



**POTENSI EKSTRAK POLIFENOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea robusta*)
TERHADAP EKSPRESI COX-2 PADA SEL NEUTROFIL Secara *in vitro***

SKRIPSI

Oleh :

QURROTULAINI WAHYU PRATIWI

141610101035

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**POTENSI EKSTRAK POLIFENOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea robusta*)
TERHADAP EKSPRESI COX-2 PADA SEL NEUTROFIL Secara *in vitro***

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 :

QURROTULAINI WAHYU PRATIWI

141610101035

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT, atas segala limpahan rahmat, dan karuniaNya yang teramat besar dan telah menciptakan hambaMu ini dalam agama islam yang sempurna ini.
Segala puji hanyalah kepadaMu .
2. Nabi Muhammad SAW, atas segala tuntutan dan kasihnya kepada sekalian umatnya.
Semoga shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada beliau.
3. Ayahanda Muhamad Jainuri, S.Pd dan Ibunda Windraning Wahjuni, S.Kep, atas perjuangan, kasih sayang, doa, dan motivasi tiada batas.
4. Adik saya Salsabila Alifah yang selalu jadi penyemangat dan pelipur lara.
5. Guru-guru saya dari TK sampai dengan perguruan tinggi. Terimakasih telah banyak memberikan ilmu dan bimbingan.
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang selalu saya banggakan.semoga skripsi ini dapat bermanfaat..

MOTO

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan
(Q.S. Al insyirah : 6)*)

” Barang siapa bertakwa kepada Allah maka Dia akan menjadikan jalan keluar baginya, dan memberinya rizki dari jalan yang tidak ia sangka, dan barang siapa yang bertawakkal kepada Allah maka cukuplah Allah baginya, Sesungguhnya Allah melaksanakan kehendak-Nya, Dia telah menjadikan untuk setiap sesuatu kadarnya”
(Q.S. Ath-Thalaq: 2-3)**

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. Al-,,Aliyy Al-Qur’an dan Terjemahnya. Bandung: CV. Diponegoro.

***) Mushaf Al Qur’an dan Terjemahannya Departemen Agama RI. 2010. Al Qur’an dan Terjemahan Indonesia. Bandung: Diponegoro.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Qurrotulaini Wahyu Pratiwi

Nim : 141610101035

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Potensi Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta Terhadap Ekspresi COX-2 pada Sel Neutrofil secara *in vitro*" adalah benar-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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 09 April 2018
Yang menyatakan,

Qurrotulaini Wahyu Pratiwi
NIM 141610101035

SKRIPSI

**POTENSI EKSTRAK POLIFENOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea robusta*)
TERHADAP EKSPRESI COX-2 PADA SEL NETROFIL SECARA *IN VITRO***

Oleh

Qurrotulaini Wahyu Pratiwi

NIM 141610101035

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Tantin Ermawati, M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta(*Coffea robusta*) Terhadap Ekspresi COX-2 pada Sel Netrofil secara *in vitro*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi pada:

Hari, tanggal : 09 April 2018

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

drg. Pudji Astuti, M.Kes

NIP 196810201996012001

drg. Rendra Christedy, MDSc

NIP 198305312008011003

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

NIP 198005272008122002

drg. Tantin Ermawati, M.Kes

NIP 198003222008122003

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi,

Universitas Jember,

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

NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Potensi Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta Terhadap Ekspresi COX-2 pada Sel Netrofil secara *in vitro*; Qurrotulaini Wahyu Pratiwi, 141610101035; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Inflamasi merupakan respon fisiologis terhadap berbagai rangsangan seperti infeksi dan cedera jaringan. Pada fase seluler awal proses inflamasi, sel pertama yang secara kimia tertarik ke daerah inflamasi adalah neutrofil. Penyebab inflamasi antara lain bakteri, trauma mekanis, zat-zat kimia, dan pengaruh fisika. Bakteri akan menghasilkan suatu endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS) yang merupakan sebuah molekul berukuran besar yang mengandung lipid dan karbohidrat. Enzim siklooksigenase (COX) merupakan enzim yang mengkatalisis pembentukan prostaglandin, suatu mediator inflamasi, dan produk metabolisme asam arakidonat. Ekspresi COX-2 (siklooksigenase-2) meningkat selama proses peradangan akut sebagai respon terhadap rangsangan sitokin. Oleh karena itu, diperlukan bahan alami sebagai obat antiinflamasi dengan efek samping yang minimal. Ekstrak polifenol biji kopi robusta merupakan salah satu antiinflamasi yang berpotensi menghambat ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS.

Tujuan dari penelitian ini sendiri untuk mengetahui potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS *E. coli*. Jenis penelitian yang digunakan yaitu jenis penelitian eksperimental laboratoris *invitro* dan rancangan penelitian ini adalah *The Post Test Only Control Group Design*. Pembuatan ekstrak polifenol biji kopi robusta sendiri menggunakan metode sonikasi dan diencerkan menjadi beberapa konsentrasi yaitu 3,13%, 6,25%, 12,5%, 25%. Sampel yang digunakan yaitu darah perifer orang sehat. Kelompok sampel dibagi menjadi 6 kelompok sampel antara lain. Penghitungan ekspresi COX-2 dilihat menggunakan mikroskop inverted dengan perbesaran 400x.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan ekspresi COX-2 terbesar pada kelompok kontrol negatif yang dipapar LPS, sedangkan pada kelompok perlakuan ekspresi COX-2 terbesar pada konsentrasi 25% dan ekspresi COX-2 terendah pada konsentrasi 3,13%. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak polifenol biji kopi robusta memiliki potensi dalam menghambat ekspresi COX-2 pada sel netrofil yang dipapar LPS *E. coli*. Hasil uji beda *One Way Anova* menunjukkan bahwa jumlah ekspresi COX-2 pada semua kelompok menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ditunjukkan dengan nilai signifikansinya 0,000 ($p < 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji LSD, hasil uji LSD menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan semua kelompok.

Penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak polifenol biji kopi robusta mampu menghambat ekspresi COX-2 pada sel neutrofil yang dipapar LPS *E.coli* dan ekstrak polifenol biji kopi robusta dapat berperan sebagai suatu antiinflamasi.

PRAKATA

Puji syukur Alhamdulillah kehadiran Allah SWT karena atas rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Potensi Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap Ekspresi COX-2 pada Sel Netrofil secara *in vitro*" sebagai persyaratan menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes, selaku dosen pembimbing utama dan drg.Tantin Ermawati, M.Kes., selaku dosen pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, perhatian, serta kesabarannya dalam memberikan bimbingan, semangat, dan petunjuk sehingga terselesaikannya penulisan skripsi ini;
2. drg. Pudji Astuti, M.Kes., selaku dosen penguji utama dan drg. Rendra Chriestedy, M.DSc., selaku dosen penguji anggota yang telah banyak memberikan saran dan bimbingan guna kesempurnaan penulisan skripsi ini;
3. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp. Pros selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
4. Kedua orangtuaku Bapak Muhamad Jainuri dan Ibu Windraning Wahjuni yang selama ini telah memberikan kasih sayang, semangat, dukungan dan doa yang tidak pernah putus;
5. Teknisi Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Pak Erwan dan Mbak Azizah, terima kasih atas bantuannya;
6. Teknisi Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember Bu Wahyu terima kasih atas bantuannya;
7. Staf Akademik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;

8. Teman-teman Genk Montik Fisca, Becit, Chibi, Nesya, Bonsky yang senantiasa tiada henti menghibur, menemani, dan selalu memberikan support;
9. Teman seperjuangan dalam penelitian Anisa Nur Hakima ,Nico Natanael, dan Sandy yang selalu kompak,menemani,membantu, dan menghibur ;
10. Rekan yang membantu merapikan skripsi ini
11. Teman-teman angkatan 2014 yang selalu kompak, terimakasih kerjasama dan dukungannya;
12. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini.Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.Amin.

Jember, 09 April 2018

Penulis

DAFTAR ISI

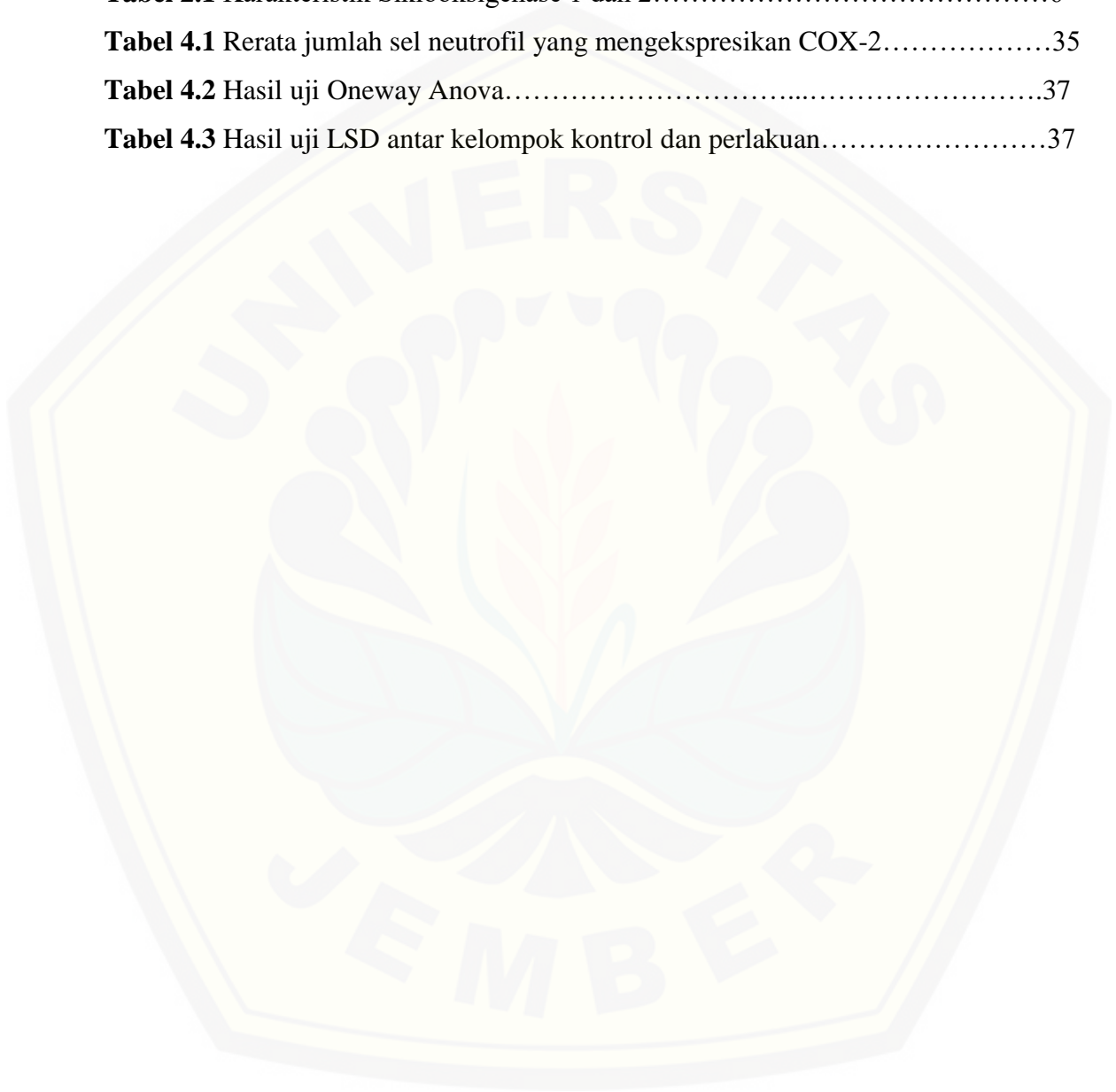
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Inflamasi.....	4
2.2 Siklooksigenase (COX)- 2	4
2.3 Neutrofil	6
2.3.1 Morfologi Neutrofil.....	7
2.3.2 Fagositosis.....	8
2.4 Lipopolisakarida (LPS)	10
2.5 Kopi	11
2.5.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta	11

2.5.2 Kandungan Kimia Kopi Robusta	11
2.5.3 Senyawa Polifenol Kopi Robusta	12
2.5.4 Struktur dan Klas Polifenol.....	14
2.5.5 Polifenol dan Penyakit pada Manusia	16
2.6 Kerangka Konseptual Penelitian	19
2.6.1 Penjelasan Kerangka Konsep.....	19
2.7 Hipotesis.....	20
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....	21
3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	21
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	21
3.3 Identifikasi Variabel Penelitian.....	21
3.3.1 Variabel Bebas	21
3.3.2 Variabel Terikat	21
3.3.3 Variabel Terkendali.....	22
3.4. Definisi Operasional Penelitian.....	22
3.4.1 Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta.....	22
3.4.2 Neutrofil	22
3.4.3 Lipopolisakarida E. Coli 0111 : B4 (List Biology Lab) .	22
3.4.4 COX-2.....	22
3.5 Sampel Penelitian.....	23
3.5.1 Kriteria Sampel	23
3.5.2 Jumlah Sampel	23
3.5.3 Penggolongan Sampel Penelitian.....	23
3.6 Alat dan Bahan.....	24
3.6.1 Alat Penelitian.....	24
3.6.2 Bahan Penelitian.....	24
3.7 Prosedur Penelitian.....	24
3.7.1 Sterilisasi Alat	24
3.7.2 Persiapan Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta	25

3.7.3 Pembuatan RPMI dan Medium Complex.	27
3.7.4 Isolasi Neutrofil.....	27
3.7.5 Inkubasi neutrofil Dengan Ekstrak	28
3.7.6 Pemaparan LPS E. Coli 0111 : B4 (List Biology Lab)...	28
3.7.7 Pewarnaan Imunositokimia (ICC)	29
3.7.8 Penghitungan Ekspresi COX-2 pada sel neutrofil	29
3.8 Analisis Data	30
3.9 Alur Penelitian	31
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Hasil Penelitian dan Pembahasan.....	32
4.2 Pembahasan.....	38
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	42
5.1 Kesimpulan	42
4.2 Saran..	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Karakteristik Siklooksigenase 1 dan 2.....	6
Tabel 4.1 Rerata jumlah sel neutrofil yang mengekspresikan COX-2.....	35
Tabel 4.2 Hasil uji Oneway Anova.....	37
Tabel 4.3 Hasil uji LSD antar kelompok kontrol dan perlakuan.....	37



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Gambaran Netrofil Batang.....	7
Gambar 2.2 Gambaran Netrofil Segmen.....	8
Gambar 2.3 Polifenol sebagai agen perlindungan.....	13
Gambar 2.4 Kelompok Polifenol dan Struktur Kimianya.....	15
Gambar 2.5 Kerangka Konseptual.....	19
Gambar 3.1 Alur Penelitian.....	31
Gambar 4.1 Kontrol Negatif	32
Gambar 4.2 Kontrol Positif	33
Gambar 4.3 Kelompok Konsentrasi 3,13%	33
Gambar 4.4 Kelompok Konsentrasi 6,25%	34
Gambar 4.5 Kelompok Konsentrasi 12,5%	34
Gambar 4.6 Kelompok Konsentrasi 25%	35
Gambar 4.7 Histogram dari rerata sel neutrofil yang mengekspresikan COX-2.....	36

DAFTAR LAMPIRAN

A. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman <i>Coffea robusta</i>	43
B. Ethical clearance.....	44
C. Inform Consent.....	45
D. Alat dan Bahan Penelitian.....	46
E. Hasil Perhitungan Ekspresi COX-2.....	50
F. Hasil Foto Penelitian.....	51
G. Hasil Uji Statistik.....	54
1. Hasil Uji Normalitas <i>Kolmogrov-Smirnov</i>	54
2. Hasil Uji Homogenitas <i>Levene test</i>	54
3. Hasil Uji Beda <i>One Way Anova</i>	54
4. Hasil Uji LSD.....	55

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflamasi merupakan respon fisiologis terhadap berbagai rangsangan seperti infeksi dan cedera jaringan (Garna & Iris, 2010). Pada fase seluler awal proses inflamasi, sel pertama yang secara kimia tertarik ke daerah inflamasi adalah neutrofil. Peningkatan permeabilitas vaskular, vasodilatasi, pembentukan edema dan rasa nyeri pada proses inflamasi ini disebabkan adanya pengaruh prostaglandin sebagai mediator radang. Walaupun proses inflamasi mengurangi aktivitas mikroorganisme yang patogen, namun inflamasi yang berlebihan juga dapat menimbulkan kerusakan jaringan (Robbins & Kumar, 2007).

Penyebab inflamasi antara lain bakteri, trauma mekanis, zat-zat kimia, dan pengaruh fisika (Soleha & Yudistira, 2015). Bakteri akan menghasilkan suatu endotoksin berupa lipopolisakarida (LPS) yang merupakan sebuah molekul berukuran besar yang mengandung lipid dan karbohidrat. LPS menginduksi diproduksinya faktor lokal yaitu sitokin proinflamatori seperti interleukin 1α (IL- 1α), interleukin-1-beta (IL- 1β), IL-6, TNF- α dan prostaglandin. Peningkatan respon imun tubuh yang terbentuk terhadap paparan LPS menyebabkan aktivasi sel mast, makrofag dan neutrofil untuk melepaskan mediator proinflamasi (Yamamoto, 2010). Lipopolisakarida juga mengikat reseptor CD14/ *toll like reseptor-4* (TLR4) sehingga merangsang pelepasan berbagai sitokin yang berperan sebagai mediator dan mengatur reaksi imun dan inflamasi (Indahyani dkk, 2007).

Enzim siklooksigenase (COX) merupakan enzim yang mengkatalisis pembentukan prostaglandin, suatu mediator inflamasi, dan produk metabolisme asam arakidonat. Terdapat dua isoenzim COX dalam tubuh yaitu COX-1 dan COX-2. Enzim COX-1 secara konstitutif terbentuk dalam berbagai jaringan dan banyak terdapat pada mukosa lambung dan ginjal. Enzim COX-2 tidak terbentuk dalam kondisi normal didalam sel, namun kadarnya dapat meningkat seiring dengan terjadinya inflamasi. Ekspresi COX-2 (siklooksigenase- 2) meningkat selama proses

peradangan akut sebagai respon terhadap rangsangan sitokin dan mitogenik, peningkatan ini terjadi baik di medula spinalis maupun korteks sehingga dapat meningkatkan sensitivitas terhadap nyeri. Ekspresi COX-2 meningkat melalui mekanisme sentral yang memodulasi nyeri hiperalgesia sekunder, maupun melalui mekanisme perifer yang memodulasi nyeri hiperalgesia primer. Penghambatan terhadap COX-2 menyebabkan reaksi nyeri tidak terjadi (Schug, 2005).

Minuman kopi yang saat ini banyak disukai oleh masyarakat luas merupakan minuman yang bermanfaat untuk kesehatan tubuh manusia. Mengonsumsi kopi mempunyai efek yang baik seperti meningkatkan daya kerja aspirin dan penghilang rasa sakit pada bidang medis, kafein yang terdapat pada kopi dimanfaatkan sebagai campuran obat seperti obat flu dan obat asma (Widyotomo dan Mulato, 2007). Hasil studi menunjukkan bahwa asupan kopi memodifikasi berbagai fungsi kekebalan tubuh. Biji kopi robusta secara alami mempunyai kandungan seperti kafein, senyawa fenolik, trigonellin, dan asam khlorogenik yang memiliki aktifitas sebagai anti bakteri dan anti-inflamasi (Ermawati, 2014).

Polifenol adalah metabolit sekunder pada tanaman dan umumnya terlibat dalam pertahanan terhadap radiasi ultraviolet atau invasi oleh patogen. Dalam dekade terakhir, sudah banyak diketahui manfaat polifenol suatu tanaman sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Polifenol dan fenolat pada tanaman membantu meningkatkan efek menguntungkan bagi kesehatan manusia. Polifenol pada tanaman kopi dapat digunakan untuk menghambat perkembangan suatu penyakit seperti kanker, penyakit kardiovaskular, diabetes, osteoporosis dan penyakit neurodegeneratif (Pandey & Rizvi, 2009).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Yunarti (2007) menyatakan bahwa polifenol merupakan antioksidan kuat dan dapat melindungi sel imun dari kerusakan biologis akibat radikal bebas. Polifenol terbukti mampu mencegah peningkatan produksi sitokin inflamasi (IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α) oleh sel makrofag dan limfosit yang teraktivasi oleh radikal bebas. Penelitian pada tikus membuktikan

bahwa polifenol terbukti menurunkan produksi TNF- α . Penelitian lain yang dilakukan oleh Kenisa dkk (2012) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji kopi robusta dapat membantu penyembuhan luka pada hewan coba *Cavia cabaya*. Selain itu polifenol ekstrak biji kopi juga dilaporkan dapat menurunkan histamin, bradikinin dan leukotrin yang menurunkan aktivitas sistem komplemen. Penelitian yang dilakukan oleh Ermawati (2014) menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak biji kopi robusta yang efektif untuk menurunkan produksi TNF- α adalah konsentrasi 25% dibandingkan konsentrasi 50% pada tikus periodontitis dan hal ini ditunjukkan oleh menurunnya ekspresi TNF- α yang lebih sedikit. Berdasarkan penelitian pendahuluan maka penulis akan menggunakan beberapa konsentrasi ekstrak polifenol biji kopi robusta antara lain 25 %, 12,5%, 6,25%, dan 3,13% dengan cara serial dilusi. Peneliti ingin mengetahui potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Bagaimanakah potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS *E. coli*

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Mengetahui potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta terhadap ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS *E. coli*

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Memberikan informasi tentang manfaat biji kopi robusta sebagai agen antiinflamasi

1.4.2 Meningkatkan wawasan dan pengetahuan potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta terhadap ekspresi COX-2 pada sel neutrofil saat dipapar LPS *E. coli*

1.4.3 Memberikan informasi untuk penelitian lebih lanjut tentang manfaat kandungan biji kopi robusta



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Inflamasi

Inflamasi adalah respon fisiologis terhadap infeksi dan cedera jaringan. Radang menginisiasi pembunuhan patogen, proses perbaikan jaringan dan membantu mengembalikan homeostasis pada tempat yang terinfeksi atau cedera. Jika respon antiinflamasi gagal beregulasi, dapat mengakibatkan cedera kronis dan membantu perkembangan penyakit yang terkait (Calder *dkk*, 2009). Inflamasi dapat dibedakan menjadi dua yaitu akut dan kronik. Inflamasi akut mempunyai onset dan durasi yang lebih cepat. Inflamasi akut terjadi dengan durasi waktu beberapa menit sampai beberapa hari, ditandai dengan adanya cairan eksudat protein plasma maupun akumulasi leukosit neutrofilik yang dominan. Inflamasi kronik memiliki durasi yang lebih lama yaitu dalam hitungan hari hingga tahun. Menurut Kumar *et al* (2007) dalam Utami *et al* (2011) tipe inflamasi kronik ditentukan oleh peningkatan jumlah limfosit dan makrofag yang berhubungan dengan proliferasi vaskular dan fibrosis.

2.2 Siklooksigenase (COX)-2

Siklooksigenase (COX)-2 merupakan famili mieloperoksidase yang berada pada sisi luminal dari retikulum endoplasma dan membran nuclear (Fajrin, 2013). Kedua bentukan ini berbeda distribusinya pada jaringan dan juga memiliki fungsi regulasi yang berbeda. COX-1 merupakan enzim konstitutif yang mengkatalisis pembentukan prostanoide regulatoris pada berbagai jaringan, terutama pada selaput lendir traktus gastrointestinal, ginjal, platelet dan epitel pembuluh darah. COX-1 hampir seluruhnya diekspresikan dalam kebanyakan sel dan jaringan. Secara umum, telah diketahui bahwa COX-2 biasanya tidak terdeteksi, tetapi cepat diinduksi apabila sel menerima stimulus inflamasi. COX-2 juga bertindak terutama ditempat yang terjadi reaksi inflamasi (Stables dan Gilroy, 2010; Park et al, 2011).

Parameter	Siklooksigenase-1	Siklooksigenase-2
Ukuran gen	22 kb	8,3 kb
Ekson	11	10
Kromosom	9q32 – q33,3	1q25,2 – q25,3
mRNA	2,8 kb	4,1 kb
Regulasi mRNA	konstitusi	indusibel
Induktor	-	Sitokin, LPS
Jumlah asam amino	599	604
Lokasi	Membran inti	Membran inti
Kofaktor	1 mol Heme	1 mol Heme
Tempat pengikatan asam asetil salisilat	Serin-529	Serin-516
Spesifisitas substrat	Asam arasidonoat, asam linoleat	Asam arasidonoat, asam linoleat, asam eikosapentenoat
Aktivitas	23 mmol asam arasidonoat/mg/menit	11 mmol asam arasidonoat/mg/menit

Tabel 2.1 Karakteristik siklooksigenase 1 dan 2

Siklooksigenase atau prostaglandin H sintetase merupakan enzim utama dalam sintesis prostaglandin (PGE). Menurut Francon dkk (2008) dalam PrasSSetya dkk (2013) siklooksigenase-2 merupakan enzim yang diekspresikan sebagai respon terhadap agen proinflamasi seperti sitokin dan endotoksin. Enzim COX-2 berperan dalam pembentukan prostaglandin yang diikuti proses patofisiologis seperti edema. Pembentukan COX-2 diawali dengan sintase mendonorkan dua molekul oksigen kepada asam arakhidonat untuk sintesis prostaglandin H₂ (PGH₂). Perubahan ini akan membentuk prostaglandin terutama prostaglandin E₂ (PGE₂). Prostaglandin E₂ memiliki peran dalam proses inflamasi yaitu seperti vasodilatasi pembuluh darah, edema dan nyeri.

COX-2 ternyata tidak hanya indusibel melainkan juga konstitutif dan terdapat pada berbagai jaringan. Pada kondisi fisiologis ekspresi konstitutif COX-2 ditemukan dalam jumlah yang sedikit pada ginjal, pembuluh darah, paru-paru, tulang, pankreas, sumsum tulang belakang dan selaput lendir mukosa permukaan lambung (Prasetya, 2015).

Pada dasarnya penyembuhan luka dibagi menjadi 3 tahap yaitu fase inflamasi, fase fibroblastik dan fase remodeling. Pada fase inflamasi ketika terjadi perlukaan maka akan memicu pelepasan mediator inflamasi seperti interleukin-1 dan TNF- α . Interleukin-1 akan menyebabkan membran fosfolipid melepaskan asam arakhidonat

yang nantinya akan mensintesis PGE-2 melalui jalur siklooksigenase yaitu peningkatan ekspresi COX-2. Pada fase ini ditandai dengan infiltrasi sel inflamasi terutama neutrofil. Fase ini akan berlangsung sampai hari ke-3. Penyembuhan dari proses perlukaan ditandai dengan menurunnya produksi prostaglandin dan leukotrin yang diakibatkan dari penghambatan jalur siklooksigenase yaitu COX-2. Penekanan pada prostaglandin akan menyebabkan berkurangnya rasa nyeri, edema dan vasodilatasi pembuluh darah.

Siklooksigenase-2 merupakan bagian dari keluarga siklooksigenase yang berperan dalam proses inflamasi dengan mensintesis prostaglandin yang menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah, edema dan rasa nyeri. Saat ini COX-2 sudah digunakan sebagai indikator penyakit yang disebabkan oleh inflamasi dan aterosklerosis. Dalam proses inflamasi, siklooksigenase-2 memicu pelepasan sitokin pro inflamasi seperti IL-1 dan TNF- α sedangkan dalam proses aterosklerosis COX-2 menyebabkan proliferasi dan migrasi vaskuler sel otot polos (Prasetya, 2015).

2.3 Neutrofil

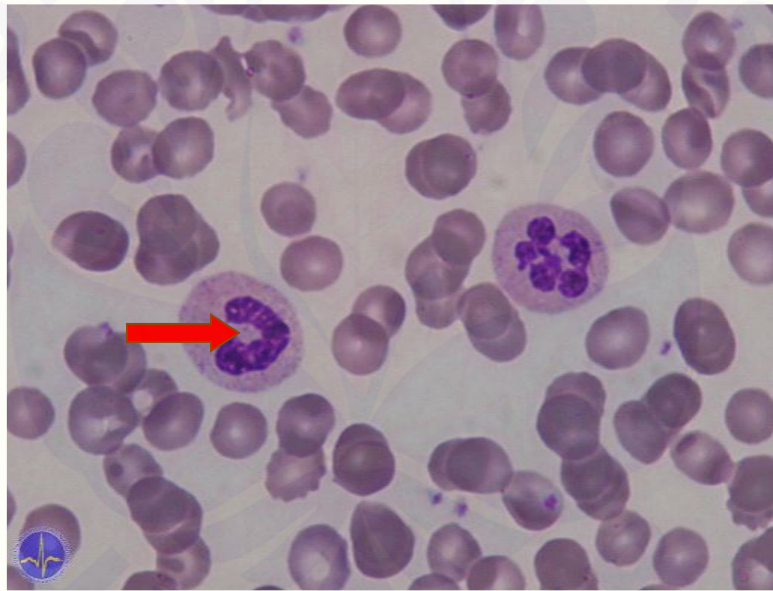
Neutrofil berhubungan dengan pertahanan tubuh terhadap infeksi bakteri dan proses peradangan kecil lainnya, serta menjadi sel yang pertama hadir ketika terjadi infeksi di suatu tempat. Dengan sifat fagositik yang mirip dengan makrofag, neutrofil menyerang patogen dengan serangan respiratori menggunakan berbagai macam substansi beracun yang mengandung bahan pengoksidasi kuat, termasuk hidrogen peroksida, oksigen radikal bebas, dan hipoklorit (Dacie and Lewis, 2001).

Masa hidup neutrofil sesudah dilepaskan dari sumsum tulang normalnya adalah 4 (empat) sampai 8 (delapan) jam dalam darah sirkulasi, dan 4 (empat) sampai 5 (lima) hari berikutnya dalam jaringan yang membutuhkannya (Guyton dan Hall, 2007).

2.3.1 Morfologi Neutrofil

a. Neutrofil batang/ stab

- 1) Ukuran rata-rata 12 μm
- 2) Sitoplasma tidak berwarna penuh dengan granula-granula yang sangat kecil dan berwarna coklat kemerahan sampai merah muda
- 3) Kira-kira 2/3 nya merupakan granula spesifik sedangkan yang 1/3 nya merupakan granula azurofilik (merah biru-ungu)
- 4) Nukleus lebih tebal, berbentuk huruf U dengan kromatin kasar dan rongga parakromatin yang agak jelas batasnya
- 5) Jumlahnya 0-6% dari leukosit total ($0-0,7 \times 10^9/\text{L}$).

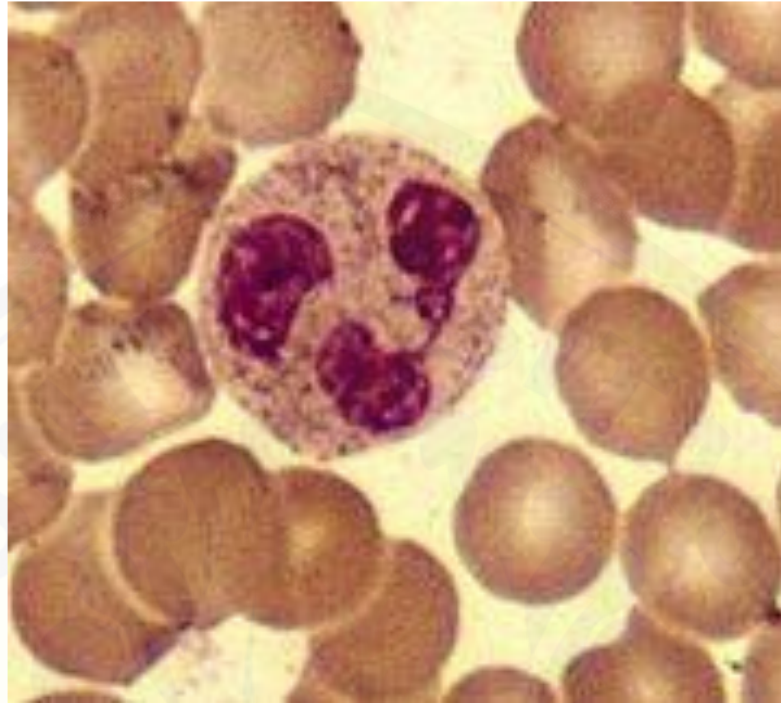


Gambar 2.1 Gambaran Neutrofil batang (Guyton and Hall, 2007)

b. Neutrofil tangkai/segmen

- 1) Ukuran rata-rata 12 μm
- 2) Sitoplasma dan granula sama dengan neutrofil batang
- 3) Nukleus gelap, berbentuk seperti huruf E, Z atau S yang terpisah menjadi segmen-segmen/lobus-lobus yang dihubungkan oleh filament-filamen yang halus. Banyaknya lobus pada neutrofil normal berkisar antara 2-5 lobus, dengan rata-rata tiga lobus.

4) Jumlahnya 40-54% dari leukosit total ($1,3-7,0 \times 10^9/L$)



Gambar 2.2 Neutrofil segmen (Guyton and Hall, 2007)

Manusia dewasa mempunyai sekitar 7000 sel darah putih per mikroliter darah (dibandingkan dengan sel darah merah yang berjumlah 5 juta). Presentase normal dari neutrofil polimorfonuklear dari jumlah total sel darah putih kira-kira 62%. Jumlah ini merupakan jumlah yang terbanyak (Guyton and Hall, 2007). Neutrofil merupakan sel inflamasi dengan oksidatif poten dan potensial proteolitik yang berfungsi sebagai pertahanan pertama terhadap pathogen (Oberholzer et al., 2001). Neutrofil dalam sirkulasi normalnya memiliki masa hidup yang singkat sekitar 24 jam (Remick, 2007).

2.3.2 Fagositosis

Fungsi neutrofil yang terpenting adalah fagositosis. Fagositosis memiliki arti pencernaan seluler terhadap agen yang mengganggu. Sel fagosit harus memilih bahan-bahan yang akan difagositosis, jika tidak demikian, sel normal dan struktur akan dicerna pula. Fagositosis terjadi pada tiga prosedur selektif berikut;

Pertama, sebagian besar struktur alami dalam jaringan yang memiliki permukaan halus dapat menahan fagositosis, tetapi jika permukaannya kasar kecenderungan fagositosis akan meningkat. Kedua, sebagian besar bahan alami tubuh mempunyai selubung protein pelindung yang menolak fagositosis, sedangkan sebagian besar jaringan mati dan partikel asing akan menjadi subjek fagositosis karena tidak memiliki selubung pelindung. Ketiga, sistem imun tubuh membentuk antibodi untuk melawan agen infeksius seperti bakteri. Antibodi kemudian melekat pada membran bakteri dan membuat bakteri menjadi rentan terhadap fagositosis. Molekul antibodi juga bergabung dengan produk C3 dari *kaskade komplemen*, yang merupakan bagian tambahan sistem imun. Molekul C3 kemudian melekatkan diri pada reseptor di atas membran sel fagosit, sehingga mampu memicu fagositosis. Proses seleksi dan fagositosis ini disebut *opsonisasi* (Guyton dan Hall, 2007).

a. Fagositosis Neutrofil

Neutrofil yang memasuki jaringan merupakan sel-sel matur yang dapat segera memulai fagositosis. Sewaktu mendekati suatu partikel untuk difagositosis, mulamula neutrofil meletakkan diri pada partikel kemudian mengeluarkan pseudopodia ke semua jaringan disekeliling partikel. Pseudopodia bertemu satu sama lain pada sisi yang berlawanan dan bergabung. Hal ini menciptakan ruangan yang berisi partikel yang sudah difagositosis, kemudian ruangan ini berinvaginasi ke dalam rongga sitoplasma dan melepaskan diri dari membran sel bagian luar untuk membentuk gelembung fagositik yang mengapung dengan bebas (juga disebut fagosom) di dalam sitoplasma. Sebuah sel neutrofil biasanya dapat memfagositosis 3 (tiga) sampai 20 (dua puluh) bakteri sebelum sel neutrofil itu sendiri menjadi inaktif dan mati (Guyton dan Hall, 2007).

2.4 Lipopolisakarida (LPS)

Struktur dinding sel bakteri gram negatif *Escherichia coli* terdiri dari tiga lapisan yaitu membran sitoplasma, membran luar, dan lapisan di antara keduanya yaitu lapisan tipis peptidoglikan. Membran luar sel terdiri dari lipopolisakarida,

phospholipid dan lipoprotein. Kekompakan lapisan lipopolisakarida (LPS) distabilkan oleh interaksinya dengan ion Ca^{+2} serta ion divalen lainnya. Kestabilan permeabilitas membran sel bakteri ini juga dipengaruhi oleh konsentrasi ion K^{+1} pada cairan sitoplasma. Membran sitoplasma berperan dalam mempertahankan keutuhan struktur sel dan berfungsi dalam transport nutrient secara selektif ke dalam sel. Membran juga tempat terletaknya enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesis dinding sel. Bila membran rusak, maka fungsi sel akan terganggu yang mengakibatkan pertumbuhan sel terhambat atau menjadi mati (Jurnal Ilmiah Indonesia, 2008). Lipopolisakarida (LPS) merupakan salah satu stimulan yang potensial berasal dari dinding sel bakteri Gram negatif. LPS dapat memicu beberapa jenis reaksi peradangan atau infeksi (inflammatory) pada sel makrofag dan sel lainnya. Menurut Beumer (2003), LPS dapat menginduksi produksi dan pelepasan sel-sel radang, seperti *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang dapat menyebabkan reaksi berantai dan menghasilkan senyawa radikal bebas baru dalam jumlah besar yang bersifat sangat toksik dan dapat mengakibatkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel hingga ke organ tubuh. Beberapa penyakit yang telah diteliti dan diduga kuat berkaitan dengan aktivitas radikal bebas diantaranya adalah stroke, asam, diabetes mellitus, dan AIDS (Darwadi dkk, 2013) .

Bakteri gram negatif memiliki lipopolisakarida (LPS) pada dinding selnya. LPS memiliki potensi yang kuat sebagai stimulator inflamasi karena LPS mampu menembus ke dalam jaringan dan bertindak sebagai endotoksin dalam organisme inangnya sehingga menyebabkan peradangan berlanjut dengan terjadinya kerusakan (Kumar dkk, 2007). Beberapa data penelitian terbaru menyebutkan bahwa induksi LPS menyebabkan produksi sitokin yang merupakan mediator proinflamasi pada otak tikus (Ward dkk, 2011).

2.5 Kopi

2.5.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta

Kedudukan tanaman kopi dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan menurut (Rukmana, 2014) diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i> (Tumbuhan)
Sub kingdom	: <i>Tracheobionita</i> (Tumbuhan Berpembuluh)
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i> (Menghasilkan biji)
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i> (Tumbuhan Berbunga)
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i> (Berkeping dua, dikotil)
Sub Kelas	: <i>Astridae</i>
Ordo	: <i>Rubiaceace</i>
Genus	: <i>Coffea</i>
Spesies	: <i>Coffea robusta</i>

2.5.2 Kandungan Kimia Kopi Robusta

Kandungan senyawa kimia pada kopi bergantung pada spesies kopi dan faktor lain seperti kematangan buah, proses agrikultural dan penyimpanan (Farah, 2011). Biji kopi mengandung berbagai jenis senyawa volatil, seperti aldehida, furfural, keton, alkohol, ester, asam format dan asam asetat. Biji kopi juga mengandung trigonelin, asam klorogenat, glikosida, mineral dan kafein (Widyotomo dan Mulato, 2007). Biji kopi mengandung kandungan tambahan antara lain air, karbohidrat (mono, oligo, dan polisakarida), protein, lipid dan mineral (Farah, 2009).

Kafein adalah senyawa kimia yang paling populer. Komposisi kafein pada kopi robusta adalah sebesar 2.0 gr/100gr. Senyawa kimia biji kopi rubusta yang lainnya adalah asam klorogenat. Kandungan asam klorogenat pada kopi robusta adalah sebesar 9.0 g/100g. Subkelas utama dari asam klorogenat yang terkandung dalam kopi adalah *caffeoylquinic acids*, *dicaffeoylquinic acids*, *feruloylquinic acids*, *p-coumaroylquinic acids*, *caffeoylquinic acids*. *Caffeoylquinic acids* merupakan

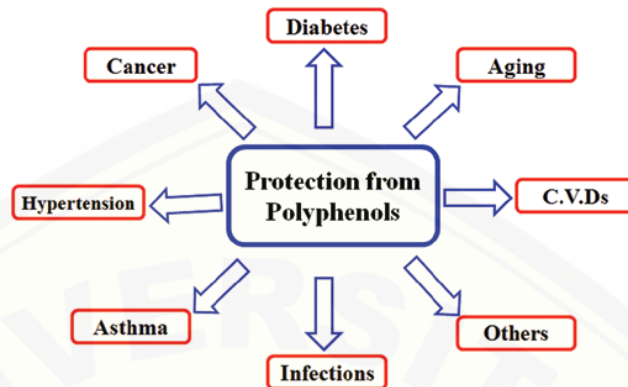
komposisi terbesar dari asam klorogenat yaitu sebesar 80% dari total keseluruhan komposisi asam klorogenat (Farah, 2011).

2.5.3 Senyawa Polifenol Kopi Robusta

Senyawa fenol dapat di definisikan secara kimiawi oleh adanya satu cincin aromatik yang membawa satu (fenol) atau lebih (polifenol) substitusi hidroksil, termasuk derivat fungsionalnya. Polifenol adalah kelompok zat kimia yang ditemukan pada tumbuhan. Zat ini memiliki tanda khas yakni memiliki banyak gugus fenol dalam molekulnya. Asam klorogenat adalah salah satu bentuk polifenol (Hattenschwiler, 2000).

Polifenol memiliki spektrum luas dengan sifat kelarutan pada suatu pelarut yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh gugus hidroksil pada senyawa tersebut yang dimiliki berbeda jumlah dan posisinya. Turunan polifenol sebagai antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Polifenol merupakan komponen yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidan dalam buah dan sayuran (Hattenschwiler, 2000). Berdasarkan penelitian Antonio (2010), Selain sebagai antioksidan kopi juga memiliki efek antikanker dan antiinflamasi.

Polifenol adalah senyawa alami yang banyak ditemukan buah, sayuran, sereal dan minuman. Buah-buahan seperti buah anggur, apel, pir, ceri dan berry mengandung hingga 200-300 mg polifenol per 100 gram berat segar. Suatu produk yang diproduksi dari buah ini, juga mengandung polifenol dengan jumlah yang signifikan. Biasanya segelas anggur merah atau secangkir teh atau kopi mengandung sekitar 100 mg polifenol. Menjelang akhir abad 20, studi epidemiologi dan meta-analisis yang terkait ,sangat menyarankan bahwa konsumsi jangka panjang terhadap makanan yang kaya akan polifenol pada tanaman memberikan beberapa manfaat seperti perlindungan melawan perkembangan kanker, penyakit kardiovaskular, diabetes, osteoporosis dan penyakit neurodegeneratif(Pandey & Rizvi,2009)



Gambar 2.3 Polifenol sebagai agen perlindungan

Senyawa polifenol yang diduga dapat menjadi antibakteri adalah katekin, tanin dan flavonoid. Mekanisme kerja katekin sebagai zat antibakteri yaitu dengan merusak membrane sitoplasma yang menyebabkan bocornya metabolit penting yang menginaktifkan system enzim bakteri. Sedangkan mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri yaitu menginaktifkan adhesi sel mikroba yang terdapat pada permukaan sel dan enzim yang terikat pada membrane sel dan polipeptida dinding sel. Flavonoid memiliki aktivitas antibakteri melalui hambatan fungsi DNA gyrase bakteri sehingga kemampuan replikasi dan translasi bakteri dihambat. Aktivitas biologis senyawa flavonoid terhadap bakteri dilakukan dengan merusak membrane sitoplasma dari bakteri (Agustin, 2013).

Polifenol dapat mempengaruhi fungsi sel dengan memodifikasi struktur membran plasma dan karakteristik seperti fluiditas dan sifat listrik. Efek ini bisa diamati baik saat polifenol tersebut teradsorpsi pada membran (polifenol bisa menjadi penghalang untuk radikal hidrosoluble) dan saat dimasukkan ke dalam bilayer (polifenol akan berada dekat sehingga bisa menghilangkan lipid radikal). Dalam sistem biologis, ROS dihasilkan oleh sejumlah sistem enzimatik dan modifikasi struktur membran plasma dapat menghasilkan perubahan fungsional termasuk aktivitas enzim terkait, interaksi ligan-reseptor, ion atau fluks metabolit, dan modulasi transduksi sinyal). Stimulasi dari neutrofil dengan PMA disertai dengan

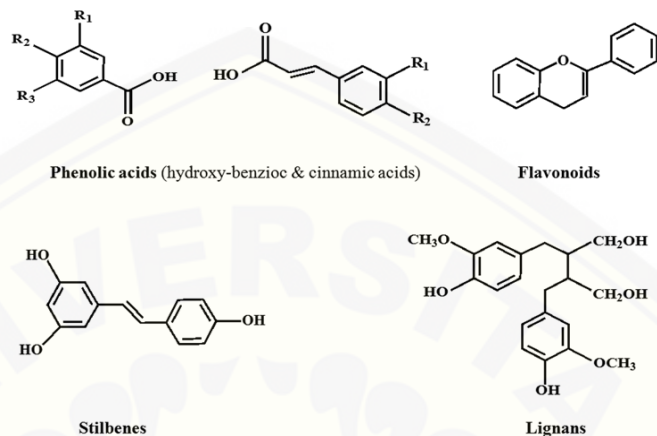
peningkatan fosforilasi isoenzim protein kinase C (PKC) α dan β II, yang secara langsung berpartisipasi dalam aktivasi neutrofil NADPH oksidase. Di sisi lain, penghambatan PKC atau down-regulasi dari ekspresi intraselular dan aktivitasnya telah diteliti sebagai mekanisme polifenol sebagai antioksidan. Penghambatan PKC dapat menjadi alternatif baru dalam menangani penyakit yang berkaitan dengan stres oksidatif.

Mekanisme molekuler terlibat dalam pengurangan produksi ROS pada sel neutrofil, efek resveratrol, pinosilvin, pterostilbene, piceatannol, curcumin dan N-feruloylserotonin pada fosforilasi PKC α / β II (Thr 638 / 641). Pterostilbene dan piceatannol tidak berpengaruh terhadap fosforilasi PKC α / β II setelah stimulasi PMA, dan efek ini dijelaskan dengan rendahnya aksesibilitas senyawa ini terhadap kompartemen sel yang mengandung enzim. Bagaimanapun resveratrol, pinosylvin, curcumin dan N-feruloylserotonin pada konsentrasi 10 dan 100 $\mu\text{mol} / \text{l}$ efektif mengurangi fosforilasi PKC α / β II. Seperti yang dijelaskan untuk resveratrol, efek penghambatan aktivitas PKC antara polifenol dan phorbol ester untuk mengikat domain C1 dari enzim atau dari perubahan pada membran enzim. Selain itu, studi tentang simulasi docking menjadi PKC menunjukkan penghambatan efisien PKC oleh polifenol (Drabikova dkk, 2012).

2.5.4 Struktur dan Klas Polifenol

Lebih dari 8.000 senyawa polifenol telah diidentifikasi di berbagai jenis tumbuhan. Semua senyawa fenolik tanaman timbul dari perantara umum seperti fenilalanin, atau asam shikimic. Terutama dalam bentuk konjugasi, dengan satu atau lebih residu gula yang terkait dengan kelompok hidroksil, meskipun hubungan langsung gula (polisakarida atau monosakarida) terhadap karbon aromatik juga ada. Asosiasi dengan senyawa lain, seperti asam karboksilat dan organik, amina, lipid dan keterkaitan dengan fenol lainnya juga umum. Polifenol dapat dikelompokkan menjadi beberapa kelompok sebagai fungsi dari jumlah cincin fenol yang terkandung dan atas

dasar elemen struktur yang mengikat cincin ini satu sama lain. Kelas utama meliputi asam fenolik, flavonoid, stilben dan lignan.



Gambar 2.4 Mengilustrasikan berbagai kelompok polifenol dan struktur kimianya

Asam fenolik selanjutnya dibagi menjadi asam hidroksil benzoat dan hidroksil asam sinamik. Asam fenolik terhitung sekitar sepertiga dari senyawa polifenolik dalam makanan dan ditemukan di semua bahan tanaman, tetapi sangat melimpah pada buah-buahan yang mengandung asam. Asam caffeic, asam gallic, asam ferulic adalah beberapa hal yang ada di asam fenolik. Flavonoid adalah polifenol paling melimpah dalam makanan manusia dan memiliki dasar yang sama. Struktur terdiri dari dua cincin aromatik, yang terikat bersama oleh tiga atom karbon yang membentuk heterosikuler beroksigen. Biogenetik, satu cincin biasanya timbul dari molekul resorsinol, dan lainnya. Cincin berasal dari jalur shikimate. Stilben mengandung dua bagian fenil yang dihubungkan oleh dua karbon jembatan metilen. Sebagian besar stilben pada tanaman bertindak sebagai antifungal phytoalexins, senyawa yang ada disintesis hanya sebagai respons terhadap infeksi atau cedera. Stilben yang paling banyak dipelajari adalah resveratrol. Lignan adalah senyawa diphenol yang mengandung struktur 2,3-dibenzylbutane yang dibentuk oleh dimerisasi dua residu asam sinamik.

2.5.5 Polifenol dan Penyakit pada Manusia

a. Antioksidan

Studi epidemiologi telah menunjukkan risiko penyakit manusia kronis dan konsumsi diet kaya akan polifenolik. Kelompok fenolik dapat menerima elektron untuk membentuk fenoksil yang relatif stabil, sehingga mengganggu reaksi oksidasi rantai di komponen seluler. Makanan dan minuman yang kaya akan polifenol dapat meningkatkan kapasitas antioksidan plasma. Peningkatan kapasitas antioksidan plasma bisa dijelaskan juga dengan adanya pengurangan polifenol dan metabolitnya di plasma, akibat pengaruhnya terhadap konsentrasi pengurangan lainnya (efek polifenol pada antioksidan endogen lainnya), atau efeknya pada penyerapan pro-oksidatif komponen makanan, seperti zat besi. Konsumsi antioksidan telah dikaitkan dengan penurunan tingkat kerusakan oksidatif DNA limfositik. Pengamatan serupa telah dilakukan pada makanan dan minuman kaya polifenol yang menunjukkan perlindungan terhadap efek polifenol. Bukti bahwa polifenol sebagai antioksidan, polifenol dapat melindungi secara konstituen pada sel yang mengalami kerusakan oksidatif, oleh karena itu membatasi risiko berbagai penyakit degenerative yang berhubungan dengan stres oksidatif.

b. Efek Perlindungan Kardio

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa konsumsi polifenol membatasi kejadian penyakit jantung koroner. Aterosklerosis adalah penyakit peradangan kronis yang berkembang di daerah arteri dengan lesi berukuran sedang. Lesi aterosklerotik mungkin ada dan diam secara klinis selama beberapa dekade, kemudian menjadi aktif dan menghasilkan kondisi patologis seperti infark miokard akut, angina yang tidak stabil atau jantung mendadak mengalami kematian. Polifenol adalah inhibitor oksidasi LDL yang cukup kuat dan oksidasi ini dianggap sebagai mekanisme dalam pengembangan aterosklerosis. Mekanisme lain dengan adanya polifenol akan melindungi terhadap penyakit kardiovaskular. Antioksidan, anti-trombosit, efek anti-inflamasi pada polifenol juga sebagai peningkatan HDL, dan

memperbaiki fungsi endotel. Polifenol juga dapat menyebabkan stabilisasi ateroma plak.

c. Efek Anti Kanker

Efek polifenol pada sel kanker manusia untuk melindungi dan menginduksi pengurangan jumlah tumor atau pertumbuhan sel kanker. Efek ini telah banyak diamati termasuk mulut, perut, duodenum, usus besar, hati, paru-paru, kelenjar susu atau kulit. Banyak polifenol seperti quercetin, katekin, isoflavon, lignan, flavanon, asam ellagic, anggur merah polifenol, resveratrol dan kurkumin yang telah diuji. Semua menunjukkan efek perlindungan meskipun mereka mekanisme kerja yang ditemukan berbeda. Beberapa mekanisme telah diidentifikasi untuk kemoprevensi. Efek polifenol lainnya termasuk aktivitas estrogenik / antiestrogenik, antiproliferasi, induksi penangkapan siklus sel atau apoptosis, pencegahan oksidasi, induksi detoksifikasi enzim, regulasi sistem kekebalan inang, dan aktivitas antiinflamasi (Pandey & Rizvi, 2009).

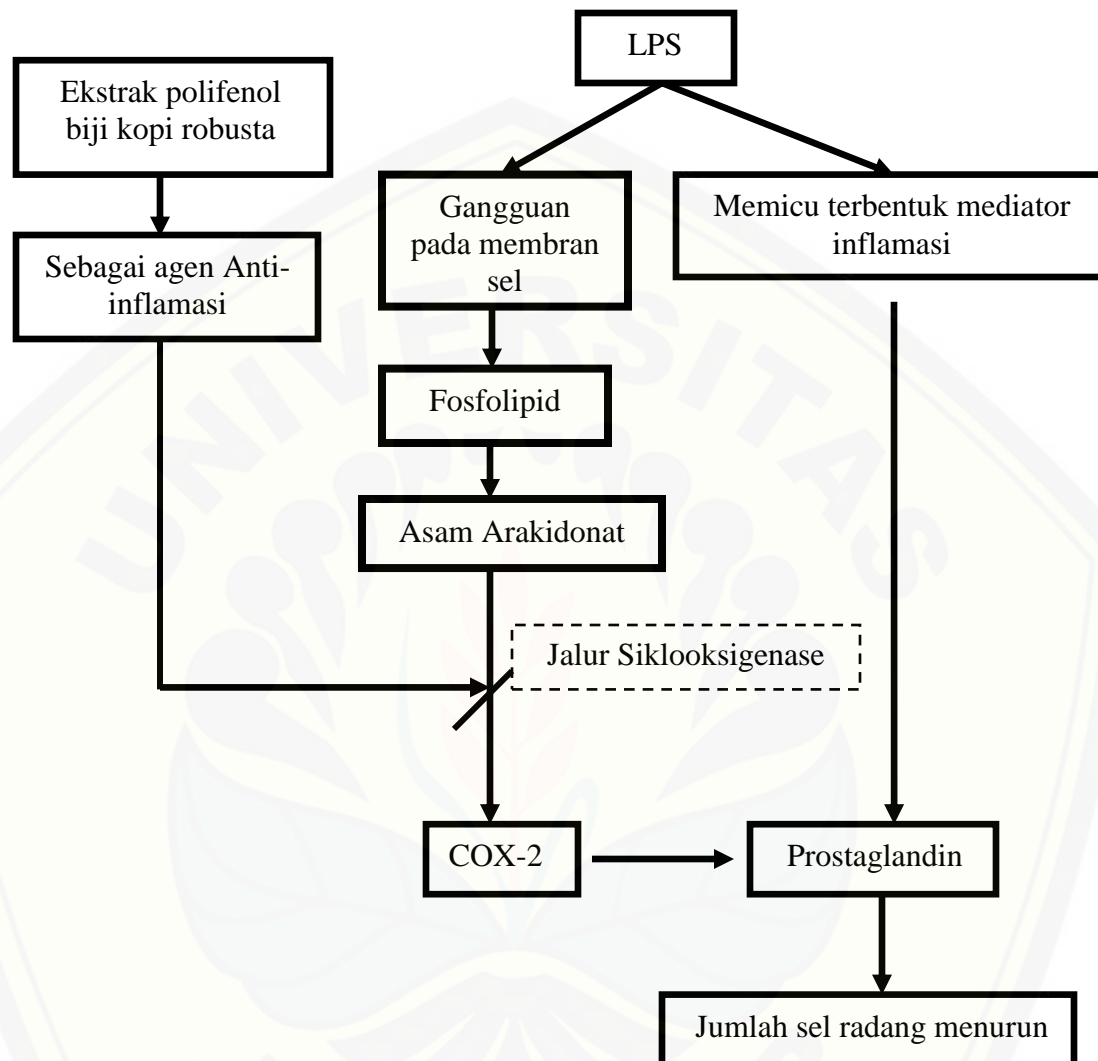
d. Efek Anti Diabetik

Penurunan metabolisme glukosa menyebabkan ketidakseimbangan fisiologis dengan timbulnya hiperglikemia dan selanjutnya diabetes mellitus. Ada dua kategori utama diabetes yaitu tipe-1 dan tipe-2. Beberapa studi telah menunjukkan bahwa beberapa parameter fisiologis dari tubuh bisa diubah dalam kondisi diabetes. Dalam jangka panjang, efek diabetes termasuk dalam perkembangan yang progresif dan spesifik. Efek lainnya seperti retinopati yang mempengaruhi mata dan menyebabkannya kebutaan, nefropati dimana fungsi ginjal diubah atau terganggu dan neuropati yang terkait dengan risiko amputasi, ulkus kaki dan fitur gangguan otonom termasuk disfungsi seksual. Sejumlah penelitian melaporkan antidiabetes oleh karena efek polifenol seperti pada teh katekin telah diselidiki untuk potensi anti-diabetes. Polifenol dapat mempengaruhi glikemia melalui mekanisme yang berbeda, termasuk penghambatan penyerapan glukosa di usus atau serapannya dengan perifer jaringan. Efek hipoglikemik dari anthocyanin yang diasetilasi pada dosis diet 10 mg / kg dan diamati dengan maltosa sebagai sumber glukosa, tapi tidak

dengan sukrosa atau glukosa. Hal ini menunjukkan bahwa efek yang ditimbulkan disebabkan oleh penghambatan α -glukosidase di usus mukosa. Penghambatan α -amilase dan sucrase pada tikus oleh katekin dengan dosis diet sekitar 50 mg / kg atau lebih tinggi juga sudah diamati (Pandey & Rizvi, 2009).



2.6 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.6 Kerangka Konseptual

→ / = Menghambat

2.6.1 Penjelasan Kerangka Konsep

LPS (Lipopolisakarida) adalah suatu endotoksin yang dihasilkan oleh bakteri yang bisa menyebabkan suatu peradangan atau inflamasi. Lipopolisakarida menginduksi diproduksinya faktor lokal yaitu sitokin proinflamatori seperti interleukin 1 α (IL-1 α), interleukin-1-beta (IL-1 β), IL-6, TNF- α dan prostaglandin.

Adanya suatu stimulus yang menyebabkan gangguan pada membran sel akan memicu pengeluaran suatu enzim fosfolipid dari suatu membran sel. Fosfolipid ini yang akan menstimulus pembentukan asam arakidonat. Asam arakidonat ini akan memicu terbentuknya enzim siklooksigenase 2 melalui jalur siklooksigenase. Prostaglandin adalah suatu senyawa kimia yang diproduksi oleh enzim siklooksigenase 2 (COX-2). Ekstrak polifenol biji kopi robusta memiliki kandungan polifenol yang tinggi dan berpotensi dalam menghambat ekspresi COX-2. Pada saat COX- 2 terhambat maka pembentukan prostaglandin juga akan terhambat sehingga jumlah sel radang akan menurun.

2.7 Hipotesis

Berdasarkan penjelasan tersebut dapat diajukan suatu hipotesis, yaitu ekstrak polifenol biji kopi robusta dapat menghambat ekspresi COX-2 pada neutrofil yang dipapar LPS *E. coli*

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimental laboratoris *invitro*. Rancangan penelitian ini adalah *The Post Test Only Control Group Design*, yaitu dilakukan pengukuran terhadap variabel yang diteliti setelah diberikan perlakuan, kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilaksanakan pada bulan November 2017

3.2.2 Tempat penelitian

Pembuatan ekstrak polifenol biji kopi robusta dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Polinema Malang. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember dan Laboratorium Biomedik bagian Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3 Identifikasi Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak polifenol biji kopi robusta (*Coffea robusta*).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah ekspresi COX-2 sel neutrofil.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini sebagai berikut:

- a. Konsentrasi ekstrak polifenol biji kopi robusta.
- b. Isolat neutrofil.
- c. LPS E.Coli 0111 : B4 (List Biology Lab)

3.4 Definisi Operasional Penelitian

3.4.1 Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta

Ekstrak polifenol biji kopi robusta adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari biji kopi robusta menggunakan pelarut etanol. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode sonikasi, yang dilakukan dengan cara penambahan pelarut etanol 96% .

3.4.2 Neutrofil

Isolasi neutrofil dilakukan dengan menggunakan teknik *gradient density* menggunakan bahan *Double Ficoll Hypaque Centrifugation*.

3.4.3 Lipopolisakarida *E. coli* 0111 : B4 (List Biology Lab)

LPS *E. coli* digunakan sebagai pencetus reaksi radang. Lipopolisakarida merupakan endotoksin yang ada pada membran terluar bakteri Gram negatif dan dilepaskan bakteri tersebut ketika mengalami lisis maupun saat penggandaan bakteri. LPS E. Coli yang digunakan adalah berlabel produksi.

3.4.4 COX-2

COX-2 merupakan enzim yang terinduksi pada sel yang mengalami inflamasi. Sel yang mengekspresikan protein COX-2 akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan yang tidak akan memberikan warna ungu/ biru.

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Kriteria Sampel

Darah vena perifer/ vena tepi orang sehat, bersih dari infeksi sebelum dilakukan pengambilan darah, tidak memiliki penyakit sistemik seperti kelainan darah dan kebiasaan merokok.

3.5.2 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan menurut Daniel (2005) untuk setiap kelompok dalam penelitian ini adalah empat sampel yang didasarkan pada penghitungan sebagai berikut:

$$n = \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan: n = besar sampel tiap kelompok

σ = standar deviasi sampel

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

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

Sehingga diperoleh besar sampel sebesar:

$$n = \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

$$n = (1,962)^2 = 3,84 \approx 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini 4. Peneliti menggunakan 4 (empat) sampel untuk setiap perlakuan.

3.5.3 Penggolongan Sampel Penelitian

Sampel dibagi kedalam 6 kelompok (Kp), yaitu:

Kp I : Sel neutrofil tanpa perlakuan/ kontrol.

Kp II : Sel neutrofil dipapar LPS / kontrol negatif.

- Kp III : Sel neutrofil dipapar dengan LPS dan di inkubasi dengan ekstrak polifenol biji kopi robusta 3,125%
- Kp IV : Sel neutrofil dipapar dengan LPS dan di inkubasi dengan ekstrak polifenol biji kopi robusta 6,25%
- Kp V : Sel neutrofil dipapar dengan LPS dan diinkubasi dengan ekstrak polifenol biji kopi robusta 12,5%.
- Kp VI : Sel neutrofil dipapar dengan LPS dan diinkubasi dengan ekstrak polifenol biji kopi robusta 25%

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat

Autoclave, Centrifuge, Coverslip poli L-lysine, Gelas ukur, Hemositometer, Humaroller, Incubator Shaker, Laminar Flow Cabinet, Lampu spiritus, Microplate cell, Mikroskop inverted, Object glass, Oven, Pipet mikro, Rak Tabung, Syringe 5ml, Tabung epondorf, Tabung Falcon, Tabung heparin, Neraca, Vortex, Yellow tip, Blue tip, pipet mikro.

3.6.2 Bahan

LPS *E. coli* , Etanol Steril, Darah vena kapiler, *Ficoll Hypaque Gradien*, Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta, HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*), RPMI (*Rosewel Park Memorial Institute Media*), Medium complex, *Methanol Absolute* , Well kultur, M119, Fungizone, Penstrep, Giemsa, *Trian blue*.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Sterilisasi Alat

Semua alat dicuci bersih kemudian disterilkan. Khusus untuk peralatan yang terbuat dari bahan kaca dan logam seperti tabung *falcon*, gelas ukur dan lain lain disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121° C selama 15 menit dan alat yang

terbuat dari bahan yang tidak tahan panas disterilisasi menggunakan alkohol agar terbebas dari invasi bakteri.

3.7.2 Persiapan Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta

Biji kopi robusta didapatkan dari PTPN XII. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode sonikasi. Prosedur pembuatan ekstrak adalah sebagai berikut. Menimbang biji kopi robusta dengan timbangan dan diketahui berat dari biji kopi sebesar 721,1 gram. Biji kopi dioven dengan suhu 60⁰ C selama 2 sampai 3 hari. Setelah dioven, biji kopi dimasukkan pada hammer mill yang berfungsi untuk membuat biji kopi menjadi serbuk kopi. Dilakukan proses sonikasi dengan cara penambahan pelarut etanol 96% dan diputar dengan getaran 80 KHz selama satu jam sehingga menghasilkan bentukan seperti susu. Pencampuran dengan etanol dilakukan 3 kali untuk mendapatkan kandungan flavanoid murni. Cairan putih seperti susu dimasukkan kedalam alat sentrifugasi dengan putaran 4000 rpm selama 5 menit untuk mengendapkan partikel dari bubuk kopi sehingga cairan seperti minyak didapatkan. Cairan tersebut dikeringkan pada oven dengan suhu 60⁰C agar etanol menguap dan didapatkan dua lapisan yaitu pasta dan minyak. Sesudah didapatkan cairan minyak ekstrak ditutup *falcon* dengan aluminium foil simpan ke dalam lemari es.

Untuk mendapatkan berbagai konsentrasi yang diinginkan, maka pengenceran dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

M1 = kadar konsentrasi awal

M2 = kadar konsentrasi akhir

V1 = volume awal

V2 = volume akhir

Cara pengencerannya:

Untuk memperoleh ekstrak polifenol biji kopi robusta 25% sebanyak 4 ml:

$$100\% \times V1 = 25\% \times 4$$

$$4 \times V1 = 4$$

$$V1 = 1 \text{ ml}$$

Jadi ekstrak polifenol biji kopi robusta 100% harus diencerkan dengan menambahkan *aquadest* sebanyak 3 ml dalam 1 ml ekstrak polifenol biji kopi robusta 100%.

Untuk memperoleh ekstrak polifenol biji kopi robusta 12,5% sebanyak 4 ml:

$$100\% \times V1 = 12,5\% \times 4$$

$$8 \times V1 = 4$$

$$V1 = 0,5 \text{ ml}$$

Jadi ekstrak polifenol biji kopi robusta 100% harus diencerkan dengan menambahkan *aquadest* sebanyak 3,5 ml dalam 0,5 ml ekstrak polifenol biji kopi robusta 100%.

Untuk memperoleh ekstrak polifenol biji kopi robusta 6,25% sebanyak 4 ml:

$$100\% \times V1 = 6,25\% \times 4$$

$$16 \times V1 = 4$$

$$V1 = 0,25 \text{ ml}$$

Jadi ekstrak polifenol biji kopi robusta 100% harus diencerkan dengan menambahkan *aquadest* sebanyak 3,75 ml dalam 0,25 ml ekstrak polifenol biji kopi robusta 100%.

Untuk memperoleh ekstrak polifenol biji kopi robusta 3,125% sebanyak 4 ml:

$$100\% \times V1 = 3,125\% \times 4$$

$$32 \times V1 = 4$$

$$V1 = 0,125 \text{ ml}$$

Jadi ekstrak polifenol biji kopi robusta 100% harus diencerkan dengan menambahkan *aquadest* sebanyak 3,875 ml dalam 0,125 ml ekstrak polifenol biji kopi robusta 100%.

Setelah didapatkan pengenceran pertama disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm dengan suhu 20o C selama 10 menit. Akan terbentuk endapan dan cairan. Pisahkan cairan ke tabung *falcon*. Sentrifuse lagi cairan dan pisahkan kembali. Lakukan sampai cairan bening dan hanya terdapat sedikit endapan.

3.7.3 Pembuatan RPMI dan Medium Complex.

Pembuatan RPMI dari sediaan bubuk ke cair (dalam 150ml *aquadest* steril)

$$\frac{10,4}{1000} \times 150 = 1,56 \text{ gr (jadi, dalam 150 ml } \textit{aquadest} \text{ steril ditambahkan 1,56 gr serbuk RPMI)}$$

Pembuatan Medium Complek M199 (dalam 200ml *aquadest* steril)

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

3.7.4 Isolasi Neutrofil

- a. Ambil 6 ml darah vena cubiti, kemudian masukkan pada tabung heparin campur sampai merata. Pipet 3 ml histopage M119 masukkan pada tabung falcon steril dan tambahkan 3 ml lymphoprep secara perlahan-lahan melalui dinding tabung, dan terbentuk 2 lapisan. Pipet 6 ml darah masukkan pada tabung 2 lapisan tersebut, secara perlahan lahan melalui dinding tabung falcon, maka terbentuk 3 lapisan (Histopage 119, Lymphoprep, dan darah)
- b. Sentrifugasi pada kecepatan 700 g selama 30 menit pada suhu 20°C. Terbentuk 6 lapisan (Plasma, Mononuclear, Lymphoprep, Polymorfonuclear , Histopage 119 dan eritrosit). Pipet Lapisan ke 4 Polymorfonuclear (cincin kabut) secara hati-hati, masukkan pada tabung steril
- c. Encerkan sampel Mononuclear menggunakan HBSS (1 : 1) homogenkan. Sentrifugasi dengan kecepatan 700 g (gravity) selama 10 menit dengan suhu 20°C, lakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Tambahkan 1ml HBSS pH 7.4 pada Supernatan yang didapat , homogenkan.

- d. Tambahkan 5 µl fungizone dan 20 µl Penicilin- Streptomycin. Siapkan *Well Plate Culture*, masukkan coverslip poly L-lysin steril pada masing-masing *well* sesuaikan dengan kebutuhan. Teteskan 100 µl supernatant hasil isolasi sel pada coverslip yang sudah disiapkan. Inkubasi selama 20 – 30 menit pada suhu 37⁰C
- e. Ambil dan tambahkan 1 ml media kultur RPMI, dan inkubasi lagi selama 20 – 30 menit pada suhu 37⁰C. Amati di bawah mikroskop inferted, dengan menggoyang secara perlahan untuk melihat penempelan selnya. Cuci menggunakan media RPMI sebanyak 3 kali, secara hati-hati untuk melepaskan kontaminasi sel.
- f. Amati di bawah mikroskop inverted, untuk melihat kontaminasi selnya. Setelah sel steril bebas dari kontaminasi. Ganti media kultur menggunakan media kultur M.199, sel siap untuk dilakukan perlakuan sel

3.7.5 Inkubasi neutrofil Dengan Ekstrak polifenol biji kopi robusta

Isolat neutrofil dalam *microplate* inkubasi menggunakan *shaker incubator* selama 15 menit agar neutrofil melekat pada suhu 37° C dan 5% CO₂ dengan menggunakan gas generating kit, kemudian dilakukan pengecekan dibawah mikroskop inverted. Setelah itu neutrofil diresuspensi dengan 1000µl RPMI, kemudian buang. Menambahkan 100 µl ekstrak polifenol dengan konsentrasi tertentu (3.13%, 6.25%, 12.5%, 25%) pada *well* kultur sel sesuai perlakuan dan homogenkan. Dilakukan pipetting sampai neutrofil dan ekstrak homogen lalu diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37° C dan 5% CO₂. Setelah 2 jam dilakukan pengamatan dibawah mikroskop untuk mengetahui pengaruh ekstrak polifenol biji kopi robusta terhadap neutrofil.

3.7.6 Pemaparan LPS *E. coli*

Pada setiap kelompok perlakuan secara perlahan ditambahkan LPS *E. coli* sebanyak 100 µl dan homogenkan. Inkubasi selama 2 jam pada suhu 37° C dan 5% CO₂. Diamati perubahan dan perkembangan neutrofil setiap jam selama waktu

inkubasi dengan LPS. Setelah diinkubasi selama 4 jam, lalu difiksasi dengan menggunakan metanol absolut selama ± 1 menit.

3.7.7 Pewarnaan Imunositokimia (ICC)

Plate yang sudah difiksasi dicuci menggunakan *aquadest* dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian buang *aquadest* dengan pipet lalu cuci dengan PBS dan diamkan selama 10 menit. Buang PBS dan teteskan H_2O_2 3% selama 10 menit. Buang H_2O_2 3% dan cuci kembali dengan PBS 3 kali bergantian selama 5 menit. Buang rendaman terakhir dan teteskan Ab Primer sebanyak 5μ dan diamkan selama semalam atau minimal 18 jam dengan suhu $4^\circ C$.

Setelah didiamkan semalam atau minimal 18 jam *plate* dicuci kembali dengan PBS sebanyak 3 kali secara bergantian selama 5 menit. Buang rendaman PBS terakhir kemudian tambahkan *Conjugated Streptavidin* dan diamkan selama 30 menit. Selanjutnya cuci dengan PBS sebanyak 3, kali masing-masing diamkan selama 5 menit. Teteskan chromogen dan diamkan selama 20 menit. Cuci kembali dengan PBS sebanyak 3x masing-masing diamkan selama 5 menit. Setelah itu meneteskan HE pada tiap *plate* dan diamkan selama 50 detik. Lalu buang cairan HE dan cuci dengan *aquadest* selama 10 detik. Buang *aquadest* dalam *plate* dan diangin anginkan sampai preparat kering. Lakukan mounting untuk pembacaan ekspresi COX-2.

3.7.8 Penghitungan Ekspresi COX-2 pada sel neutrofil

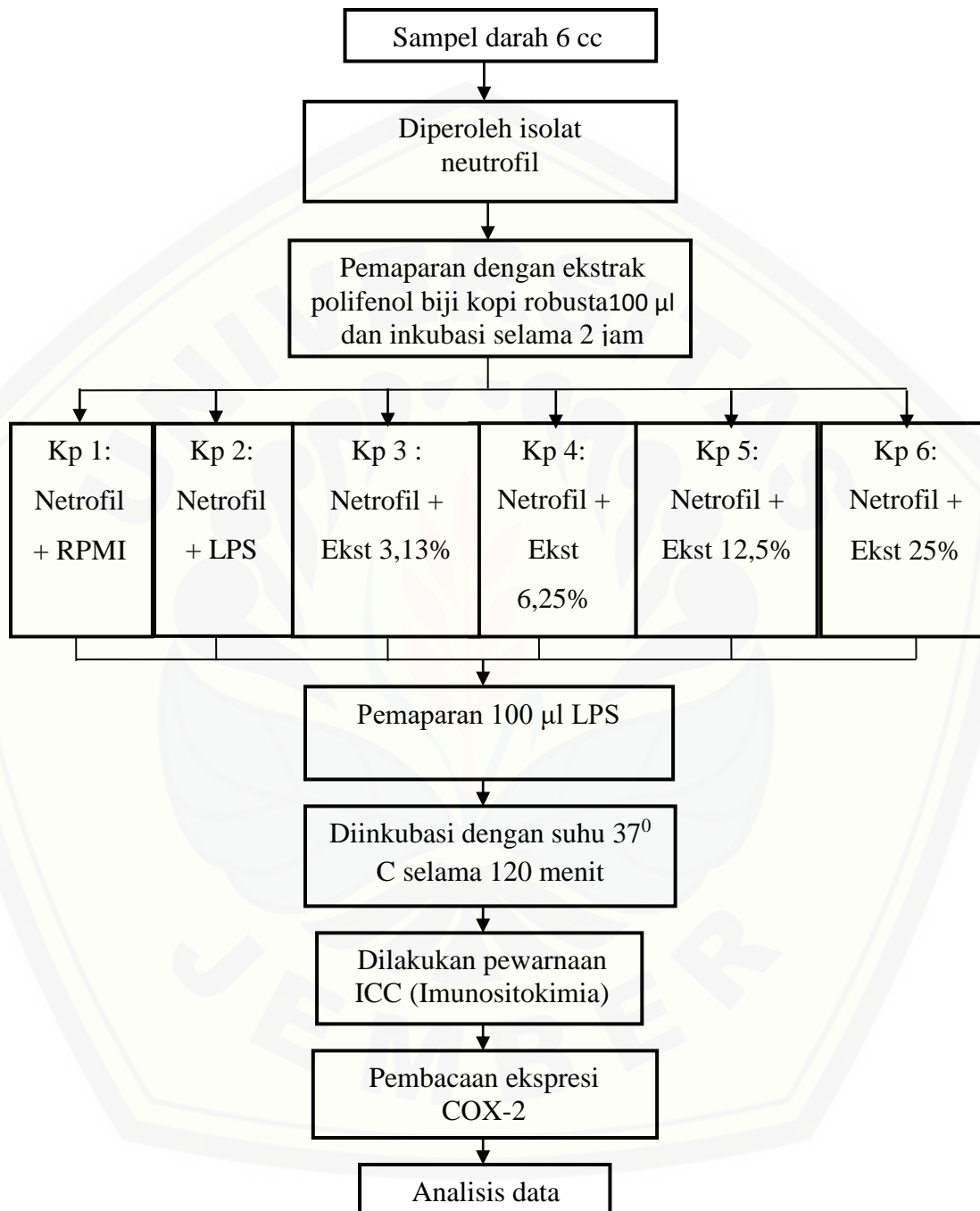
Ekspresi COX-2 diamati menggunakan mikroskop inverted. Sel yang mengekspresikan COX-2 akan memberikan warna coklat/gelap. Jumlah sel dihitung pada 5 lapang pandang. Selanjutnya dilakukan analisis data. Penghitungan dan pengamatan dilakukan oleh 3 orang.

3.8 Analisis Data

Pada penelitian ini, data yang didapatkan dianalisis menggunakan uji *Kolmogrov Smirnov* untuk uji normalitas dan uji *Levene* untuk uji homogenitas. Uji normalitas dilakukan dengan uji statistik parametrik, yaitu *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *LSD*. Semua uji menggunakan tingkat kemaknaan 95% ($\alpha=0,05$) (Notoadmodjo, 2005).



3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa terlihatnya ekstrak polifenol biji kopi robusta yang mampu menghambat ekspresi COX-2 pada sel neutrofil yang dipapar LPS *E.coli*. Hal ini membuktikan ekstrak polifenol biji kopi robusta dapat berperan sebagai antiinflamasi.

5.2 Saran

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

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang manfaat lain dari ekstrak polifenol biji kopi robusta sebagai antioksidan dan daya hambat terhadap bakteri.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk menguji biokompabilitas ekstrak polifenol biji kopi robusta sebagai agen antiinflamasi

DAFTAR PUSTAKA

- Dacie and Lewis S. M. 2001. *Miscellaneous tests. In: Lewis S. M., Bain B. J., Bates I., editors: Dacie and Lewis practical haematology*. 9th ed. London: Harcourt Publisher Limited.
- Darwadi R.P, Aulanni'am, Mahdi.C. 2013. Pengaruh Terapi Kurkumin Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Hasil Isolasi Parotis Dan Profil Protein Tikus Putih yang Terpapar Lipopolisakarida (LPS). *Kimia Student Journal*. No.1
- Djaenudin, D., H. Marwan, A. Hidayat, dan H. Subagyo. 2003. *Petunjuk Teknis Evaluasi Lahan untuk Komoditas Pertanian*. Balai Penelitian Tanah: Bogor.
- Drabikova, K.Perecko, T. Nosal,R. Harmatha, .J. Smidrkal, J. Jancinova, V. 2012. Polyphenol Derivates- Potential Regulators of Neutrophil Activity. *Interdiscip Toxicol*. Vol. 5 (2) : 65-70
- Dyaningsih, D.,M., 2007, Pengaruh Pemaparan Entamoeba gingivalis Terhadap Jumlah Polimorfonuklear Neutrofil pada Tikus Wistar Jantan dengan Radang Gingiva, Skripsi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Jawa Timur.
- Ermawati, T. 2014. Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (Coffea robusta) Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Tikus Periodontitis yang di Induksi Porphyromonas gingivalis. http://repository.unej.ac.id/handle/123456789/962/discover?filtertype=author&filter_relational_operator=equals&filter=Tantin+Ermawati
- Fajrin, F. A. 2013. Keterkaitan Cyclooxygenase (COX)-2 terhadap Perkembangan Terapi Kanker. Vol. 10 No. 1
- Farah, A. 2009. Coffee as a speciality and functional beverage. In: *Functional and speciality beverage technology*. England: Paquin P; Woodhead Publishing, CRC press
- Farah, A. 2011. Coffee: Emerging Health Effect and Disease Prevention. In: *Coffee Constituents*. John Wiley & Sons: In Press
- Farah A, Paulis TD, Trugo LC, Martin PR, 2005. Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 53(5) : 1505-1513
- Garna, K. Iris, R. 2010. *Imunologi Dasar*. Edisi ke X. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Jakarta.

- Gaw, Mc. 2002. Periodontal Disease and Preterm Delivery of Low Birth Weight Infants. *J Can Dent Assoc.* Vol. 68(3): 165-9
- Hartanto, B.S. 2011. Mengobati Kanker Dengan Manggis. Yogyakarta: Penerbit Second Hope. Halaman 19,24-25,30,50-51.
- Hattenschwiler S, Vitousek, P. 2000. The role of polyphenols interrestrial ecosystem nutrient cycling. *J TREEvol.* 15 no. 6
- Indahyani, D. E. Santoso, A. S., Utoro, T., Sosesaty, M. H. N. E. 2007. Pengaruh Induksi Lipopolisakarida (LPS) Terhadap Osteopontin Tulang Alveolaris Tikus Pada Masa Erupsi Gigi. *Indonesian Journal of Dentistry.* 14(1) : 2-7.
- Leahy, K.M., Ornberg, R.L., Wang, Y., Zweifel, B.S., Koki, A.T., dan Masferrer, J.L. 2000. Cyclooxygenase-2 Inhibition by Celecoxib Reduces Proliferation and Induces Apoptosis in Angiogenic Endothelial Cells in Vivo, *Cancer Res.*, 62, 625–631
- Levinson W. 2008. *Review of medical microbiology and immunology.* 10th ed. McGraw-Hill Companies. p366-49
- Lumbanraja, L. B., 2009. Skrining Fitokimia dan Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L.*) terhadap Radang pada Tikus, Skripsi, Fakultas Farmasi, Universitas Sumatra Utara.
- Meilawaty, Z., 2013, Efek ekstrak daun singkong (*Manihot utilissima*) terhadap ekspresi COX-2 pada monosit yang dipapar LPS *E.coli*. *Dental Journal.* 46 No 12. 198-200
- Najiyati, S., dan Danarti, 1997. *Budidaya Kopi dan Pengolahan Pasca Panen.* Penebar Swadaya: Jakarta.
- Notoatmodjo, Soekidjo. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan.* Jakarta: PT. Rineka Cipta
- Pandey, K. B. Rizvi, S. I. 2009. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Diseases. 2 Issue 5
- Prasetya, R., C., 2015, Ekspresi dan Peran Siklooksigenase-2 dalam Berbagai Penyakit di Rongga Mulut, *Stomatognathic (J.K.G Unej)* Vol.12 No.1: 16-19.
- Prasetya, R., C., Hasniastuti, T., Purwanti, N., 2013, Ekspresi COX-2 setelah pemberian Ekstrak Etanolik Kulit Manggis (*Garcinia mangostana Linn*) pada Tikus Wistar, *Dental Journal*, Vol.46 No.4.

- Prastowo, B. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Bogor : Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan
- Prescott, L.M., J.P. Harley. & D.A. Klein. 2002. *Microbiology* 4th ed. Mc-Graw Hill Comp, Inc. New York. USA.
- Price, S & Wilson, L, 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi 6. EGC, Jakarta.
- Remick DG. 2007. *Biological Perspectives, Pathophysiology of Sepsis*. American Journal of Pathology. 1435-43
- Robbins, S. RS., dan Kumar, V. 2007. "Basic Patology". Disadur Staf Pengajar Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Buku Ajar Patologi. Edisi 7. Jakarta: EGC.
- Rukmana, R. 2014. *Untung Selangit dari Agribisnis Kopi*. Yogyakarta : ANDI
- Sabir, A, (2003). *Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis Trigona sp Terhadap Bakteri Streptococcus mutans (in vitro)*. Surabaya : Majalah Kedokteran Gigi (Dent.J.), 38, No.3, Hal : 135-141
- Soekaryo Erayadi. Siwa Setyahadi. Partomuan Simanjuntak. 2017. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Fraksi Etanol Daun Sirsak (Annona muricata Linn.) sebagai Anti Inflamasi PenghambatT Enzim Siklooksigenase-2 (COX-2) secara In Vitro*. Vol 6
- Soleha, T. U. Yudistira, M.A P. 2016. *Blueberry (Vaccinium Corymbosum) dalam Menghambat Proses Inflamasi*. Vol 5 Nomor 1. Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
- Suwarto dan Octavianty, Y. 2010. *Budi Daya 12 Tanaman Perkebunan Unggulan*. Jakarta : Penebar Swadaya
- Schug, S.A, 2005, *Clinical Pharmacology of non-opioid and opioid Analgesics*. Pain 2005 An Update Review. Seattle: IASP Press, h.34-6.
- Ward, J. L., T. Matthew, M.D. Harting, Jr. M.D. Cox, M. Charles, M.D. Mercer, and W. David. 2011. *Effect Ketamine on Endotoxin and Traumatic Brain Injury Induce Cytokine Production in the Rat*. Journal Trauma. 70 (6): 1471-1479
- Widyotomo, S. dan Mulato, S. 2007. *Kafein : Senyawa Penting pada Biji Kopi*. Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Vol. 23 (1) : 44-50

LAMPIRAN

A. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman *Coffea robusta*

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0

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

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN
No: 017/ PL17.3.1.02/LL/2017

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 4393/UN25.8.TL/2017 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Qurrotulaini Wahyu Pratiwi
NIM : 141610101035
Jur/Fak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:
Kingdom: Plantae; Devisio: Magnoliophyta; Sub Devisio: Spermatophyta; 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, 29 Nopember 2017
Kad. Laboratorium Tanaman

Lilik Mastuti, MP
NIP. 195808201987032001



B. Ethical Clearance



KOMISI ETIKA PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA
 Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta
 Telp. 081239447900

KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN
("ETHICAL CLEARANCE")
 No.001212/KKEP/FKG-UGM/EC/2017

Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:

Judul : **KAJIAN MOLEKULER POTENSI POLIFENOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea robusta*) SEBAGAI SENYAWA ANTI INFLAMASI UNTUK AGEN TERAPITOPIKAL**

Peneliti Utama : drg. Tantin Ermawati, M.Kes

Anggota Penelitian : 1. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes
 2. drg. Happy Harmono, M.Kes

Penanggung Jawab Medis : drg. Tantin Ermawati, M.Kes

Unit/Lembaga : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Lokasi Penelitian : Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember

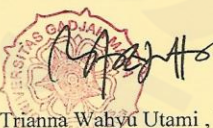
Waktu Penelitian : Oktober 2017 – Selesai

Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.


Yogyakarta, 16 Oktober 2017

Wakil Dekan Bidang Penelitian, Pengabdian
 Kepada Masyarakat dan Kerjasama

Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM



drg. Trianna Wahyu Utami, MDSc., Ph.D



Prof. Dr.drg. Pinandi Sri Pudyani, SU., Sp.Ort(K)

C. Inform Consent

SURAT PERSETUJUAN
INFORMED CONSENT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Muhamad sandy Irianto
Umur : 21 tahun
Jenis Kelamin : Laki-laki

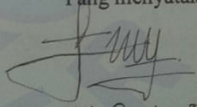
Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari :

Nama : Qurrotulaini Wahyu Pratiwi
NIM : 141610101035
Fakultas : Kedokteran Gigi
Alamat : Jl. Danau Toba Gang 7 no 225 Jember

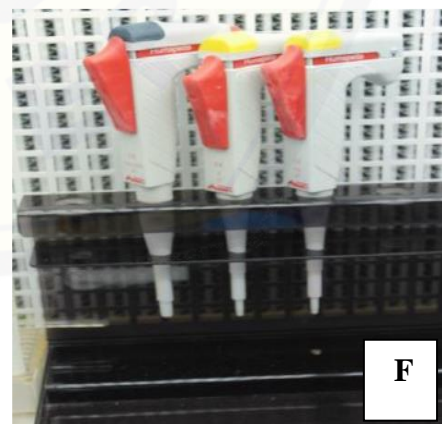
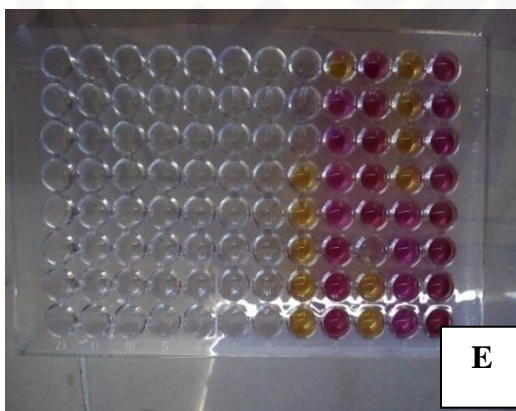
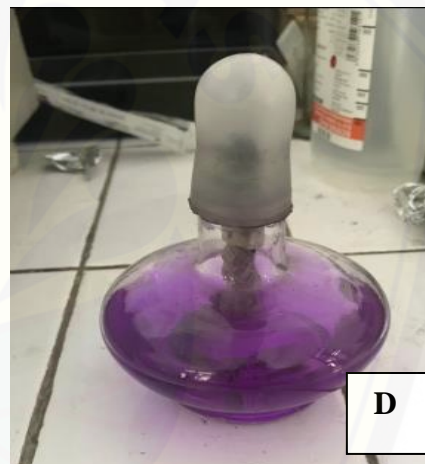
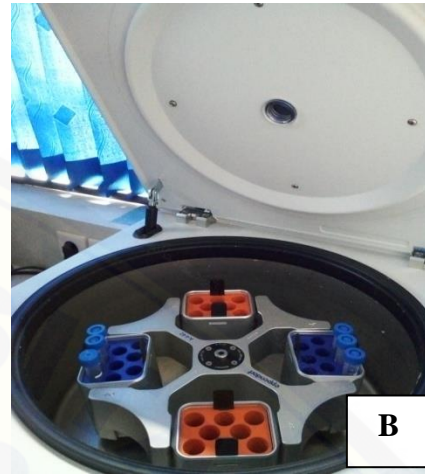
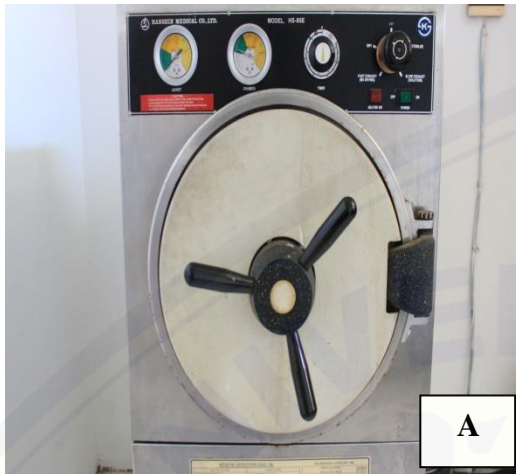
Dengan judul penelitian **POTENSI EKSTRAK POLIFENOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea robusta*) TERHADAP EKSPRESI COX-2 PADA SEL NETROFIL SECARA *IN VITRO***, dimana prosedur pelaksanaan penelitian untuk pengambilan sampel ini tidak akan menimbulkan resiko bagi subyek yang bersangkutan.

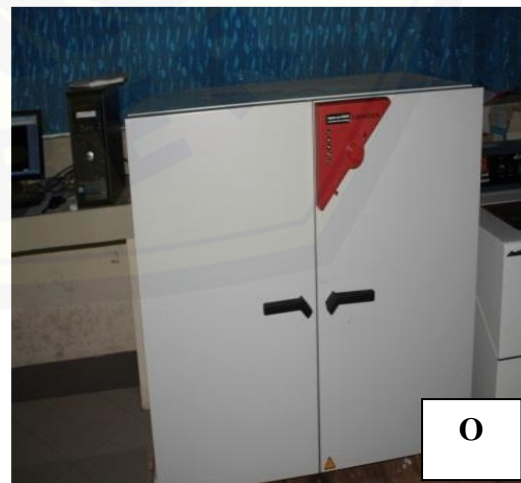
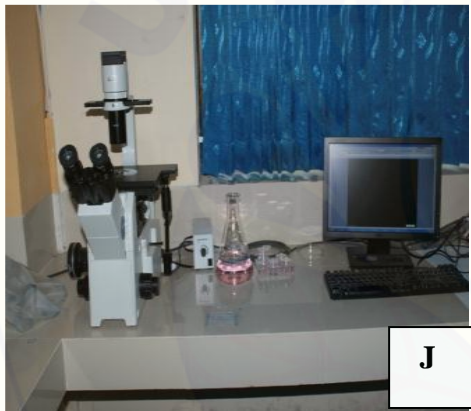
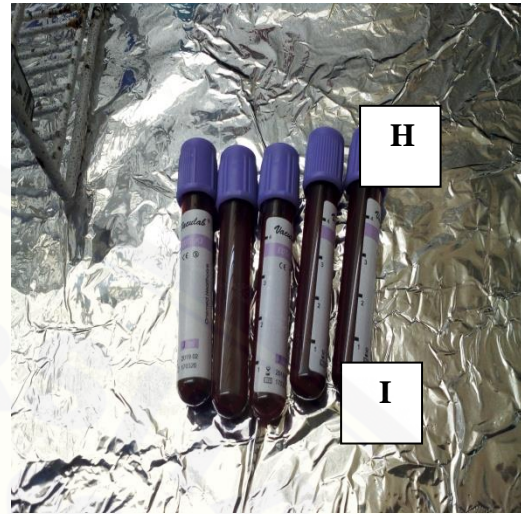
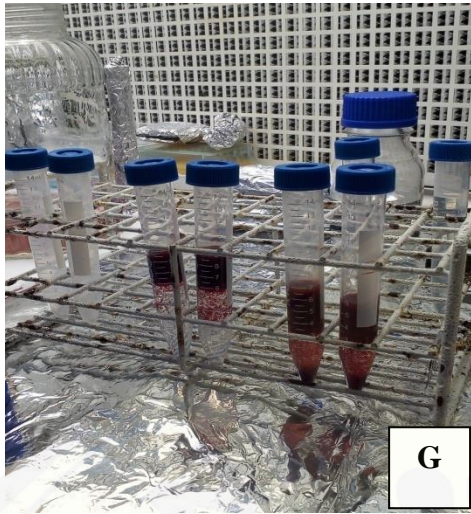
Saya telah membaca atau dibacakan prosedur penelitian yang terlampir dan telah diberi kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan diberi jawaban dengan jelas.

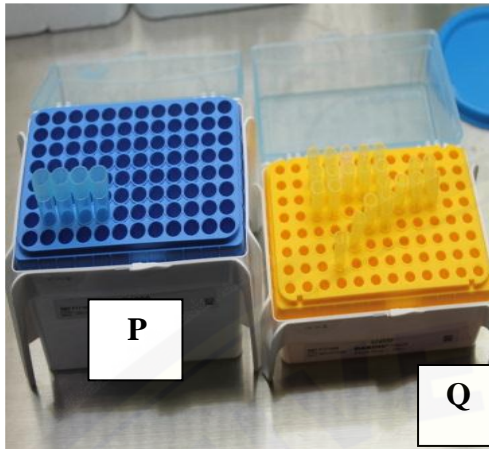
Surat persetujuan ini saya tulis dengan sebenar-benarnya tanpa suatu paksaan dari pihak manapun. Dengan ini saya menyatakan dengan sukarela sanggup menjadi subyek dalam penelitian ini.

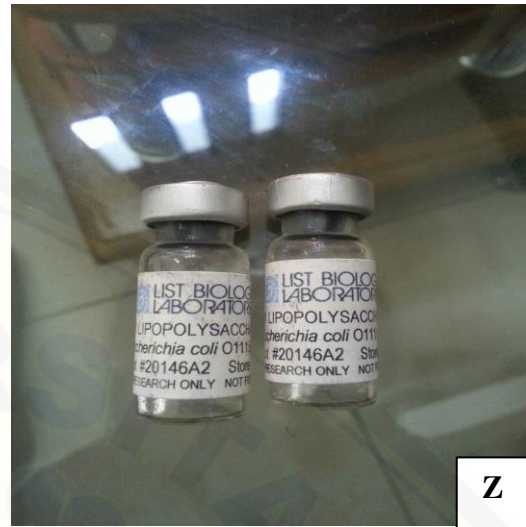
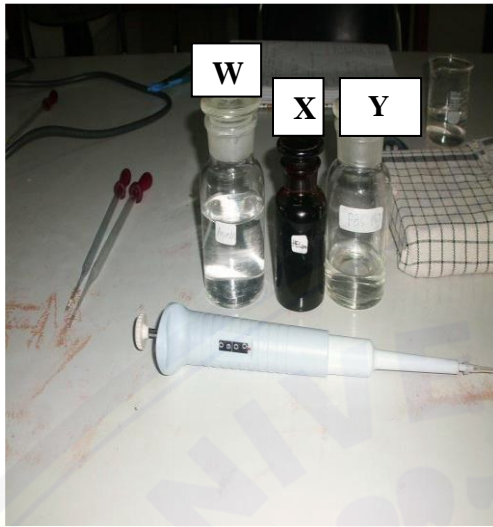
Jember, 25 November 2017
Yang menyatakan

(M Sandy.I.)

D. ALAT DAN BAHAN









Keterangan :

A. Autoclave

B. Centrifuge

C. Incubator Shaker

D. Spirtus

E. Microplate cell

F. Pipet Mikro

G. Tabung falcon

H. Tabung heparin

I. Darah vena kapiler

J. Mikroskop inverted

K. Laminar flow cabinet

L. Masker

M. Handscoon

N. Syringe 5 ml

O. Oven

P. Blue tip

Q. Yellow tip

R. Neraca

S. Vortex

T. HBSS

U. RPMI dan M199

V. Fungizone dan Penicilin streptomycyn

W. Aquades

X. Cat HE

Y. PBS

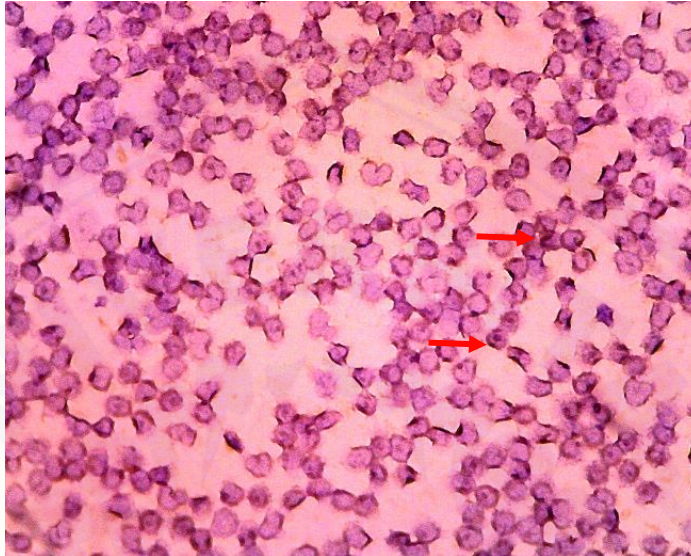
Z. LPS 0111 : B4 (List Biology Lab)

E. HASIL PERHITUNGAN EKSPRESI COX-2

	Konsentrasi 25%	Konsentrasi 12,5%	Konsentrasi 6,25%	Konsentrasi 3,13%	Kontrol (+)	Kontrol (-)
Orang 1	7,8	6,05	4,55	5,95	18,4	8,65
Orang 2	7,65	5	5,35	3,15	21,95	7,95
Orang 3	6,9	4,8	3,9	2,6	27,6	7,9
	7,45	5,28	4,60	3,90	22,65	8,17

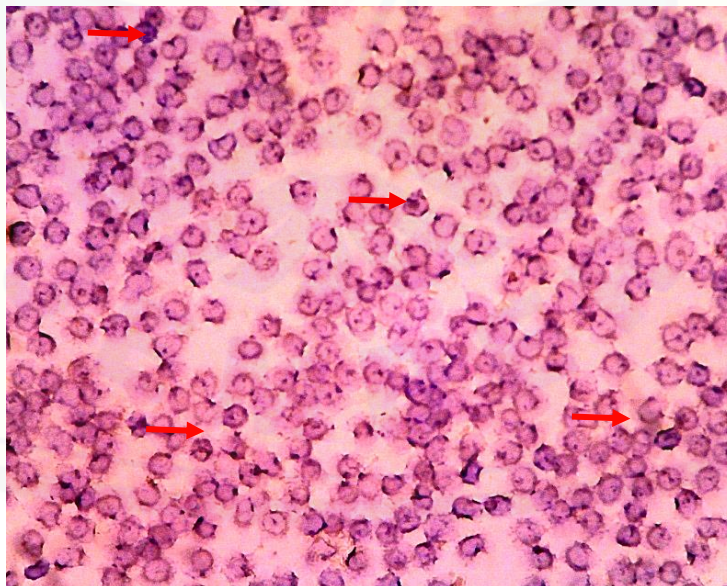
F. HASIL FOTO PENELITIAN

1. Kelompok Kontrol Negatif. Perbesaran 400x



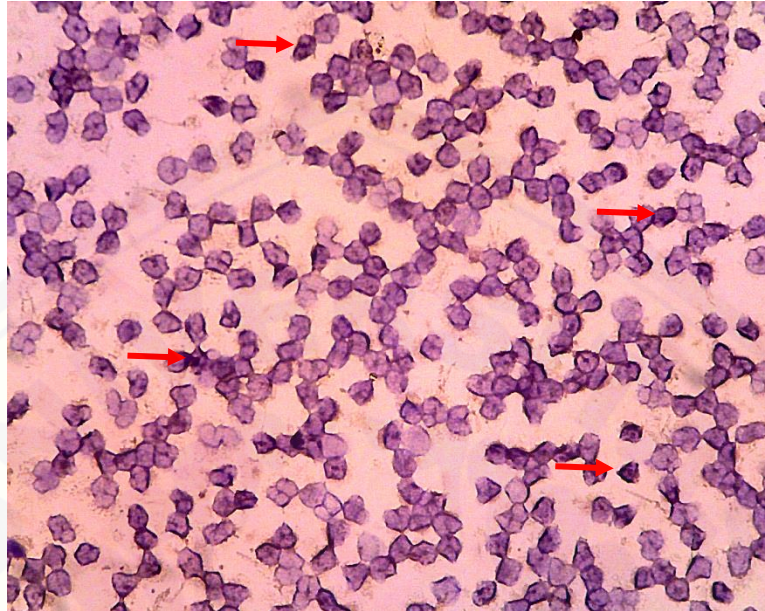
Panah merah menunjukkan adanya ekspresi COX-2 pada sel dimana sel netrofil terlihat lebih gelap / coklat dibandingkan sel netrofil yang lain.

2. Kelompok Kontrol Positif. Perbesaran 400x



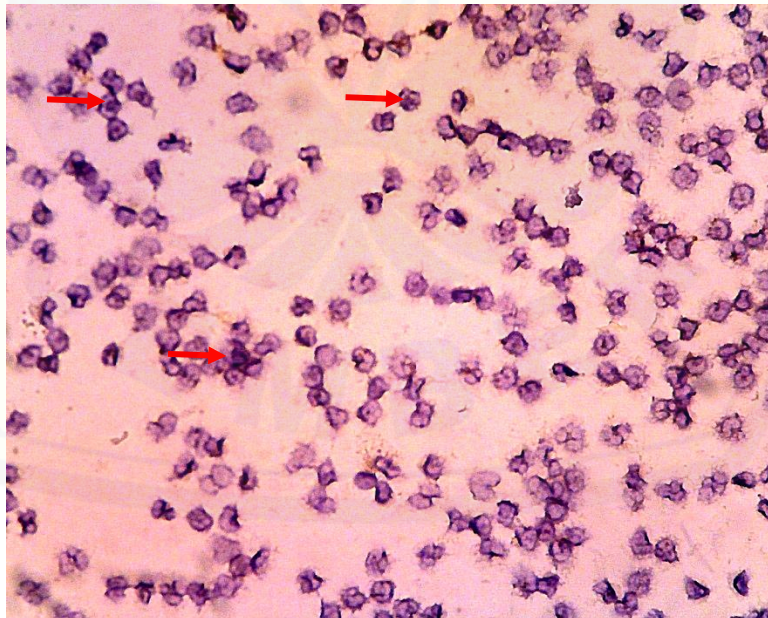
Panah merah menunjukkan adanya ekspresi COX-2 pada sel dimana sel netrofil terlihat lebih gelap / coklat dibandingkan sel netrofil yang lain.

3. Kelompok Konsentrasi 3,13%. Perbesaran 400x



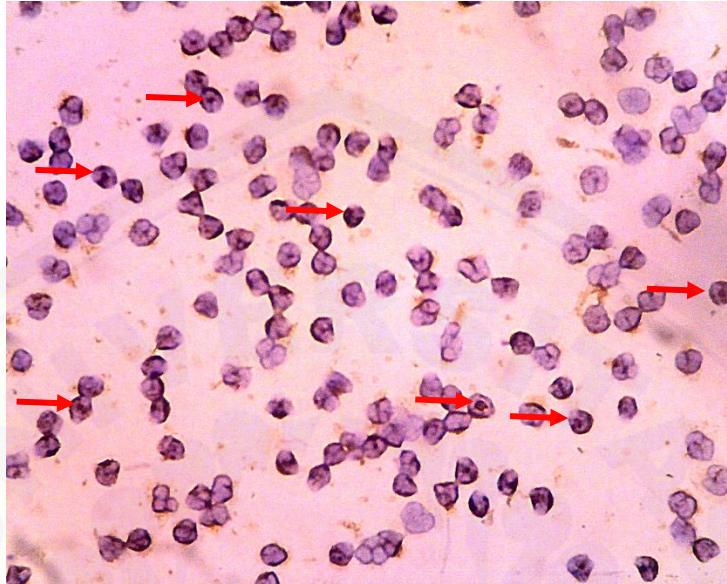
Panah merah menunjukkan adanya ekspresi COX-2 pada sel dimana sel netrofil terlihat lebih gelap / coklat dibandingkan sel netrofil yang lain.

4. Kelompok Konsentrasi 6,25%. Perbesaran 400x



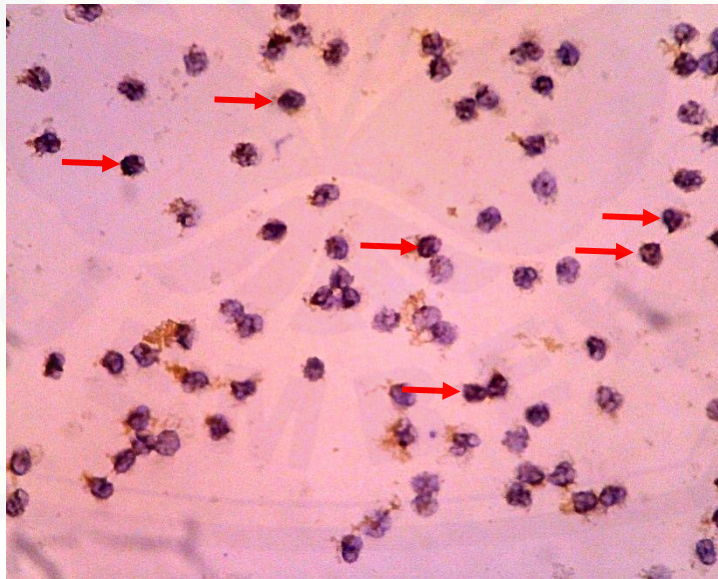
Panah merah menunjukkan adanya ekspresi COX-2 pada sel dimana sel netrofil terlihat lebih gelap / coklat dibandingkan sel netrofil yang lain.

5. Kelompok Konsentrasi 12,5%. Perbesaran 400x



Panah merah menunjukkan adanya ekspresi COX-2 pada sel dimana sel netrofil terlihat lebih gelap / coklat dibandingkan sel netrofil yang lain.

6. Kelompok Konsentrasi 25%. Perbesaran 400x



Panah merah menunjukkan adanya ekspresi COX-2 pada sel dimana sel netrofil terlihat lebih gelap / coklat dibandingkan sel netrofil yang lain.

G. HASIL UJI STATISTIK

1. Hasil Uji Normalitas *Kolmogrov-Smirnov*

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Konsentrasi 25%	Konsentrasi 12.5%	Konsentrasi 6.25%	Konsentrasi 3.13%	Kontrol positif	Kontrol negatif
N		3	3	3	3	3	3
Normal Parameters ^a	Mean	7.4500	5.2833	4.6000	3.9000	22.6500	8.1667
	Std. Deviation	.48218	.67144	.72629	1.79652	4.63977	.41932
Most Extreme Differences	Absolute	.328	.330	.194	.329	.227	.364
	Positive	.234	.330	.194	.329	.227	.364
	Negative	-.328	-.236	-.182	-.235	-.190	-.262
Kolmogorov-Smirnov Z		.567	.572	.336	.569	.393	.630
Asymp. Sig. (2-tailed)		.904	.899	1.000	.903	.998	.822

a. Test distribution is Normal.

2. Hasil Uji Homogenitas *Levene test*

Test of Homogeneity of Variances

Nilai				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
2.065	5	18	.118	

3. Hasil Uji beda *One Way Anova*

ANOVA

Nilai					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	991.235	5	198.247	17.458	.000
Within Groups	204.401	18	11.356		
Total	1195.635	23			

4. Hasil Uji LSD

Multiple Comparisons

Nilai LSD	(I) konsentrasi	(J) konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
						Konsentrasi 25%	Konsentrasi 12.5%
	Konsentrasi 6.25%	2.83500	2.38281	.250	-2.1711	7.8411	
	Konsentrasi 3.13%	3.55250	2.38281	.153	-1.4536	8.5586	
	Kontrol Positif	-15.19750*	2.38281	.000	-20.2036	-10.1914	
	Kontrol negatif	-.71500	2.38281	.768	-5.7211	4.2911	
Konsentrasi 12.5%	Konsentrasi 25%	-2.16750	2.38281	.375	-7.1736	2.8386	
	Konsentrasi 6.25%	.66750	2.38281	.783	-4.3386	5.6736	
	Konsentrasi 3.13%	1.38500	2.38281	.568	-3.6211	6.3911	
	Kontrol Positif	-17.36500*	2.38281	.000	-22.3711	-12.3589	
	Kontrol negatif	-2.88250	2.38281	.242	-7.8886	2.1236	
Konsentrasi 6.25%	Konsentrasi 25%	-2.83500	2.38281	.250	-7.8411	2.1711	
	Konsentrasi 12.5%	-.66750	2.38281	.783	-5.6736	4.3386	
	Konsentrasi 3.13%	.71750	2.38281	.767	-4.2886	5.7236	
	Kontrol Positif	-18.03250*	2.38281	.000	-23.0386	-13.0264	
	Kontrol negatif	-3.55000	2.38281	.154	-8.5561	1.4561	
Konsentrasi 3.13%	Konsentrasi 25%	-3.55250	2.38281	.153	-8.5586	1.4536	
	Konsentrasi 12.5%	-1.38500	2.38281	.568	-6.3911	3.6211	
	Konsentrasi 6.25%	-.71750	2.38281	.767	-5.7236	4.2886	
	Kontrol Positif	-18.75000*	2.38281	.000	-23.7561	-13.7439	
	Kontrol negatif	-4.26750	2.38281	.090	-9.2736	.7386	
Kontrol Positif	Konsentrasi 25%	15.19750*	2.38281	.000	10.1914	20.2036	
	Konsentrasi 12.5%	17.36500*	2.38281	.000	12.3589	22.3711	
	Konsentrasi 6.25%	18.03250*	2.38281	.000	13.0264	23.0386	
	Konsentrasi 3.13%	18.75000*	2.38281	.000	13.7439	23.7561	

	Kontrol negatif	14.48250*	2.38281	.000	9.4764	19.4886
Kontrol negatif	Konsentrasi 25%	.71500	2.38281	.768	-4.2911	5.7211
	Konsentrasi 12.5%	2.88250	2.38281	.242	-2.1236	7.8886
	Konsentrasi 6.25%	3.55000	2.38281	.154	-1.4561	8.5561
	Konsentrasi 3.13%	4.26750	2.38281	.090	-.7386	9.2736
	Kontrol Positif	-14.48250*	2.38281	.000	-19.4886	-9.4764

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

