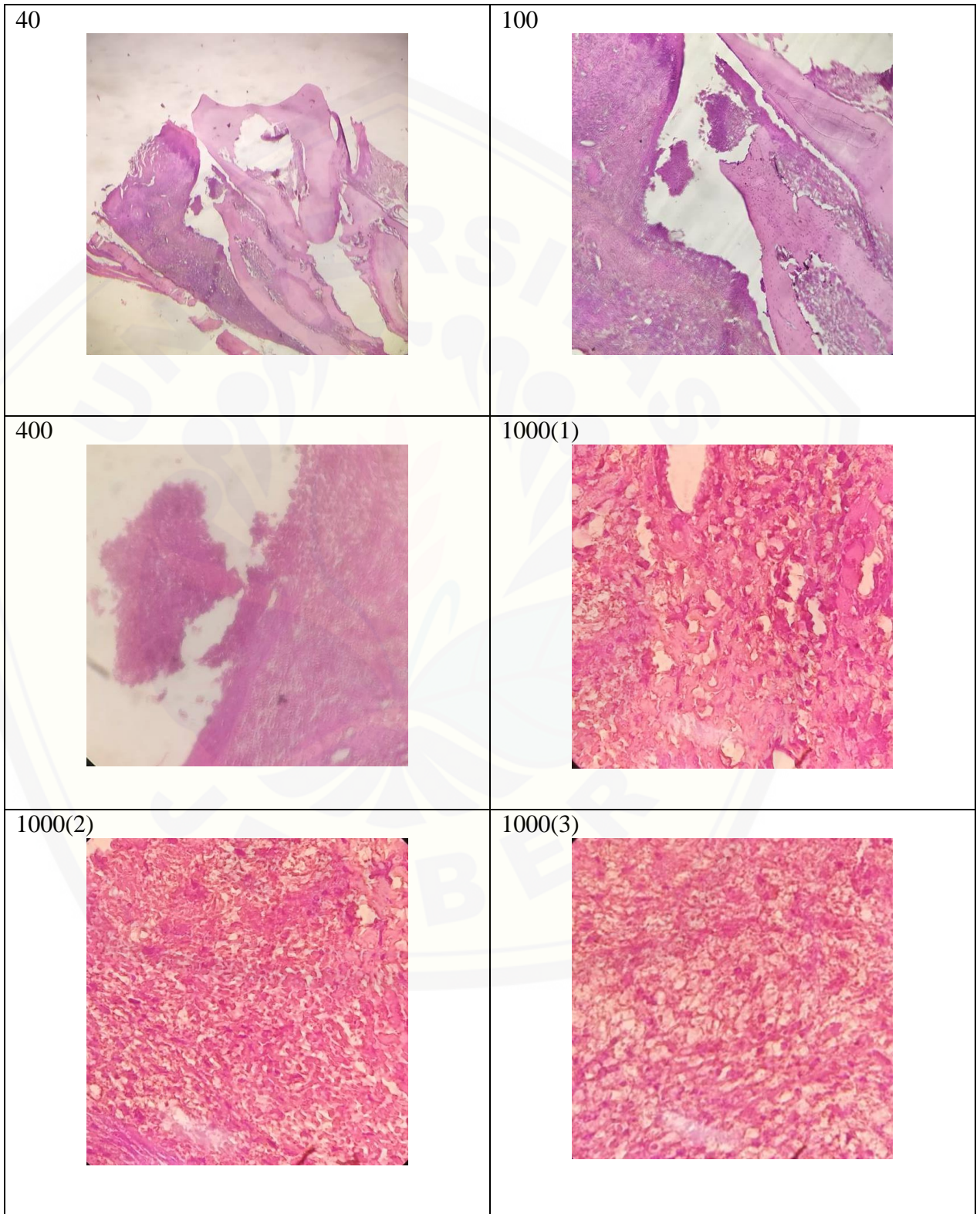


Sampel 3

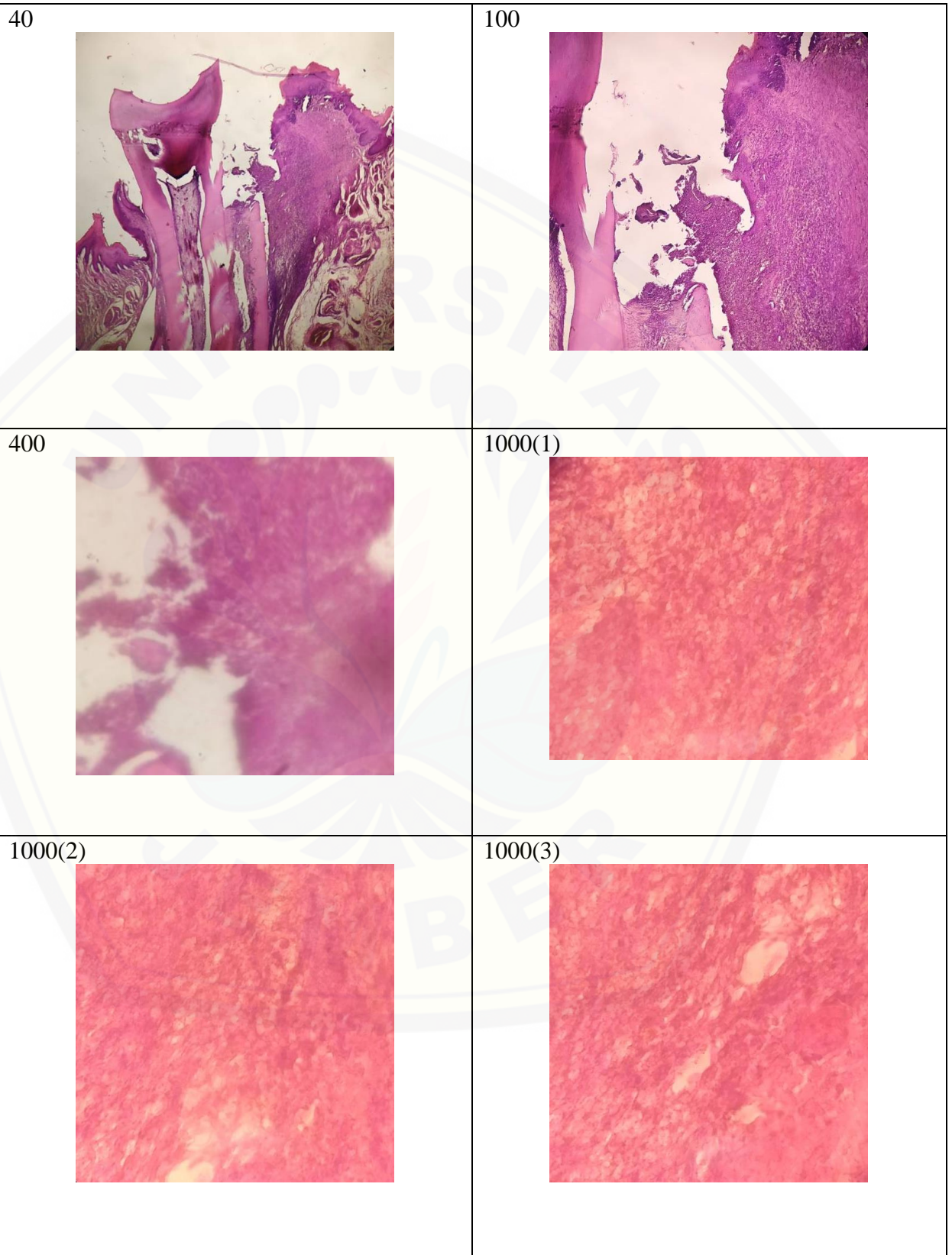
<p>40</p> 	<p>100</p> 
<p>400</p> 	<p>1000(1)</p> 
<p>1000(2)</p> 	<p>1000(3)</p> 

Gambaran Histologi Hari ketiga perlakuan menggunakan gel konsentrasi 40%

Sampel 1

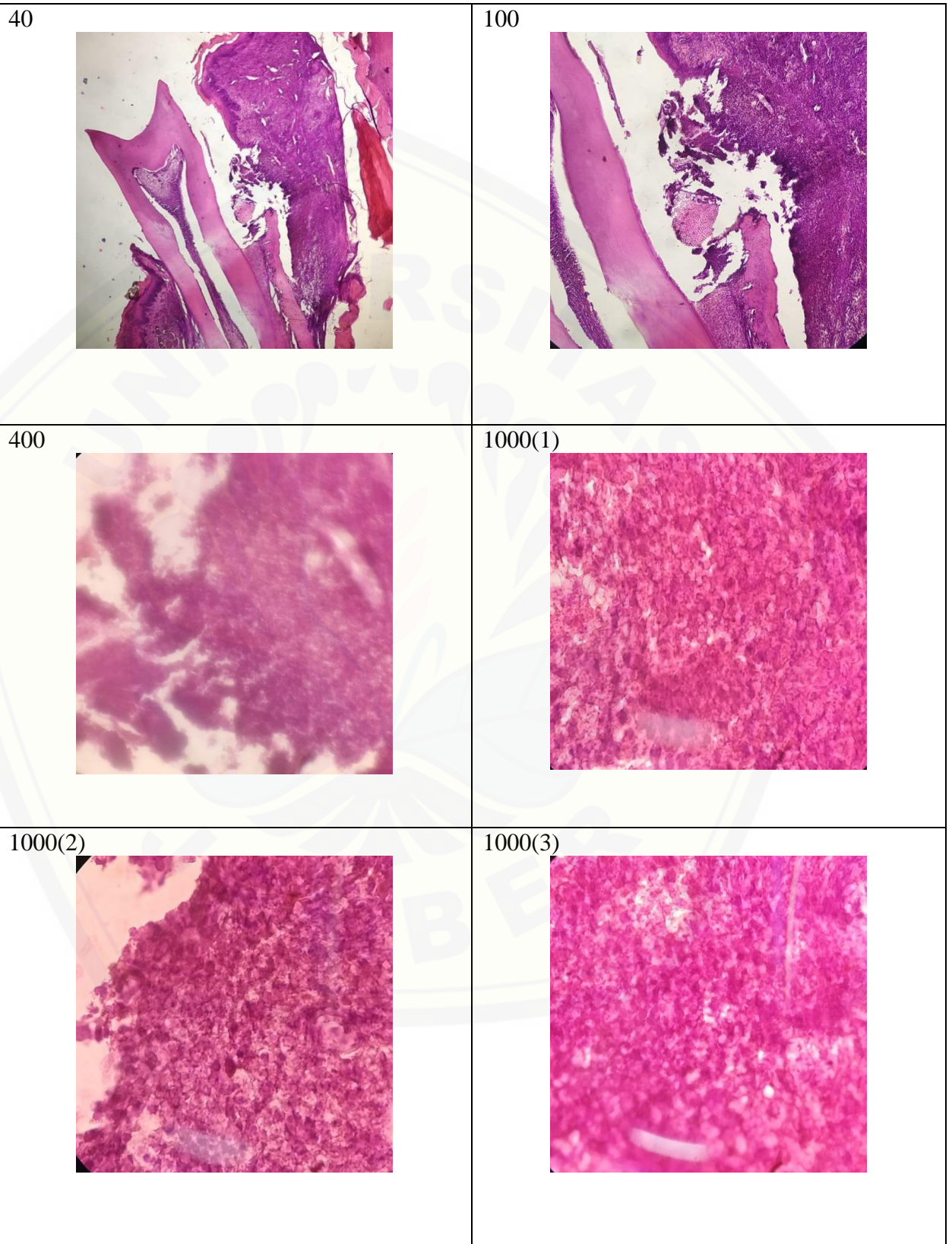


Sampel 2



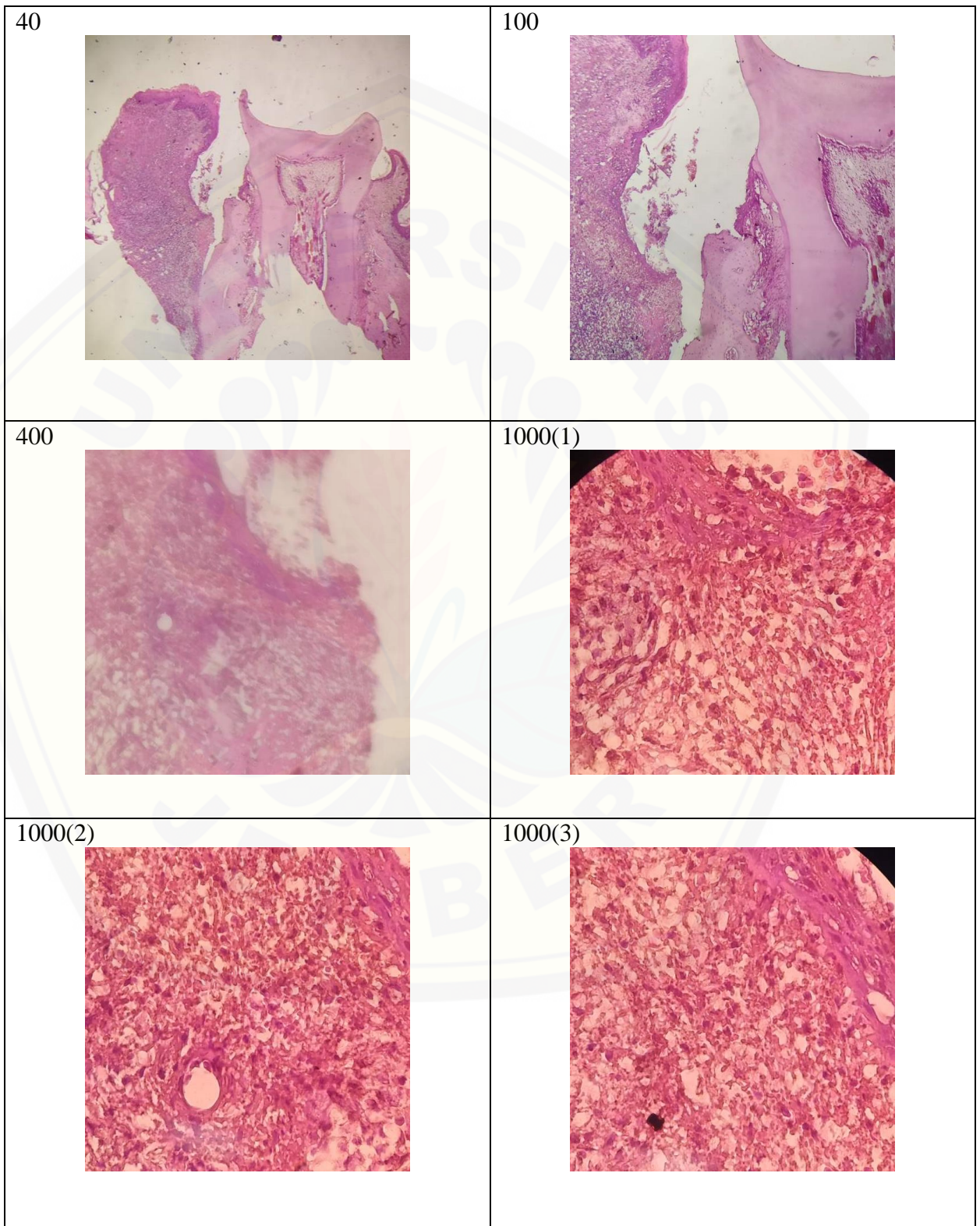


Sampel 3

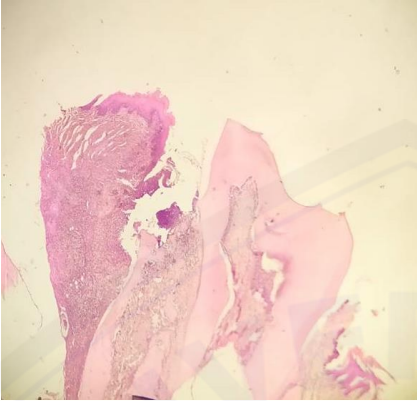
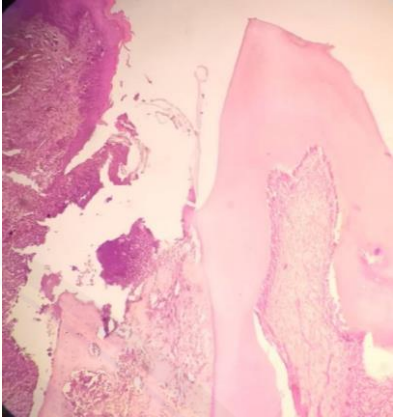
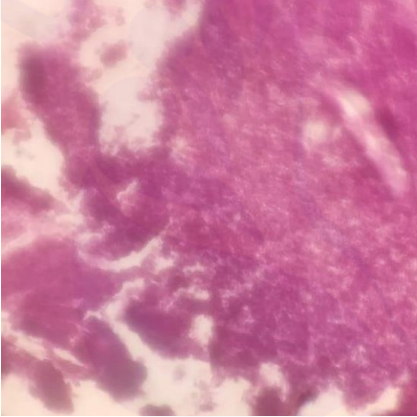
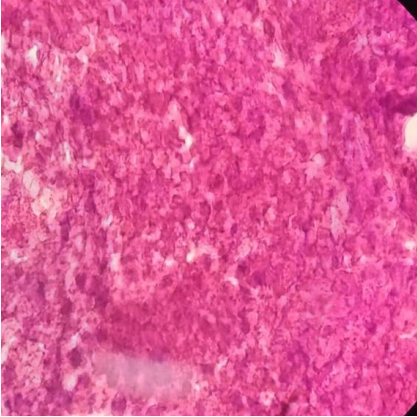
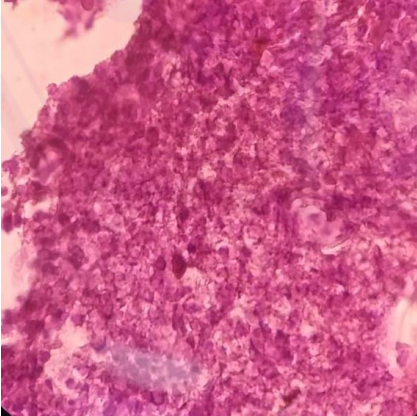
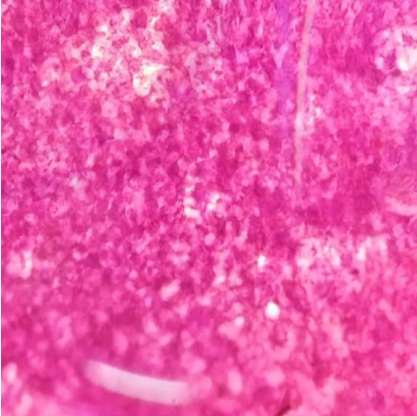


Gambaran Histologi Hari ketiga perlakuan menggunakan gel konsentrasi 50%

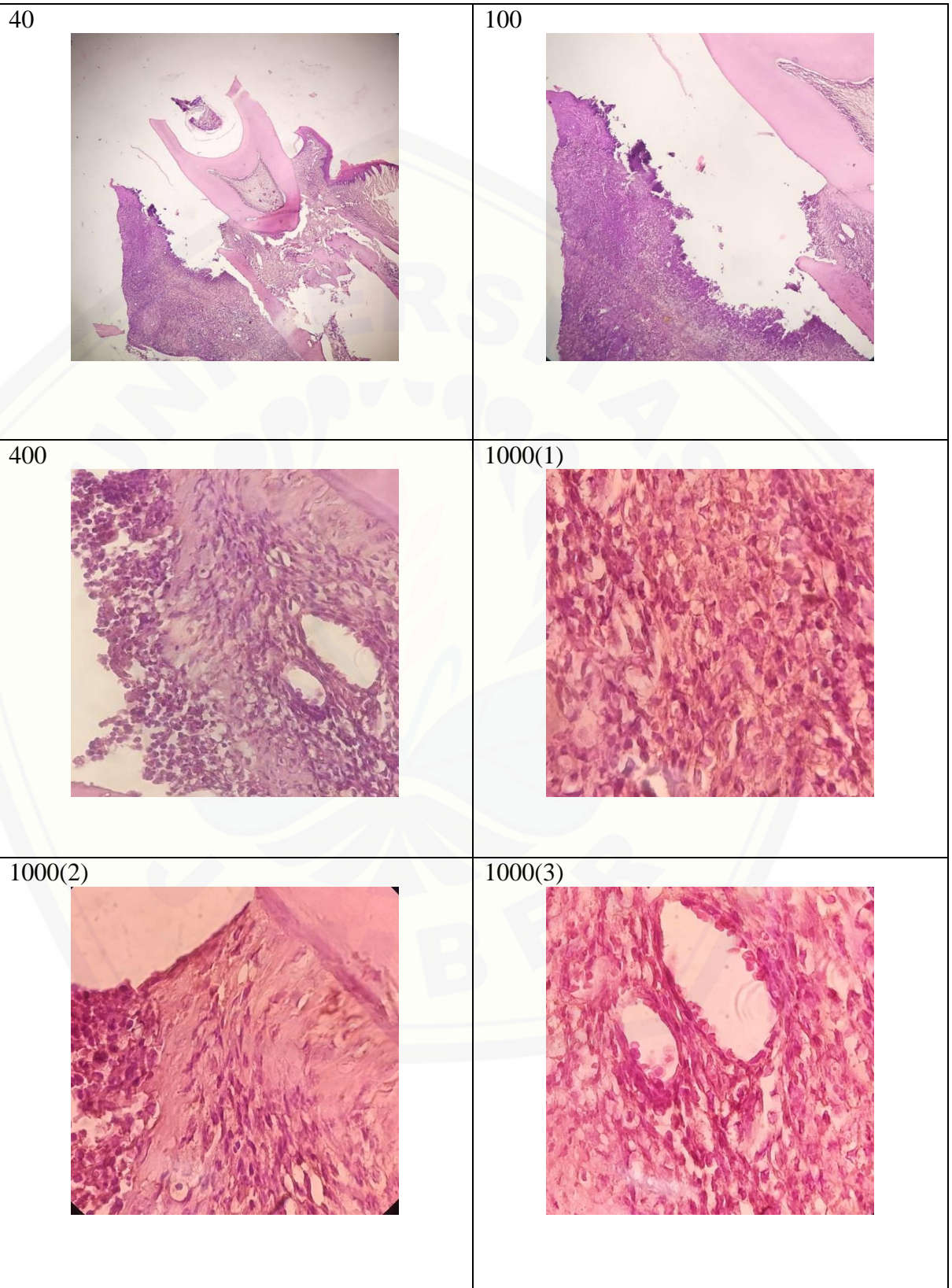
Sampel 1



Sampel 2

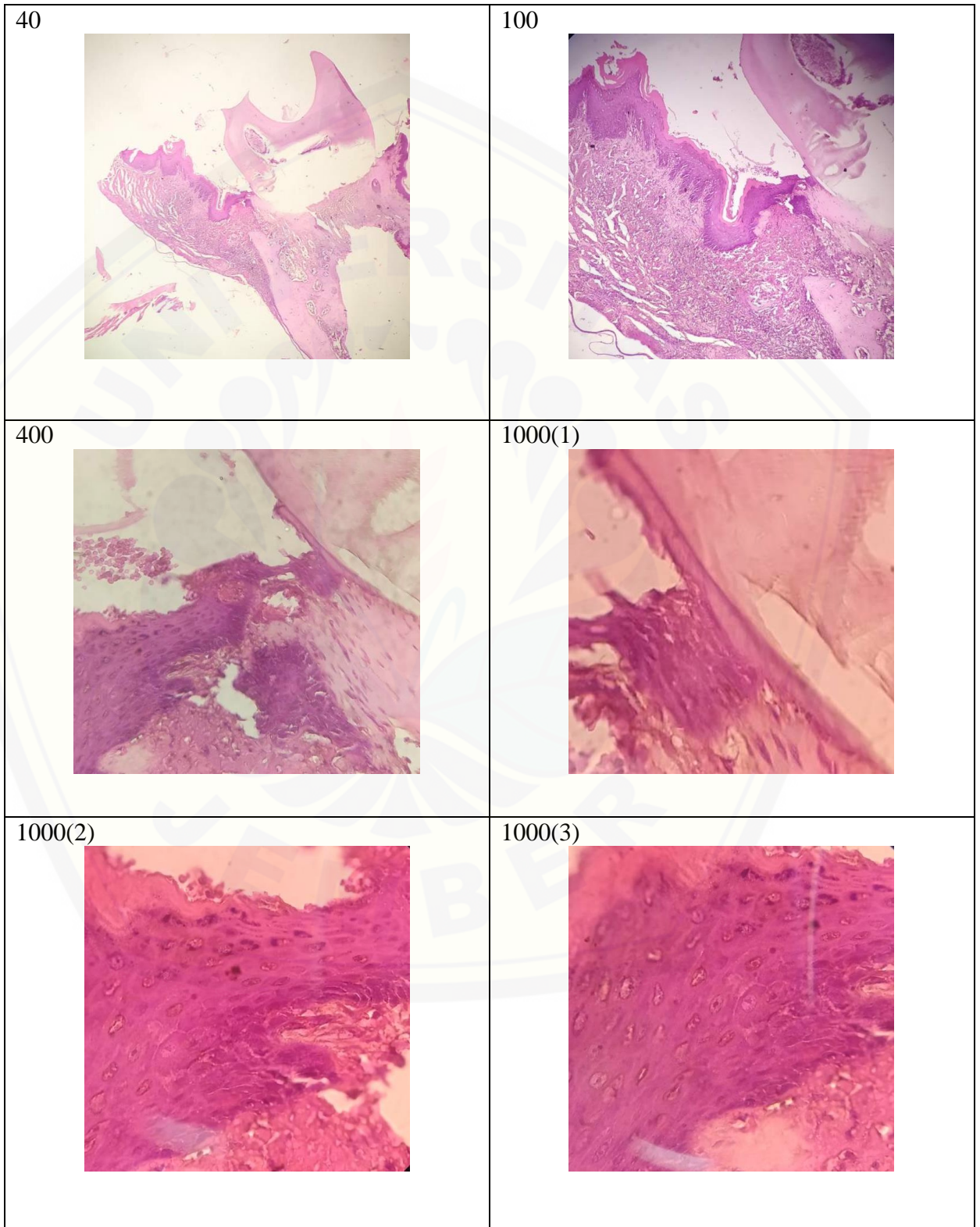
<p>40</p> 	<p>100</p> 
<p>400</p> 	<p>1000(1)</p> 
<p>1000(2)</p> 	<p>1000(3)</p> 

Sampel 3

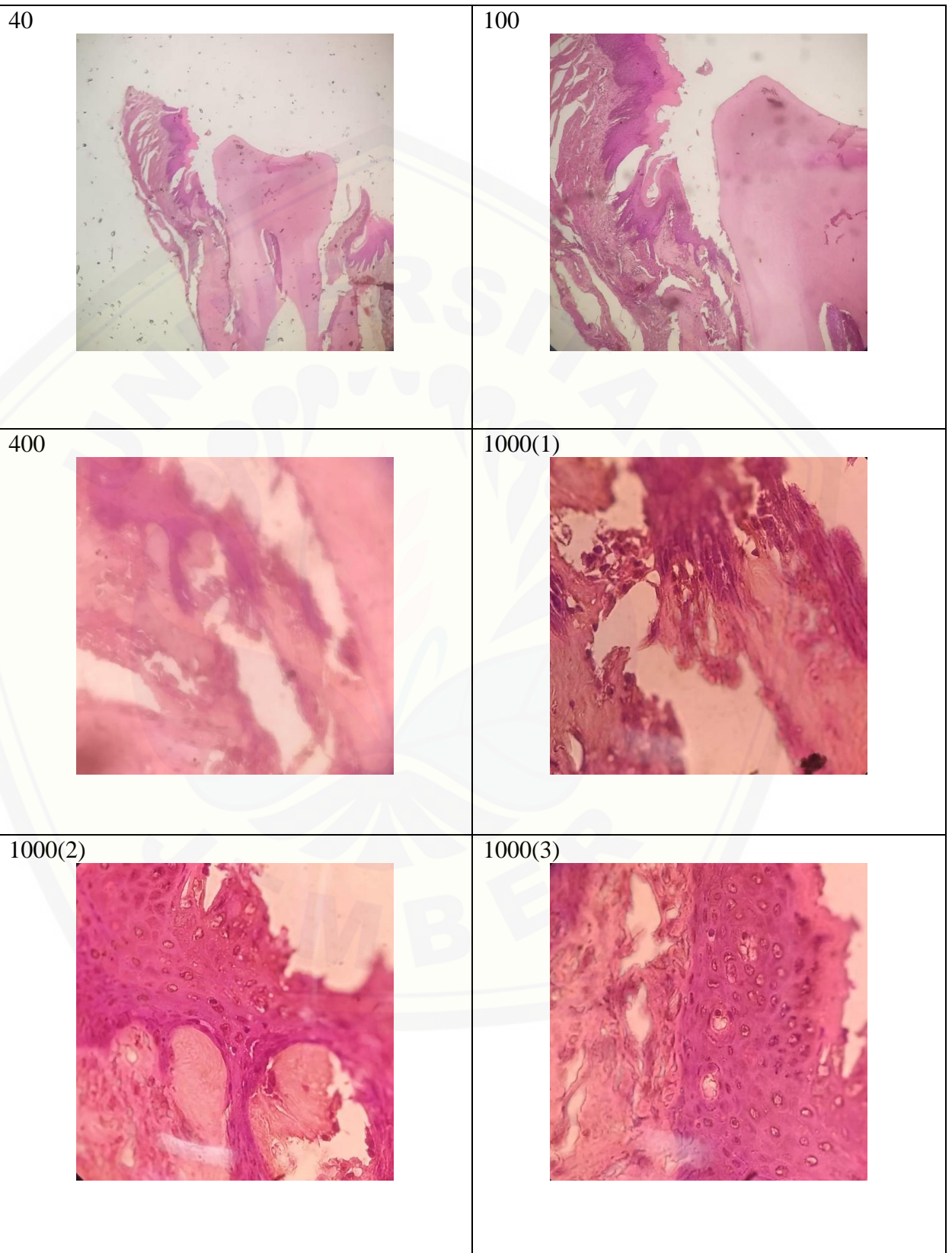


Gambaran Histologi Hari ketiga perlakuan menggunakan gel konsentrasi 60%

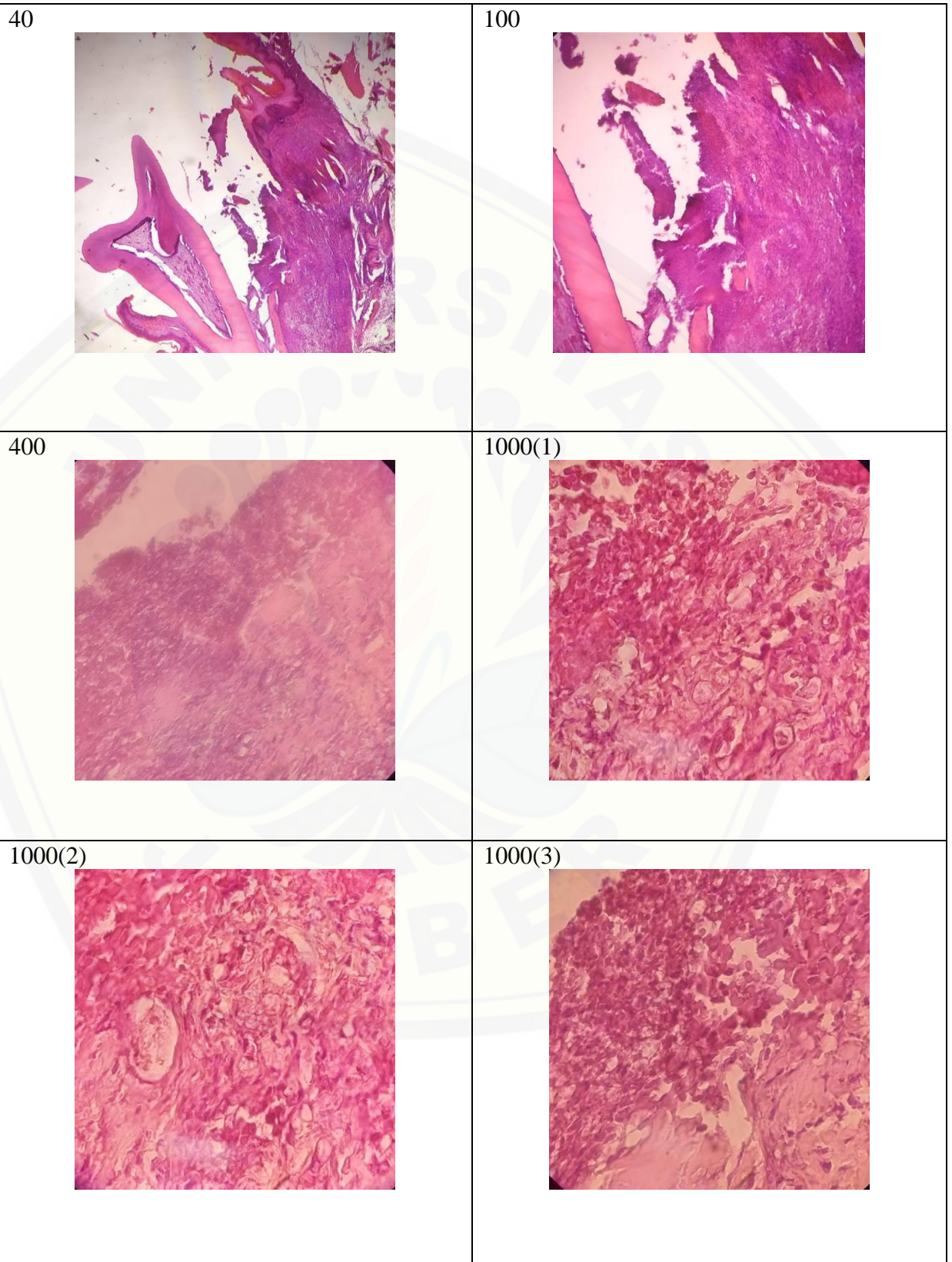
Sampel 1



Sampel 2

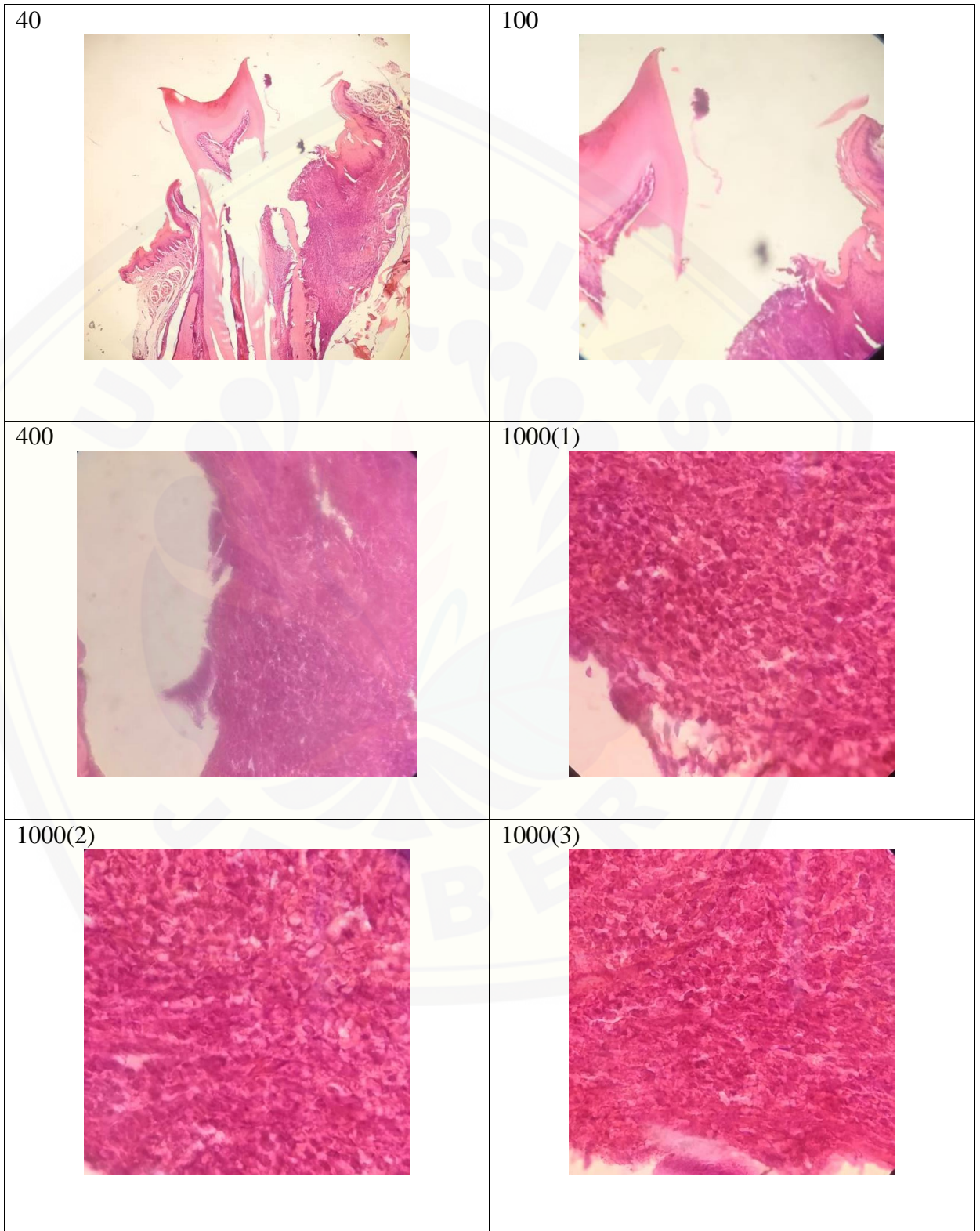


Sampel 3



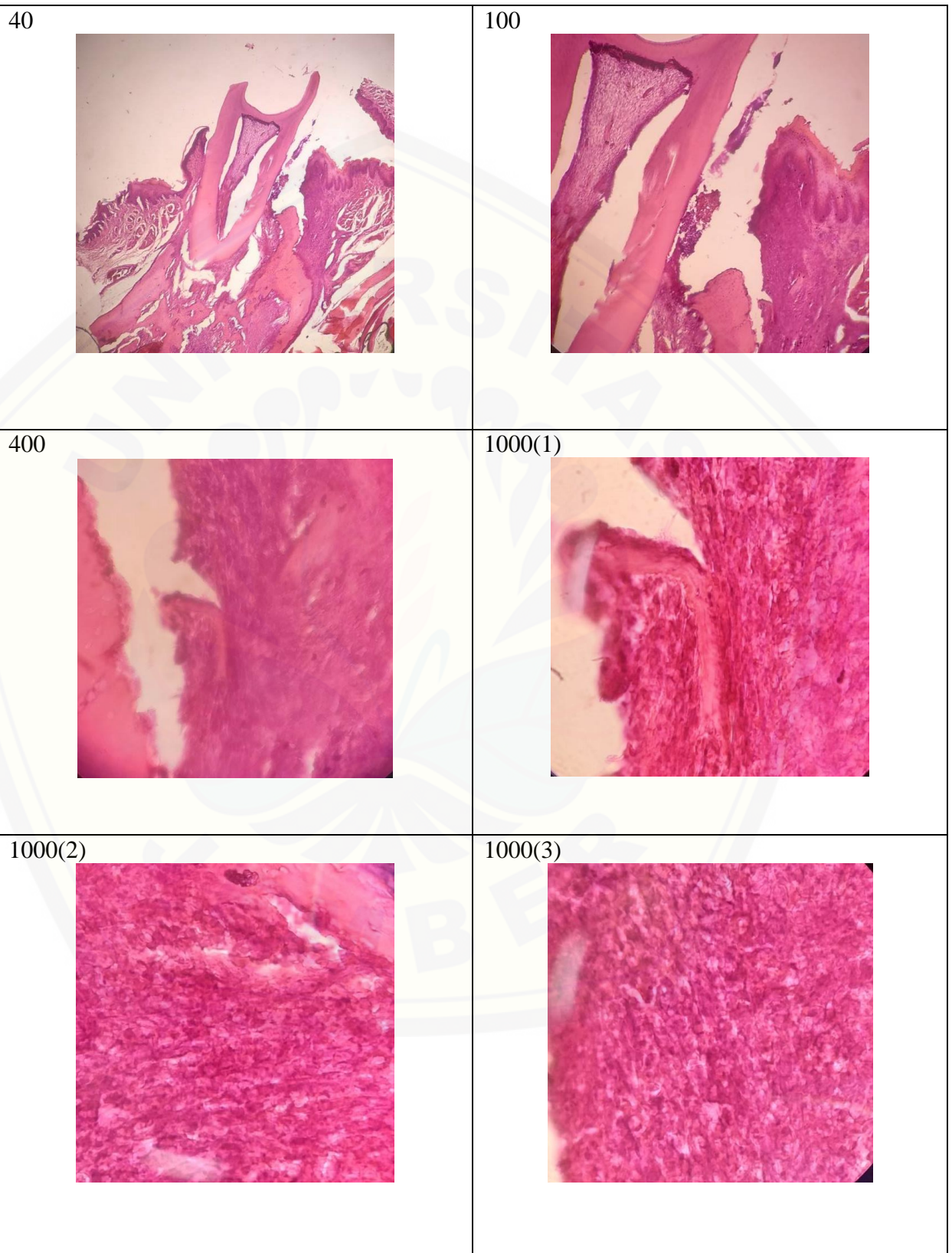
Gambaran histologi hari ketujuh kontrol negatif

Sampel 1

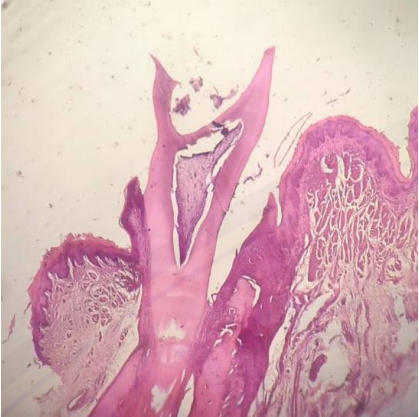
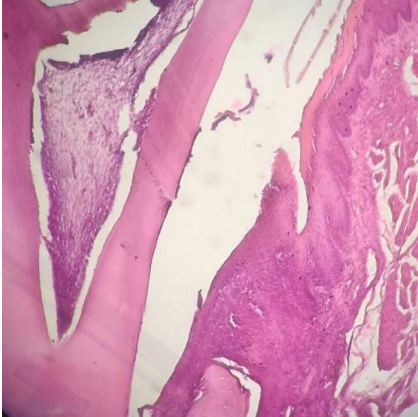
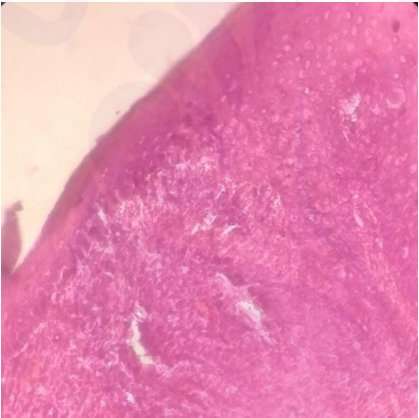
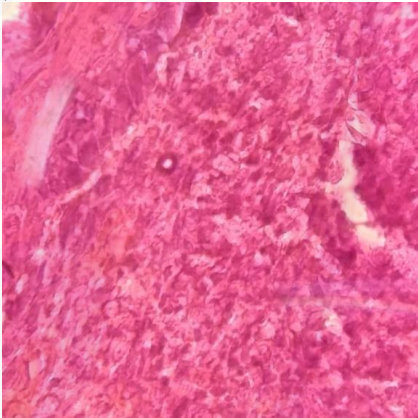
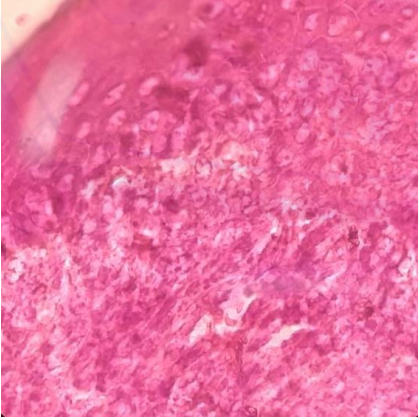
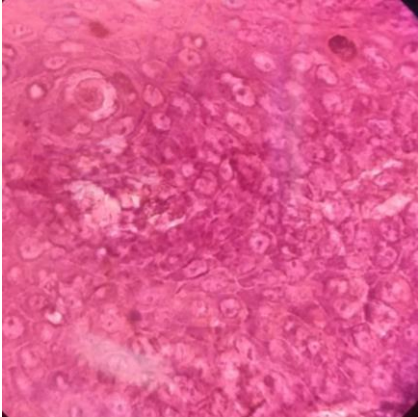




Sampel 2

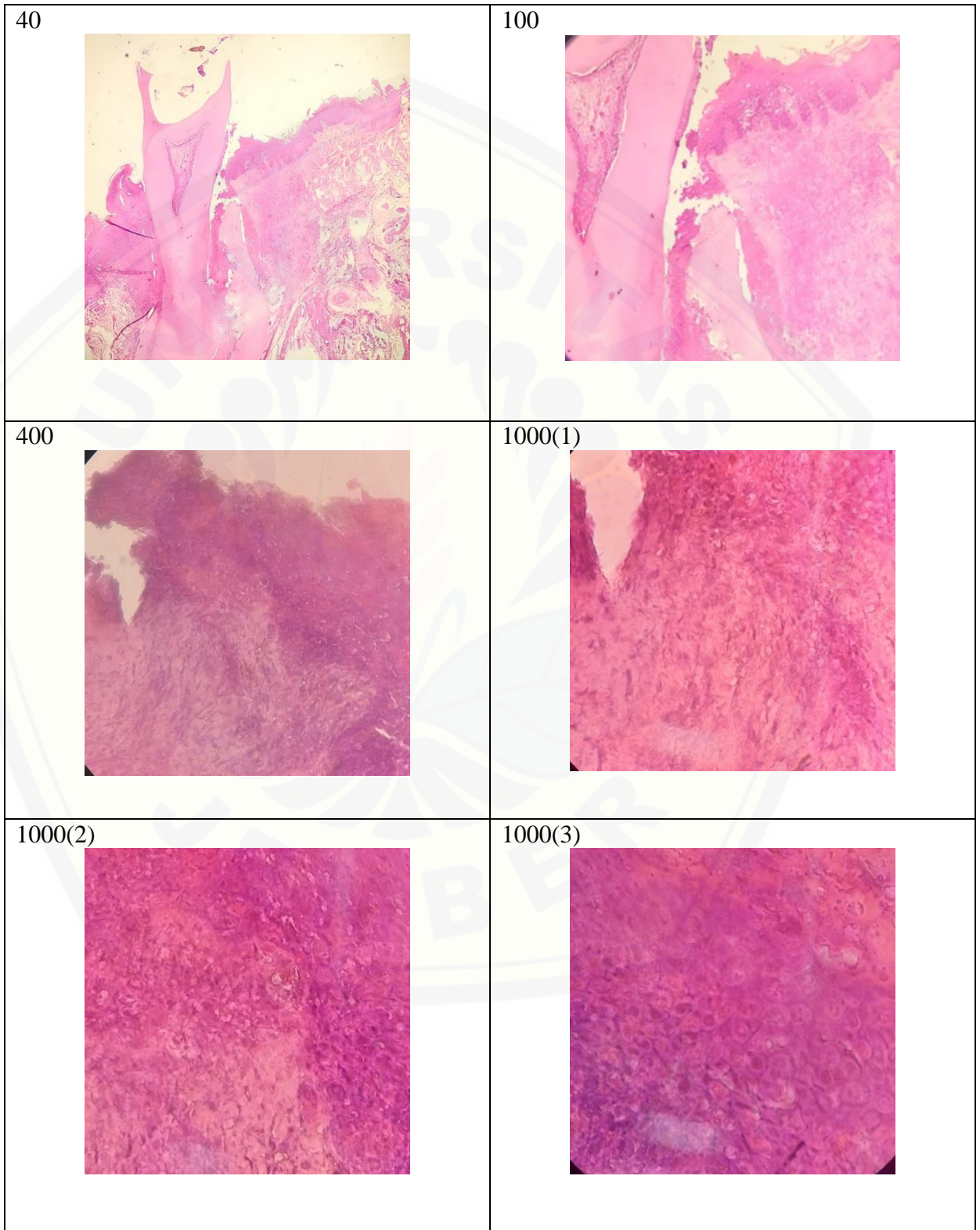


Sampel 3

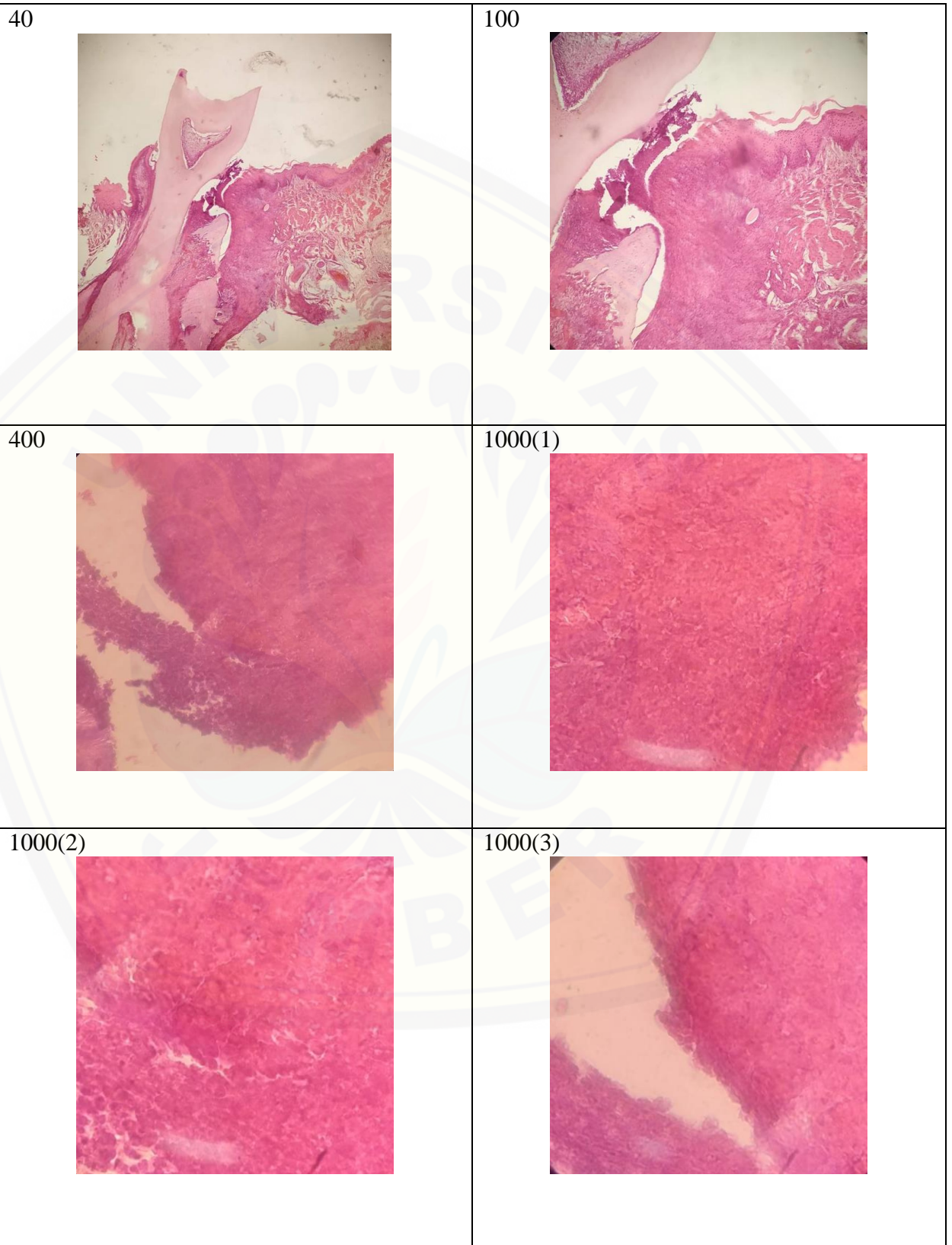
<p>40</p> 	<p>100</p> 
<p>400</p> 	<p>1000(1)</p> 
<p>1000(2)</p> 	<p>1000(3)</p> 

Gambaran histologi hari ketujuh kelompok perlakuan gel konsentrasi 40%


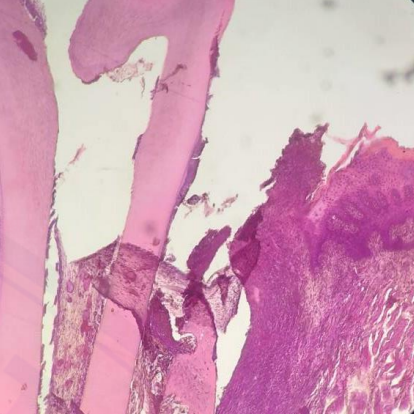
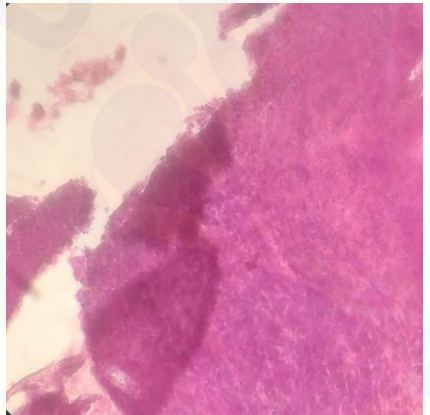
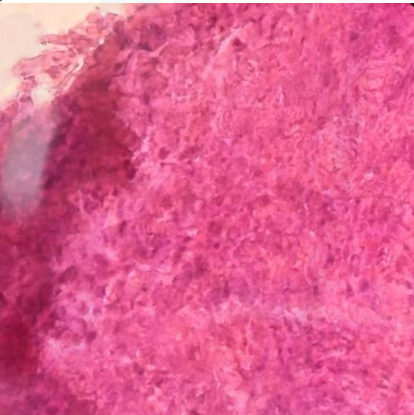
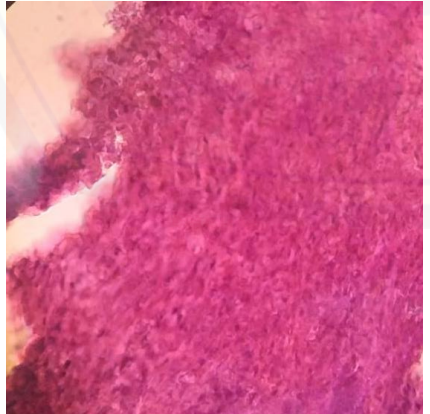

Sampel 1



Sampel 2

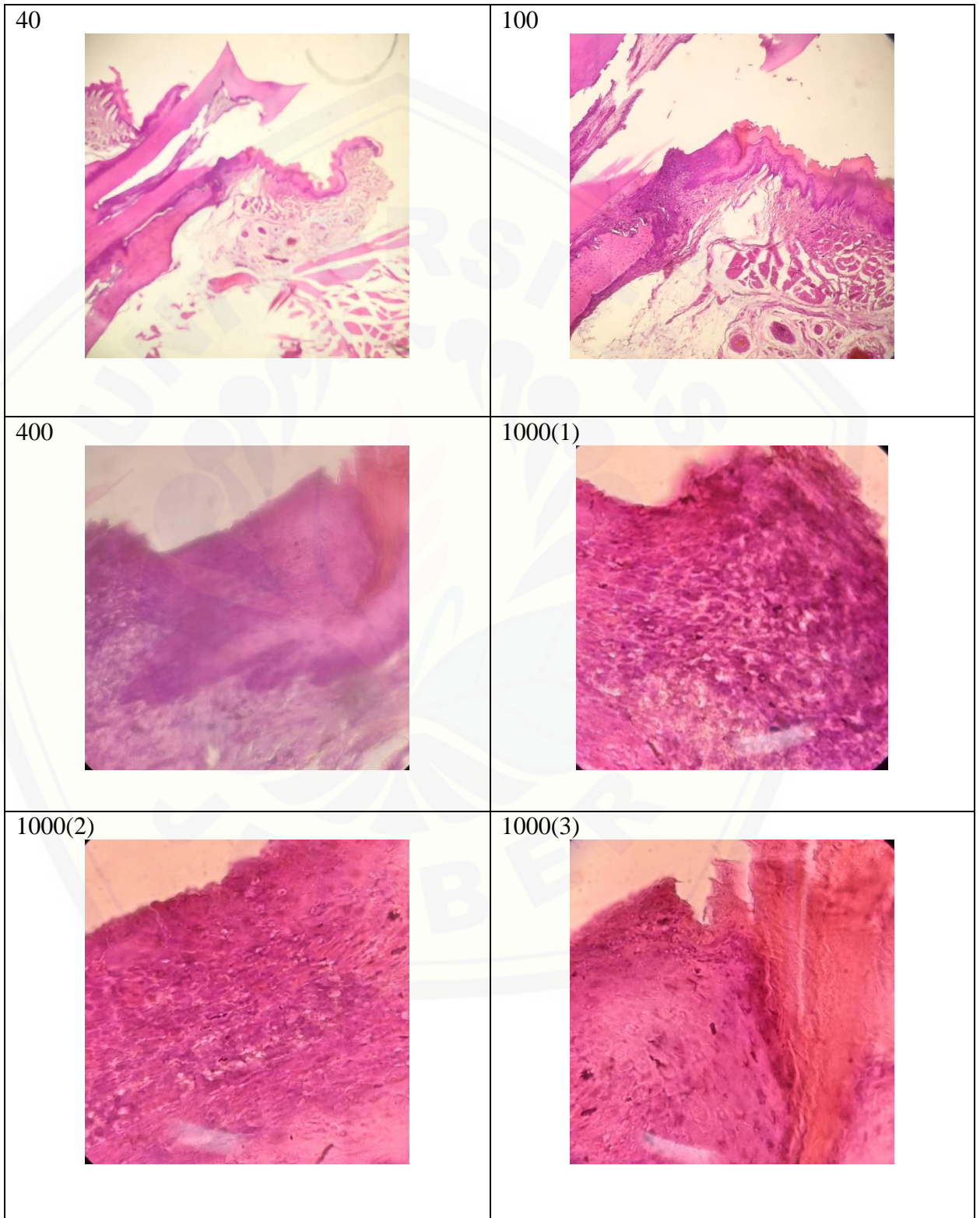


Sampel 3

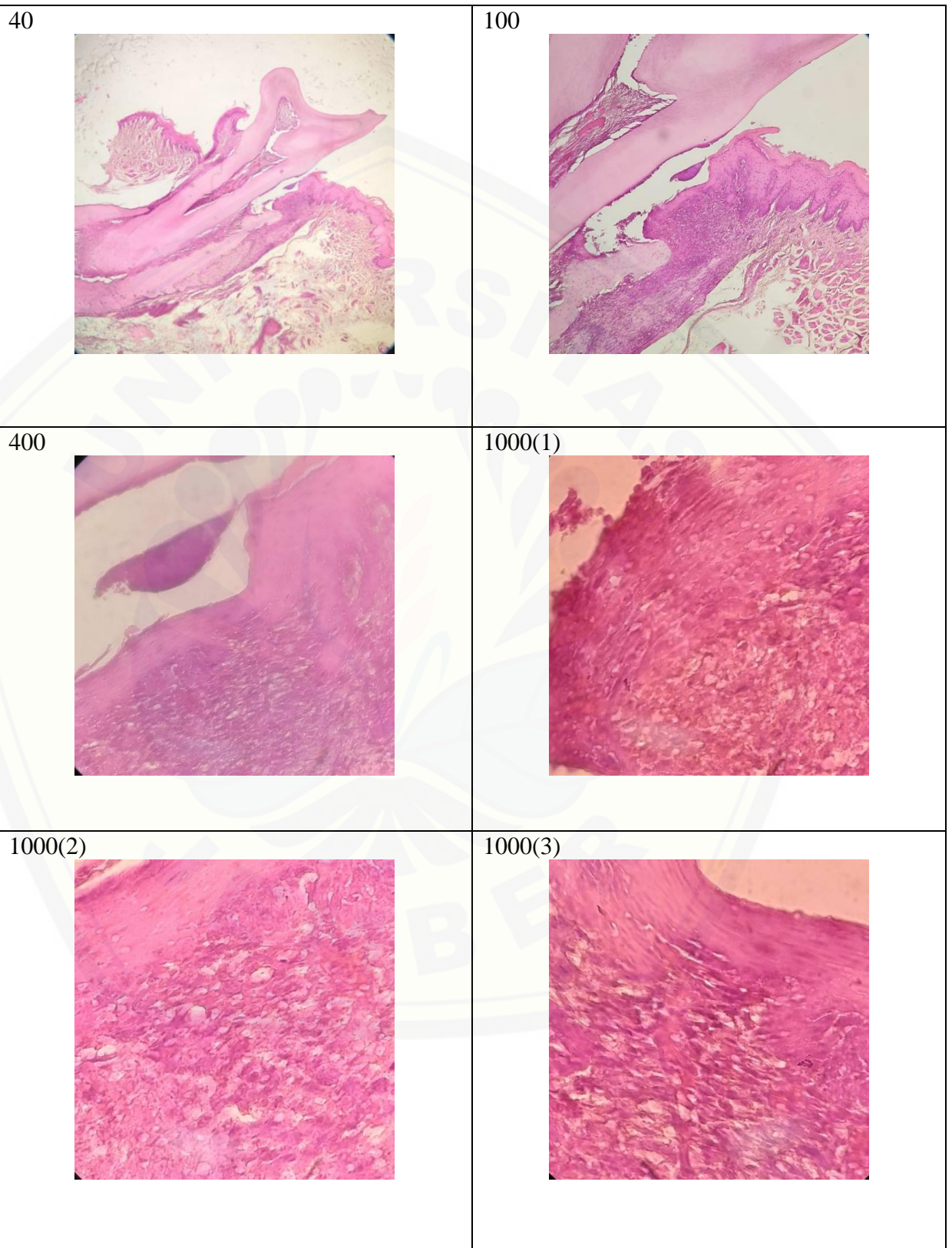
<p>40</p> 	<p>100</p> 
<p>400</p> 	<p>1000(1)</p> 
<p>1000(2)</p> 	<p>1000(3)</p> 

Gambaran histologi hari ketujuh kelompok perlakuan gel konsentrasi 50%

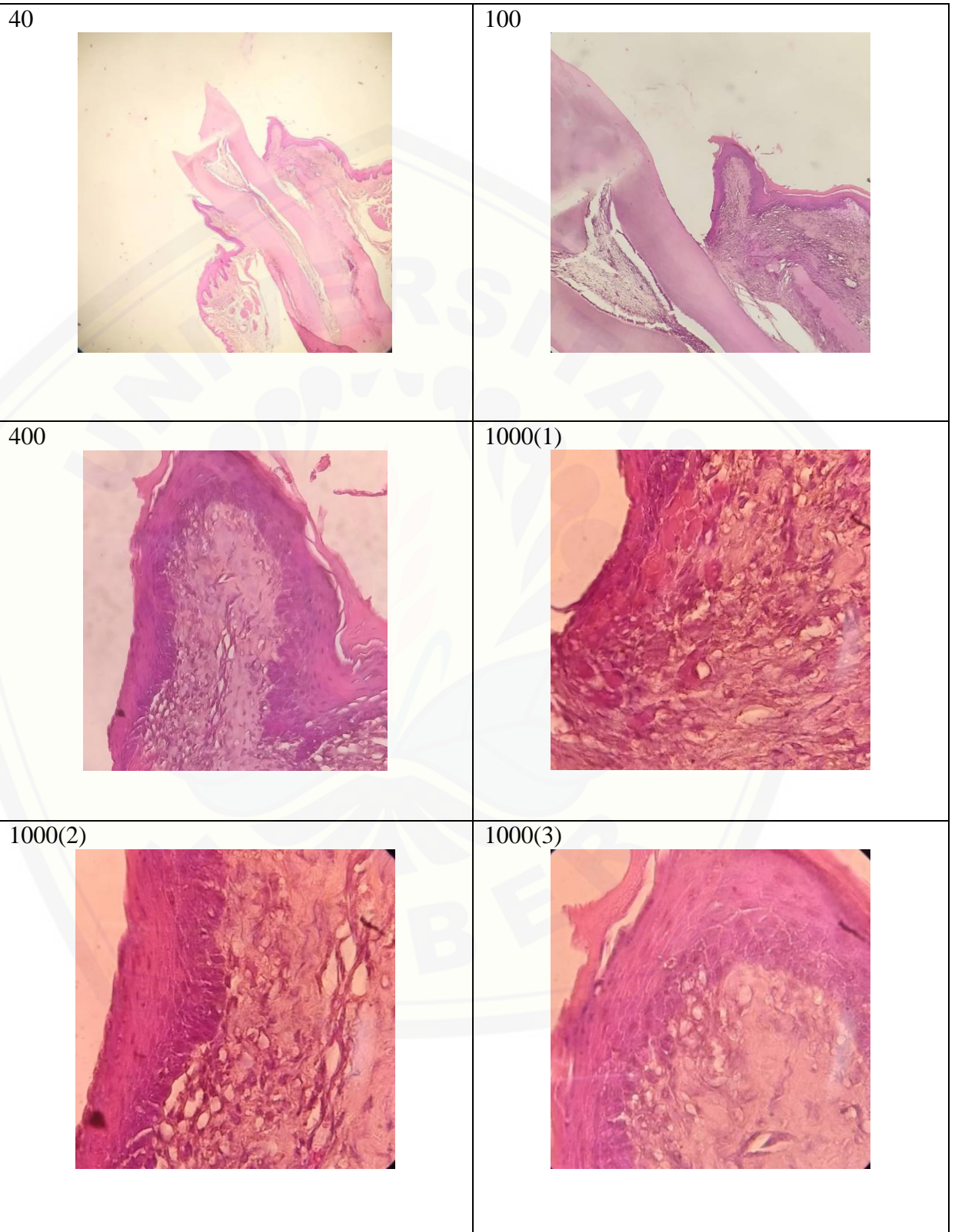
Sampel 1



Sampel 2



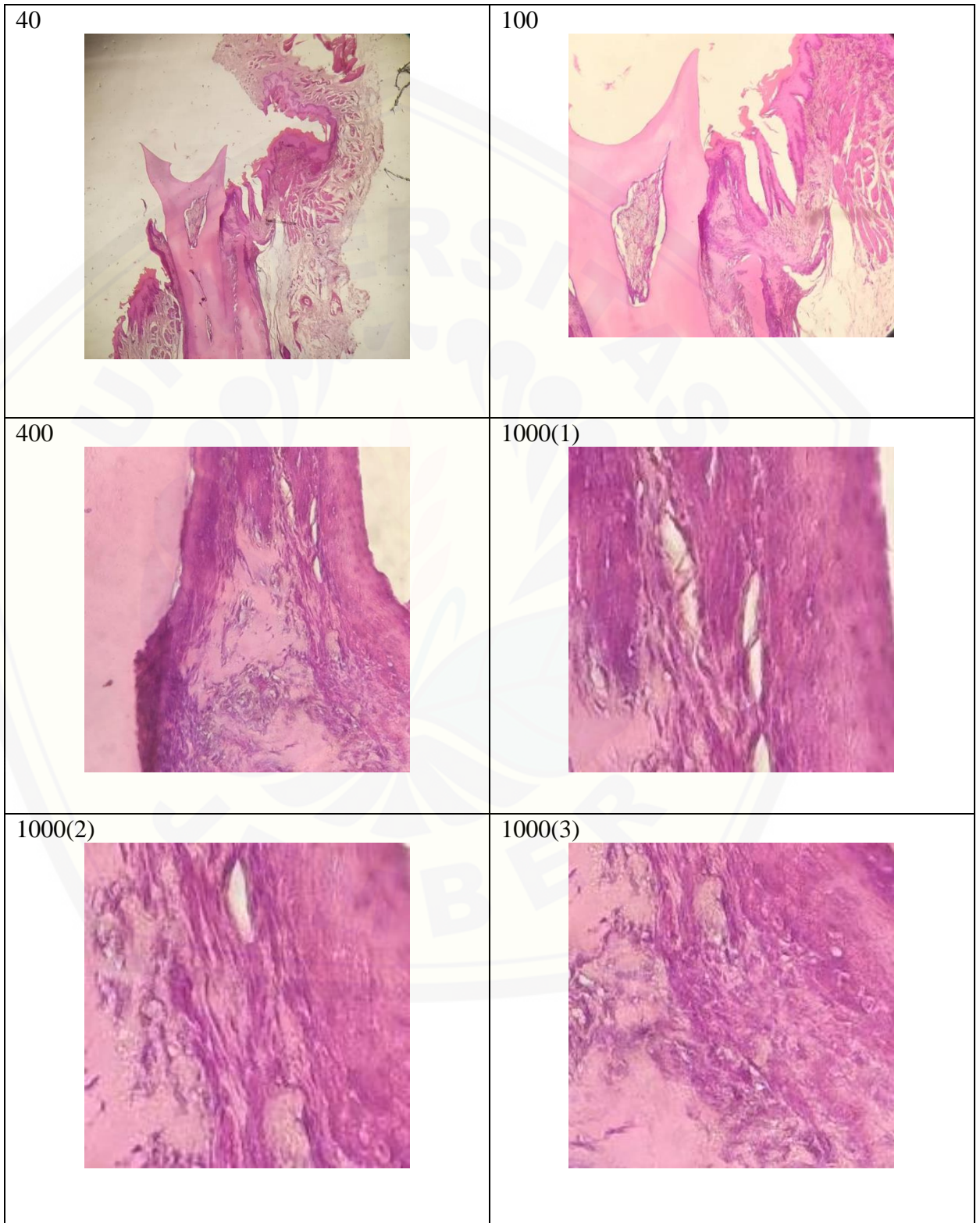
Sampel 3



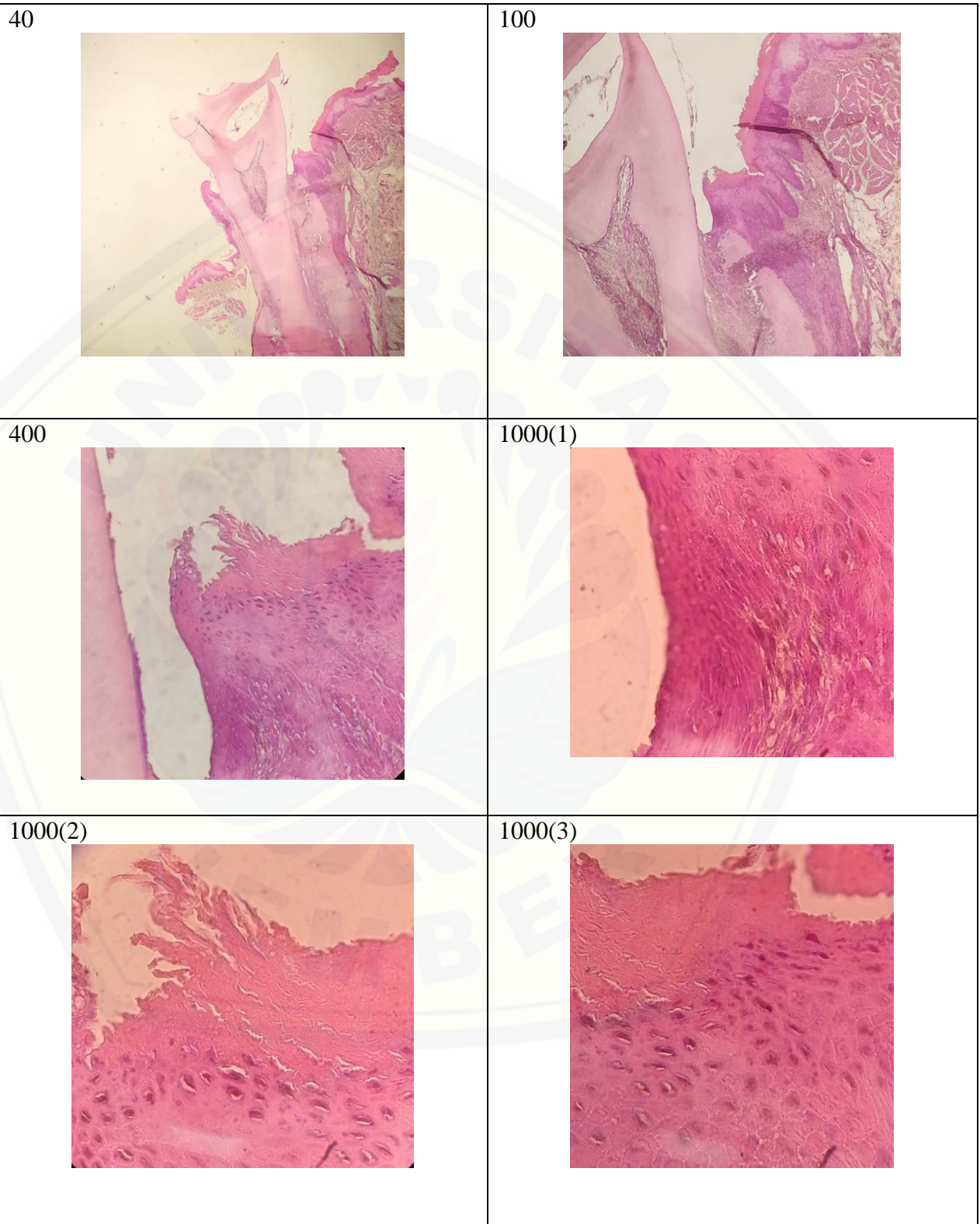


Gambaran histologi hari ketujuh kelompok perlakuan gel konsentrasi 60%

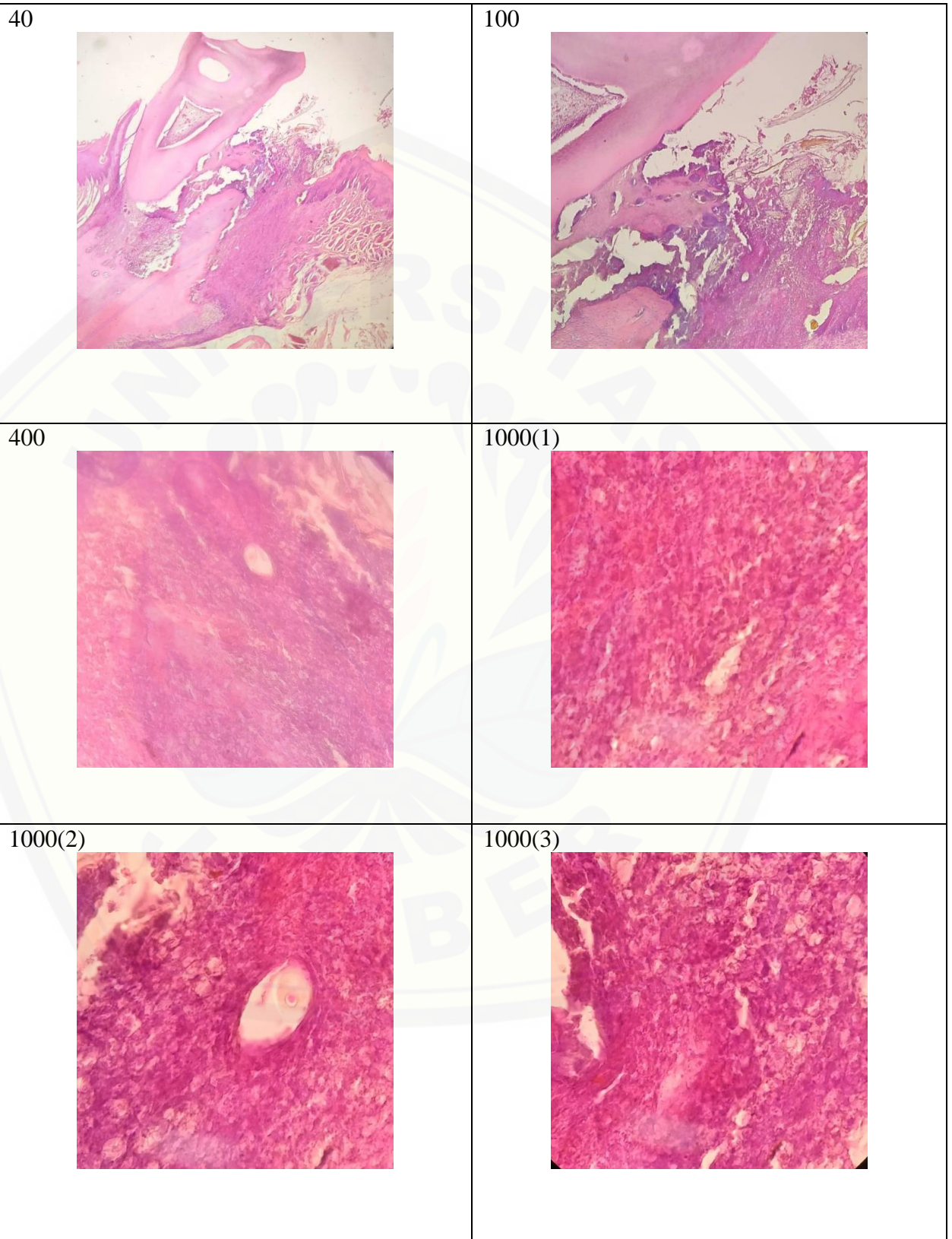
Sampel 1



Sampel 2



Sampel 3



## K. Rata- rata dan Standar Deviasi Jumlah Pembuluh Darah

SAMPEL	Pengamat 1			Pengamat 2			Pengamat 3			RATA-RATA	Rata-Rata Tiap Kelompok
	Lapang Pandang			Lapang Pandang			Lapang Pandang				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
Kontrol H-3 (I)	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0,3	0,444
Kontrol H-3 (II)	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0,4	
Kontrol H-3 (III)	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0,6	
Perlakuan 40% H-3 (I)	2	1	3	2	1	2	1	2	1	1,7	1,704
Perlakuan 40% H-3 (II)	3	1	1	2	1	1	2	2	1	1,6	
Perlakuan 40% H-3 (III)	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1,9	
Perlakuan 50% H-3 (I)	2	3	2	1	2	3	2	2	3	2,2	2,333
Perlakuan 50% H-3 (II)	3	3	2	3	2	3	2	2	2	2,4	
Perlakuan 50% H-3 (III)	3	2	2	3	2	3	2	2	2	2,3	
Perlakuan 60% H-3 (I)	2	1	2	1	2	1	1	2	1	1,4	1,333
Perlakuan 60% H-3 (II)	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1,3	
Perlakuan 60% H-3 (III)	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1,2	
Kontrol H-7 (I)	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0,9	1,000
Kontrol H-7 (II)	1	1	0	1	2	1	0	1	2	1,0	
Kontrol H-7 (III)	1	2	1	1	0	2	1	1	1	1,1	
Perlakuan 40% H-7 (I)	2	2	3	2	2	2	2	2	3	2,2	2,333
Perlakuan 40% H-7 (II)	3	2	2	2	3	2	2	2	3	2,3	
Perlakuan 40% H-7 (III)	2	2	3	3	2	2	3	2	3	2,4	
Perlakuan 50% H-7 (I)	4	2	3	4	2	3	4	3	3	3,1	3,370
Perlakuan 50% H-7 (II)	4	4	5	3	3	4	4	3	2	3,6	
Perlakuan 50% H-7 (III)	4	3	4	4	2	4	3	4	3	3,4	

Perlakuan 60% H-7 (I)	2	1	3	2	1	2	2	2	1	1,8	1,667
Perlakuan 60% H-7 (II)	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1,7	
Perlakuan 60% H-7 (III)	1	1	2	1	2	2	1	2	2	1,6	

	Hari Ketiga	Hari Ketujuh
Kelompok	Mean	Mean
K-	0,444 ± 0,111	1 ± 0,111
40%	1,704 ± 0,111	2,333 ± 0,111
50%	2,333 ± 0,174	3,37 ± 0,231
60%	1,333 ± 0,111	1,667 ± 0,111

## L. Analisis Data

## Uji Normalitas Data

**Tests of Normality**

	Kelompo k	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
jumlah pd	H3 K-	,253	3	.	,964	3	,637
	H3 40%	,253	3	.	,964	3	,637
	H3 50%	,175	3	.	1,000	3	1,000
	H3 60%	,175	3	.	1,000	3	1,000
	H7 K-	,175	3	.	1,000	3	1,000
	H7 40%	,175	3	.	1,000	3	1,000
	H7 50%	,219	3	.	,987	3	,780
	H7 60%	,175	3	.	1,000	3	1,000

## a. Lilliefors Significance Correction

## Uji Homogenitas

**Homogeneity of Variances**

jumlah pd

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,917	7	16	,518

## Uji Anova

**ANOVA**

jumlah pd

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17,153	7	2,450	122,524	,000
Within Groups	,320	16	,020		
Total	17,473	23			

## Uji LSD

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: jumlah pd

LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
H3 K-	H3 40%	-1,30000*	,11547	,000	-1,5448	-1,0552
	H3 50%	-1,86667*	,11547	,000	-2,1115	-1,6219
	H3 60%	-,86667*	,11547	,000	-1,1115	-,6219
	H7 K-	-,56667*	,11547	,000	-,8115	-,3219
	H7 40%	-1,86667*	,11547	,000	-2,1115	-1,6219
	H7 50%	-2,93333*	,11547	,000	-3,1781	-2,6885
	H7 60%	-1,26667*	,11547	,000	-1,5115	-1,0219
H3 40%	H3 K-	1,30000*	,11547	,000	1,0552	1,5448
	H3 50%	-,56667*	,11547	,000	-,8115	-,3219
	H3 60%	,43333*	,11547	,002	,1885	,6781
	H7 K-	,73333*	,11547	,000	,4885	,9781
	H7 40%	-,56667*	,11547	,000	-,8115	-,3219
	H7 50%	-1,63333*	,11547	,000	-1,8781	-1,3885
	H7 60%	,03333	,11547	,777	-,2115	,2781
H3 50%	H3 K-	1,86667*	,11547	,000	1,6219	2,1115
	H3 40%	,56667*	,11547	,000	,3219	,8115
	H3 60%	1,00000*	,11547	,000	,7552	1,2448
	H7 K-	1,30000*	,11547	,000	1,0552	1,5448
	H7 40%	,00000	,11547	1,000	-,2448	,2448
	H7 50%	-1,06667*	,11547	,000	-1,3115	-,8219
	H7 60%	,60000*	,11547	,000	,3552	,8448
H3 60%	H3 K-	,86667*	,11547	,000	,6219	1,1115
	H3 40%	-,43333*	,11547	,002	-,6781	-,1885
	H3 50%	-1,00000*	,11547	,000	-1,2448	-,7552
	H7 K-	,30000*	,11547	,019	,0552	,5448
	H7 40%	-1,00000*	,11547	,000	-1,2448	-,7552
	H7 50%	-2,06667*	,11547	,000	-2,3115	-1,8219
	H7 60%	-,40000*	,11547	,003	-,6448	-,1552
H7 K-	H3 K-	,56667*	,11547	,000	,3219	,8115
	H3 40%	-,73333	,11547	,000	-,9781	-,4885
	H3 50%	-1,30000*	,11547	,000	-1,5448	-1,0552
	H3 60%	-,30000*	,11547	,019	-,5448	-,0552
	H7 40%	-1,30000*	,11547	,000	-1,5448	-1,0552

	H7 50%	-2,36667*	,11547	,000	-2,6115	-2,1219
	H7 60%	-,70000*	,11547	,000	-,9448	-,4552
	H3 K-	1,86667*	,11547	,000	1,6219	2,1115
	H3 40%	,56667*	,11547	,000	,3219	,8115
	H3 50%	,00000	,11547	1,000	-,2448	,2448
H7 40%	H3 60%	1,00000*	,11547	,000	,7552	1,2448
	H7 K-	1,30000*	,11547	,000	1,0552	1,5448
	H7 50%	-1,06667*	,11547	,000	-1,3115	-,8219
	H7 60%	,60000*	,11547	,000	,3552	,8448
	H3 K-	2,93333*	,11547	,000	2,6885	3,1781
	H3 40%	1,63333*	,11547	,000	1,3885	1,8781
	H3 50%	1,06667*	,11547	,000	,8219	1,3115
H7 50%	H3 60%	2,06667*	,11547	,000	1,8219	2,3115
	H7 K-	2,36667*	,11547	,000	2,1219	2,6115
	H7 40%	1,06667*	,11547	,000	,8219	1,3115
	H7 60%	1,66667*	,11547	,000	1,4219	1,9115
	H3 K-	1,26667*	,11547	,000	1,0219	1,5115
	H3 40%	-,03333	,11547	,777	-,2781	,2115
	H3 50%	-,60000*	,11547	,000	-,8448	-,3552
H7 60%	H3 60%	,40000*	,11547	,003	,1552	,6448
	H7 K-	,70000*	,11547	,000	,4552	,9448
	H7 40%	-,60000*	,11547	,000	-,8448	-,3552
	H7 50%	-1,66667*	,11547	,000	-1,9115	-1,4219

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