



**POTENSI EKSTRAK POLIFENOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea robusta*)  
SEBAGAI ANTIINFLAMASI TERHADAP DAYA ADHESI SEL  
NEUTROFIL YANG DIINDUKSI BAKTERI *Porphyromonas gingivalis***

**SKRIPSI**

Oleh

**Muhammad Sandy Irianto**

**141610101026**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**



**POTENSI EKSTRAK POLIFENOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea robusta*)  
SEBAGAI ANTIINFLAMASI TERHADAP DAYA ADHESI SEL  
NEUTROFIL YANG DIINDUKSI BAKTERI *Porphyromonas gingivalis***

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Muhammad Sandy Irianto**

**NIM 141610101026**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**

## PERSEMBAHAN

Dengan segenap kerendahan hati skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah Subhanahu Wa Ta'ala, yang tiada henti-hentinya mencurahkan berkat, kasih dan rahmat-Nya sehingga saya berkesempatan untuk menimba ilmu di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. Kedua orang tuaku, bapak Bambang Irianto dan ibu Rachmawati serta adik-adikku Maulana Rafael dan Astrid Salsabila. Terima kasih telah memberikan cinta, kasih sayang, perhatian, dukungan, semangat, dan doa serta pengorbanan yang tak terhingga selama ini;
3. Guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah membagi ilmu, membimbing, dan mendidikku dalam banyak hal;
4. Almamater tercinta Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

## MOTO

“Dan memberinya rezeki dari arah yang tiada disangka-sangkanya. Dan barangsiapa yang bertawakkal kepada Allah niscaya Allah akan mencukupkan (keperluan)nya. Sesungguhnya Allah melaksanakan urusan yang (dikehendaki)Nya. Sesungguhnya Allah telah mengadakan ketentuan bagi tiap-tiap sesuatu .”

(Q.S. Ath-Thalaaq: 3)<sup>\*)</sup>

“Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.”

(Q.S. Asy-Syarh: 8)<sup>\*)</sup>

---

\*) Departemen Agama RI. 2008. Al-Qur'an Terjemahan Indonesia Inggris. Solo: Qomari.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Sandy Irianto

NIM : 141610101026

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Potensi Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Sebagai Antiinflamasi terhadap Daya Adhesi Sel Neutrofil yang Diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* ” 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 26 April 2018

Yang menyatakan,

Muhammad Sandy Irianto

NIM 141610101026

**SKRIPSI**

**POTENSI EKSTRAK POLIFENOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea robusta*)  
SEBAGAI ANTIINFLAMASI TERHADAP DAYA ADHESI SEL  
NEUTROFIL YANG DIINDUKSI BAKTERI *Porphyromonas gingivalis***

Oleh:

Muhammad Sandy Irianto

NIM 141610101026

Pembimbing

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

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

**PENGESAHAN**

Skripsi yang berjudul " Potensi Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Sebagai Antiinflamasi terhadap Daya Adhesi Sel Neutrofil yang Diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis* " telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : April 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Utama

Penguji Anggota

Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti, M.Si

NIP. 196705021997022001

drg. Happy Harmono, M.Kes

NIP. 196709011997021001

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota

drg. Tantin Ermawati, M.Kes

NIP. 198003222008122003

drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

NIP. 198005272008122002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember,

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

NIP. 196901121996011001

## RINGKASAN

**Potensi Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Sebagai Antiinflamasi terhadap Daya Adhesi Sel Neutrofil yang Diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*; Muhammad Sandy Irianto; 141610101026; 2018; 67 Halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.**

*Porphyromonas gingivalis* merupakan salah satu penyebab utama terjadinya penyakit periodontal. Sel radang yang berperan penting dalam mengeliminasi dan memfagositosis *P. gingivalis* adalah neutrofil. Fagositosis oleh sel neutrofil diawali dengan proses adhesi. Sel neutrofil hanya mampu memfagositosis 3 sampai 20 bakteri sebelum sel neutrofil itu sendiri menjadi inaktif dan lisis. Lisisnya sel neutrofil menyebabkan pelepasan cairan intraseluler yang dapat merusak jaringan sekitarnya sehingga respon inflamasi menjadi meningkat. Oleh sebab itu, adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil perlu dihambat sehingga respon inflamasi dapat terkontrol. Polifenol biji kopi robusta berperan sebagai antiinflamasi dengan menghambat adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta (*Coffea robusta*) sebagai antiinflamasi terhadap daya adhesi sel neutrofil terhadap bakteri *P. gingivalis*.

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris *in vitro* dengan rancangan penelitian dengan kelompok kontrol (*The Post Test Only Control Group Design*). Neutrofil sebagai sampel penelitian didapat dari isolasi darah vena subyek yang memenuhi kriteria dan dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu: kelompok kontrol (tanpa diberi ekstrak polifenol biji kopi robusta), kelompok perlakuan 1 (diberi ekstrak polifenol biji kopi robusta 3,125%), kelompok perlakuan 2 (diberi ekstrak polifenol biji kopi robusta 6,25%), kelompok perlakuan 3 (diberi ekstrak polifenol biji kopi robusta 12,5%), dan kelompok perlakuan 4 (diberi ekstrak polifenol biji kopi robusta 25%). Setelah diberi ekstrak, sampel dipapar dengan *P. gingivalis*. Kemudian dilakukan pewarnaan Giemsa dan dilakukan penghitungan indeks adhesi. Data yang diperoleh dianalisis

statistik parametrik menggunakan uji *one way Anova*, didapatkan hasil variabel-variabel yang diuji memiliki perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ). Dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui perbedaan variabel antar kelompok perlakuan dan didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada variabel yang diuji kecuali pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa adhesi *P. gingivalis* dengan sel neutrofil pada kelompok kontrol memiliki rata-rata paling tinggi dibandingkan dengan kelompok yang diberikan ekstrak polifenol biji kopi robusta. Pada kelompok yang diberikan ekstrak polifenol biji kopi robusta dengan konsentrasi 25% memiliki keefektifan paling tinggi dalam menghambat adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil.

Polifenol ekstrak biji kopi robusta memiliki potensi dalam menurunkan daya adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil. Sel neutrofil mengadakan perlekatan dengan *P. gingivalis* melalui interaksi hidrofobik, karena sifat polifenol yang hidrofilik maka polifenol mampu menurunkan hidrofobisitas membran sel sehingga menghambat perlekatan. Sel neutrofil mampu memfagosit 3-20 bakteri kemudian akan lisis dan terjadi pengeluaran cairan intraselular yang akan merusak jaringan normal disekitarnya. Penurunan adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil menurunkan jumlah sel neutrofil yang lisis sehingga respon inflamasi menjadi terkontrol.

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak polifenol biji kopi robusta mampu menghambat adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil dan konsentrasi 25% merupakan konsentrasi yang paling efektif dalam menghambat adhesi dibandingkan konsentrasi yang lain.

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas anugrah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Sebagai Antiinflamasi terhadap Daya Adhesi Sel Neutrofil yang Diinduksi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*”, sebagai salah satu syarat penyelesaian program sarjana (S1) Jurusan Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Kedua orang tuaku, bapak Bambang Irianto dan ibu Rachmawati yang telah menyayangi dengan tulus, memelihara, mendidik, memberi semangat, dan selalu mengiringku dalam doa selama ini hingga kapanpun;
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp. Pros selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. drg. Tantin Ermawati, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah banyak meluangkan waktu, pikiran, serta perhatiannya dalam membimbing dan menuntun saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Terima kasih yang tak terhingga atas kesabaran dan bimbingannya selama ini;
4. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah banyak meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan motivasi bagi hidup saya. Terima kasih yang tak terhingga untuk kesabaran dan perhatiannya selama ini sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
5. Prof. Dr. Drg. IDA Ratna Dewanti, M.Si., selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Happy Harmono M.Kes., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan kritik dan saran serta telah memberikan waktu, perhatian, bimbingan, dan motivasinya hingga skripsi ini dapat terselesaikan;
6. drg. Nadie Fatimatuzzahro, M.Biomed., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi yang tak terhingga dalam perjalanan studi penulis selama menjadi mahasiswa;
7. Staf Laboratorium *Bioscience* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yaitu mas Erwan yang banyak membantu selama jalannya penelitian;

8. Seluruh dosen dan staf akademik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember atas dukungan, dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
9. Adik-adikku tersayang Maulana Rafael Irianto dan Astrid Salsabila Irianti serta keluarga besar atas segala kasih sayang, dukungan, semangat, dan doa yang diberikan;
10. Sahabat-sahabatku : Wawan, Recky, Rully, Randy, Ahmad, Baba, Gede, Huda, Landung, Malik, dan sahabat semanhaj lainnya yang tidak dapat saya sebutkan semua disini;
11. Sahabat satu proyek : Nico, Aini, dan Cibi;
12. Teman-teman HALU : Agya, Erlangga, Lulu, Popon, Ziyen, Putri, Dhystika;
13. Teman-teman LECI angkatan 2014 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
14. Semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang turut mendukung dalam doa dan memberikan motivasi.

Penulis juga menerima semua kritik dan saran yang membangun dari semua pihak untuk melengkapi dan menyempurnakan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Jember, 26 April 2018

Penulis

**DAFTAR ISI**

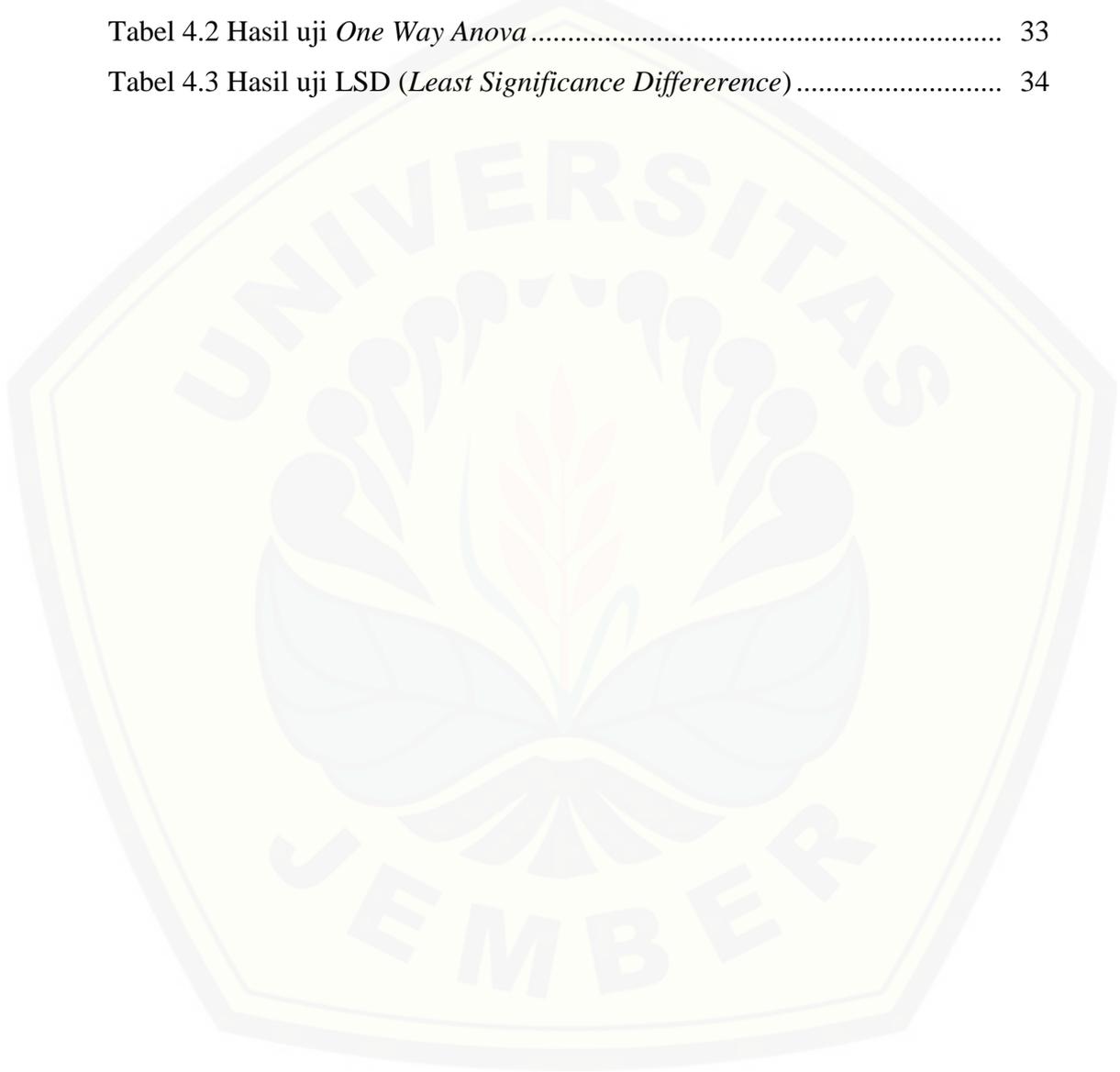
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Kopi Robusta</b> .....	5
2.1.1 Klasifikasi .....	5
2.1.2 Deskripsi Botani Kopi Robusta .....	5
2.1.3 Senyawa Kimia Kopi Robusta .....	6
2.1.4 Manfaat Biji Kopi Robusta .....	7
2.1.5 Senyawa Polifenol Biji Kopi Robusta .....	7
<b>2.2 Neutrofil</b> .....	9
2.2.1 Morfologi Neutrofil .....	9
2.2.2 Mekanisme Neutrofil dalam Pertahanan Tubuh .....	11
<b>2.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i></b> .....	13

2.3.1	Klasifikasi .....	13
2.3.2	Karakteristik .....	13
2.3.3	Mekanisme Perlekatan Dinding Sel Bakteri dengan Sel Inang ...	14
<b>2.4</b>	<b>Mekanisme Adhesi .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5</b>	<b>Kerangka Konseptual .....</b>	<b>17</b>
2.5.1	Penjelasan Kerangka Konseptual .....	18
<b>2.6</b>	<b>Hipotesis .....</b>	<b>19</b>
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Jenis Penelitian .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Rancangan Penelitian .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Waktu dan Tempat Penelitian .....</b>	<b>20</b>
3.3.1	Waktu Penelitian .....	20
3.3.2	Tempat Penelitian .....	20
<b>3.4</b>	<b>Identifikasi Variabel Penelitian .....</b>	<b>20</b>
3.4.1	Variabel Bebas .....	20
3.4.2	Variabel Terikat .....	20
3.4.3	Variabel Terkendali .....	20
<b>3.5</b>	<b>Definisi Operasional Penelitian .....</b>	<b>21</b>
3.5.1	Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta .....	21
3.5.2	<i>P. gingivalis</i> .....	21
3.5.3	Neutrofil .....	21
3.5.4	Indeks Adhesi .....	21
<b>3.6</b>	<b>Sampel Penelitian .....</b>	<b>22</b>
3.6.1	Kriteria Isolat Neutrofil .....	22
3.6.2	Kriteria Biji Kopi Robusta .....	22
3.6.3	Jumlah Sampel .....	22
3.6.4	Penggolongan Sampel Penelitian .....	23
<b>3.7</b>	<b>Alat dan Bahan .....</b>	<b>23</b>

3.7.1 Alat .....	23
3.7.2 Bahan .....	23
<b>3.8 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>24</b>
3.8.1 Ethical Clearance .....	24
3.8.2 Sterilisasi Alat .....	24
3.8.3 Persiapan Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta .....	24
3.8.4 Pengenceran Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta .....	25
3.8.5 Pembuatan RPMI dan Medium Complex .....	26
3.8.6 Isolasi Neutrofil .....	26
3.8.7 Inkubasi Neutrofil dengan Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta ..	27
3.8.8 <i>P. gingivalis</i> .....	28
3.8.9 Uji Adhesi.....	28
<b>3.9 Analisis Data .....</b>	<b>29</b>
<b>3.10 Alur Penelitian .....</b>	<b>30</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Hasil Penelitian .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 Analisis Data Penelitian .....</b>	<b>33</b>
4.2.1 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas .....	33
<b>4.3 Pembahasan .....</b>	<b>34</b>
<b>BAB 4. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>38</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>38</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>39</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>45</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 4.1 Nilai rata-rata indeks adhesi <i>P. gingivalis</i> pada sel neutrofil.....	32
Tabel 4.2 Hasil uji <i>One Way Anova</i> .....	33
Tabel 4.3 Hasil uji LSD ( <i>Least Significance Difference</i> ) .....	34



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 Tanaman buah kopi robusta .....	6
Gambar 2.2 Gambaran mikroskopis neutrofil.....	9
Gambar 2.3 Silsilah sel darah.....	9
Gambar 2.4 Gambaran mikroskopis <i>P. gingivalis</i> .....	14
Gambar 2.5 Struktur yang berperan dalam proses adhesi.....	15
Gambar 2.6 Kerangka konseptual .....	17
Gambar 3.1 Alur penelitian.....	30
Gambar 4.1 Adhesi <i>P. gingivalis</i> pada sel neutrofil.....	31
Gambar 4.2 Diagram batang rata-rata indeks adhesi .....	32

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran A. Foto Alat dan Bahan Penelitian .....	45
Lampiran B. Prosedur Isolasi Neutrofil .....	51
Lampiran C. Prosedur Uji Adhesi .....	55
Lampiran D. Hasil Pengamatan .....	56
Lampiran E. Hasil Penghitungan Adhesi .....	60
Lampiran F. Analisis Data Penelitian .....	62
Lampiran G. Surat Keterangan Identifikasi Biji Kopi Robusta .....	64
Lampiran H. Surat Keterangan <i>Ethical Clearance</i> .....	65
Lampiran I. Surat Keterangan Identifikasi Bakteri .....	66
Lampiran J. Informed Consent.....	67

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan penyakit yang banyak diderita oleh manusia hampir di seluruh dunia dan prevalensinya mencapai 60% pada masyarakat di Indonesia (Depkes RI, 2011). Salah satu faktor penyebab utama terjadinya penyakit periodontal adalah bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Widyastuti, 2009). *P. gingivalis* merupakan bakteri berpigmen hitam obligat anaerob gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki lapisan dinding sel yang lebih kompleks dibandingkan bakteri gram positif baik secara struktur maupun kimianya. Dinding bakteri *P. gingivalis* mengandung tiga komponen yang terletak pada lapisan luar yaitu peptidoglikan, lipoprotein, dan lipopolisakarida (Brooks, 2012).

Bakteri *P. gingivalis* dapat menyebabkan inflamasi pada jaringan periodontal baik secara langsung melalui enzim proteolitiknya maupun secara tidak langsung sebagai respon *host* terhadap keberadaan *P. gingivalis* yang dianggap sebagai benda asing. Respon *host* yang berinteraksi dengan *P. gingivalis* pada penyakit periodontal dengan cara mengeluarkan berbagai macam sel radang. Salah satu sel radang yang berperan sebagai respon imun *host* terhadap adanya suatu jejas adalah neutrofil (Newman dkk., 2012).

Neutrofil merupakan sel leukosit terbanyak di jaringan periodontal yang berfungsi untuk menjaga imunitas tubuh terhadap infeksi (Rasuna, 2010). Neutrofil berperan penting dalam memfagositosis dan eliminasi bakteri *P. gingivalis*. Fagositosis merupakan proses penghancuran dan eliminasi bakteri yang dilakukan oleh sel fagosit. Fagosit memiliki protein antibakterial yang disimpan didalam granula lisosom yang toksik terhadap sel fagosit itu sendiri dan jaringan sekitarnya (Abbas dkk., 2015).

Fagositosis diawali dengan Bergeraknya sel neutrofil menuju daerah infeksi untuk melakukan perlekatan dengan bakteri yang disebut dengan kemotaksis. Perlekatan bakteri dengan neutrofil tersebut dikenal sebagai proses adhesi (Santosaningsih, 2003). Adhesi adalah perlekatan antara dua zat yang

memiliki perbedaan jenis dan struktur (Amanda, 2010). Proses adhesi dipermudah oleh adanya opsonisasi yaitu pelapisan bakteri oleh opsonin sehingga lebih mudah dikenali oleh sel neutrofil. Bakteri melakukan adhesi dengan sel neutrofil melalui reseptor yang terdapat pada membran neutrofil. Selain itu melalui interaksi hidrofobik antara partikel hidrofob pada membran *P. gingivalis* dengan membran sel neutrofil (Pratiwi, 2012).

Bakteri *P. gingivalis* selanjutnya akan difagositosis oleh sel neutrofil. Sebuah sel neutrofil dapat memfagositosis 3 sampai 20 bakteri sebelum sel neutrofil itu sendiri menjadi inaktif dan lisis (Pratiwi, 2012). Lisisnya sel neutrofil disebabkan oleh produksi asam susu yang meningkat selama proses fagositosis. Peningkatan produksi asam susu mengakibatkan penurunan pH pada cairan jaringan sehingga sel neutrofil mengalami lisis (Grossman, 1995). Lisisnya sel neutrofil menyebabkan pelepasan cairan intraseluler yang dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan sekitarnya sehingga respon inflamasi menjadi meningkat (Nussbaum, 2011).

Dewasa ini untuk mengatasi suatu penyakit lebih ditujukan pada respon imun tubuh penderitanya. Cara ini dapat dilakukan dengan memberikan bahan imunomodulator, yaitu bahan yang dapat membantu memperbaiki sistem imun penderita yang dapat diperoleh dengan memberikan bahan imunogenik dari tanaman obat. Selain itu efek samping obat-obatan kimia yang seringkali menimbulkan masalah baru yang tak kalah berat menjadi salah satu alasan yang mendorong berkembangnya pengobatan tradisional (Thomas, 2012).

Salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai obat adalah kopi. Tanaman kopi banyak dijumpai di kota Jember dan merupakan sentra produksi terbanyak (Ermawati, 2014). Tanaman kopi yang banyak dikenal ada dua jenis, yaitu kopi arabika dan kopi robusta. Dari total produksi kopi di Indonesia, produksi kopi robusta mencapai 93% sedangkan kopi arabika sebesar 7% (Ditjenbun, 2009).

Tanaman kopi banyak mengandung polifenol terutama pada bagian bijinya. Biji kopi robusta mengandung jumlah polifenol lebih banyak dibandingkan pada biji kopi arabika (Ferrazzano dkk., 2011). Polifenol merupakan senyawa fenol yang terdiri dari asam fenolat dan flavonoid yang

memiliki efek antiinflamasi (Daniswara, 2008). Polifenol bersifat hidrofilik dan berperan sebagai antiinflamasi dengan cara mengikat protein permukaan bakteri dan menurunkan hidrofobitas pada membran sel neutrofil sehingga menghambat adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil dan inflamasi menjadi terkontrol (Parhusip, 2010). Polifenol juga berperan sebagai imunomodulator untuk menekan atau mengurangi infeksi virus dan bakteri intraseluler (Block dan Mead, 2003).

Berdasarkan latar belakang di atas maka peneliti ingin mengetahui potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta (EPBKR) terhadap daya adhesi sel neutrofil yang diinduksi bakteri *P. gingivalis* dengan konsentrasi ekstrak 3,125%, 6,25%, 12,5%, dan 25%. Konsentrasi ini berdasarkan penelitian bahwa konsentrasi diatas 50% bersifat toksik sehingga menyebabkan kematian pada sel (Ermawati, 2014).

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta (*Coffea robusta*) sebagai antiinflamasi terhadap daya adhesi sel neutrofil yang diinduksi bakteri *P. gingivalis*?
2. Berapa konsentrasi ekstrak polifenol biji kopi robusta (*Coffea robusta*) yang efektif mempengaruhi daya adhesi sel neutrofil yang diinduksi bakteri *P. gingivalis*?

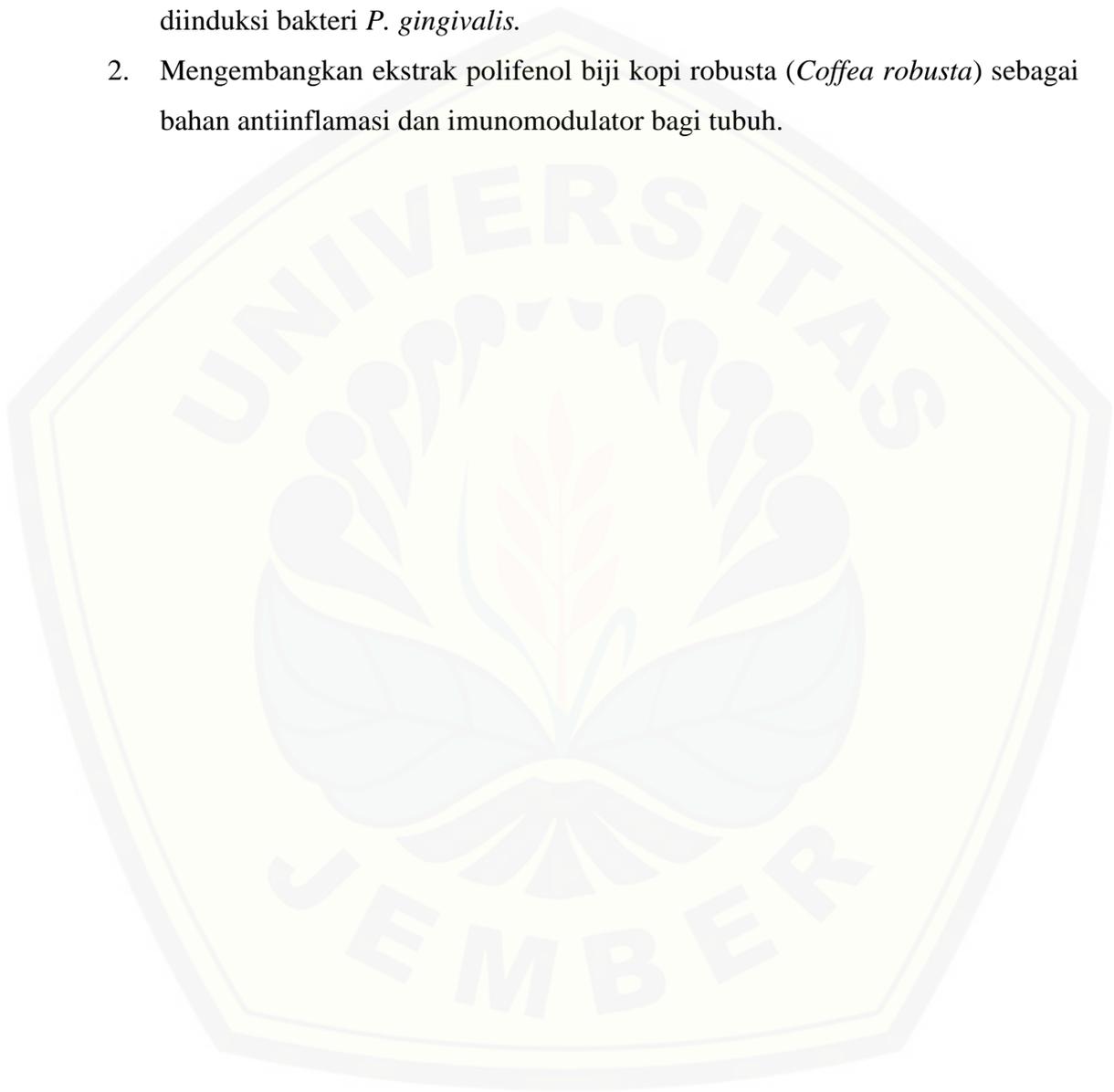
## 1.3 Tujuan

1. Mengetahui potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta (*Coffea robusta*) sebagai antiinflamasi terhadap daya adhesi sel neutrofil yang diinduksi bakteri *P. gingivalis*.
2. Mengetahui konsentrasi ekstrak polifenol biji kopi robusta (*Coffea robusta*) yang efektif mempengaruhi daya adhesi sel neutrofil terhadap bakteri *P. gingivalis*.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan pengetahuan tentang potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta (*Coffea robusta*) sebagai antiinflamasi terhadap daya adhesi sel neutrofil yang diinduksi bakteri *P. gingivalis*.
2. Mengembangkan ekstrak polifenol biji kopi robusta (*Coffea robusta*) sebagai bahan antiinflamasi dan imunomodulator bagi tubuh.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kopi Robusta

#### 2.1.1 Klasifikasi

Taksonomi tanaman kopi robusta secara lengkap adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Phylum</i>
Divisi	: <i>Spermathophyta</i>
Sub Divisio	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Rubiales</i>
Genus	: <i>Coffea</i>
Spesies	: <i>Coffea canephora</i> (Chamidah, 2012).

#### 2.1.2 Deskripsi Botani Kopi Robusta

Kopi (*Coffea. sp*) merupakan salah satu komoditi terbesar kedua di dunia setelah minyak mentah. Tercatat ada sekitar 60 negara penghasil kopi dan Indonesia menjadi salah satu penghasil kopi terbanyak yang menempati urutan keempat dengan total produksinya mencapai 686.763 ton pada tahun 2007 (Yowanda, 2015). Kopi merupakan jenis tanaman tropis yang dapat tumbuh di mana-mana, kecuali tempat yang terlalu tinggi dengan suhu udara sangat dingin atau daerah-daerah tandus yang memang tidak cocok bagi kehidupan tanaman. Ada tiga jenis kopi yang berkembang di Indonesia, yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*), kopi robusta (*Coffea robusta*), dan kopi liberika (*Coffea liberica*). Akan tetapi umumnya petani menanam kopi jenis robusta, sementara kopi arabika hanya ditanam berkisar 10% (Chamidah, 2012).

Kopi robusta berasal dari Kongo dan masuk ke Indonesia pada tahun 1990. Kopi robusta adalah tanaman budidaya berbentuk pohon yang termasuk dalam family *Rubiaceae* dan genus *Coffea*. Kopi merupakan tanaman tahunan dengan pohon berbentuk semak tegak, dengan tinggi antara 2 sampai 5 meter. Pada pohon tersebut terdapat batang-batang yang agak tipis, tegak, dan berjumbai.

Daunnya berbentuk oval dengan panjang 10 sampai 15 cm dan lebarnya 4 sampai 6 cm. Warna daunnya hijau tua dengan sedikit berkerut dipermukaannya. Pohon kopi mulai berbuah 5 sampai 7 tahun setelah ditanam. Buah kopi memiliki permukaan yang licin dan kulit buah yang keras. Biasanya buah muda berwarna hijau tetapi berubah menjadi merah saat masak (Najiyati, 2009).



Gambar 2.1 Tanaman buah kopi jenis robusta (Chamidah, 2012)

### 2.1.3 Senyawa 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, 2011). Kadar polifenol pada biji kopi arabika bervariasi antara 6 - 7 %, sedangkan pada robusta sekitar 10 % (Septianus, 2011).

Kafein adalah senyawa kimia yang paling populer. Komposisi kafein pada kopi robusta adalah sebesar 2.0 gr/100 gr. Senyawa kimia biji kopi robusta yang lainnya adalah asam klorogenat. Kandungan asam klorogenat pada kopi robusta adalah sebesar 9.0 gr/100 gr. 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, 2014).

#### 2.1.4 Manfaat Kopi Robusta

Menurut Dr. J. Murdoch Ritchie dalam *The Pharmacological Basis of Therapeutic*, kafein yang terkandung dalam 1-2 cangkir kopi dapat meningkatkan detak jantung, menambah kecepatan berpikir dan inspirasi, menyembuhkan rasa kantuk dan kelelahan, peningkatan sensor stimuli dan reaksi motorik, melebarkan pembuluh darah, mendorong aliran sekresi cairan maupun sekresi padat dari dalam tubuh, sehingga badan terasa lebih segar (Ramanaviciene dkk., 2003).

Dalam jumlah yang wajar kafein dapat membantu pikiran, pekerjaan dan pergaulan. Jumlah yang tepat berbeda untuk setiap orang dan efek kafein pada tiap orang berbeda. Secara umum mengkonsumsi 2 sampai 4 cangkir kopi setiap hari memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Kafein banyak memiliki manfaat dan telah banyak digunakan dalam bidang obat-obatan dalam dunia medis. Kafein adalah senyawa kimia hasil metilasi xanthin dengan bentuk dasar heterosiklis yang memiliki sifat farmakologi, sehingga kafein juga dikenal dengan nama 1, 3, 7 trimetil xanthin. Kafein berfungsi untuk merangsang aktivitas susunan saraf dan meningkatkan kerja jantung sehingga jika dikonsumsi dalam jumlah berlebihan akan bersifat racun dengan menghambat mekanisme susunan saraf manusia. Kafein didalam kopi Robusta komposisinya 1,6-2,4%, memiliki peran penting dalam pengembangan pertahanan tubuh melawan bakteri dengan meningkatkan konsentrasi beberapa sel imunokompeten dan memperkuat aktivitas lisozim. Kandungan asam klorogenik dan asam kafein yang merupakan asam organik non-volatil mampu mencegah pertumbuhan bakteri Gram positif dan negatif, senyawa antibakteri tersebut bekerja dengan cara masuk ke dalam sel dan merusak struktur dinding sel bakteri (Ramanaviciene dkk., 2003).

#### 2.1.5 Senyawa Polifenol Biji 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 (Hattenschwiller, 2000).

Polifenol memiliki fungsi sebagai antiinflamasi yang telah dibuktikan baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Polifenol memiliki 3 sub kelas antara lain: flavonoid, asam fenolik, dan polifenol lainnya (non flavonoid). Flavonoid mempunyai 7 kelas utama yaitu antochyanin, proantochyanin, isoflavone, flavanone, flavonol, flavanol, dan flavone (Hamsari, 2010). Polifenol golongan flavonoid dapat menyebabkan perubahan struktur tersier protein pada permukaan bakteri. Senyawa tersebut menyisip pada sisi hidrofobik protein, sehingga mengakibatkan penurunan hidrofobisitas sel bakteri yang berinteraksi dengan *fimbriae* dan menyebabkan penggumpalan protein permukaan bakteri. Akibatnya protein ini kehilangan struktur hidrofobiknya dan mengakibatkan hidrofobisitas bakteri menurun. Penurunan hidrofobisitas ini akan mencegah terjadinya interaksi hidrofobik dari komponen permukaan bakteri dengan sel *host* sehingga menghambat adhesi bakteri pada sel *host* (Parhusip, 2004).

Polifenol juga berfungsi sebagai imunomodulator. Imunomodulator adalah substansi yang dapat memodulasi fungsi dan aktivitas sistem imun. Imunomodulator dibagi menjadi 3 kelompok: i) imunostimulator, berfungsi untuk meningkatkan fungsi dan aktivitas sistem imun, ii) imunoregulator, artinya dapat meregulasi sistem imun, dan iii) immunosupresor yang dapat menghambat atau menekan aktivitas sistem imun. Kebanyakan tanaman obat yang telah diteliti membuktikan adanya kerja imunostimulator, sedangkan untuk immunosupresor masih jarang dijumpai. Polifenol disini berperan sebagai imunostimulator untuk menekan atau mengurangi infeksi virus dan bakteri intraseluler (Block dan Mead, 2003).

## 2.2 Neutrofil

### 2.2.1 Morfologi Neutrofil

Neutrofil adalah leukosit granular matur polimorfonuklear (inti memiliki dua hingga lima lobus yang dihubungkan oleh benang kromatin tipis dan sitoplasma mengandung granula halus (Dorland, 2011). Neutrofil adalah fagosit utama dalam sirkulasi darah yang berfungsi mengenali, mencerna, dan menghancurkan mikroba.

Neutrofil juga disebut *polymorphonuclear leucocytes* (PMN) yang merupakan jenis leukosit terbanyak dalam sirkulasi darah yang berperan memediasi fase awal respon inflamasi (Susilawati, 2008).



Gambar 2.2 Gambaran mikroskopis neutrofil (Frankhauser, 2002)

Leukosit adalah sel darah yang mengandung inti, disebut juga sel darah putih. Rata-rata jumlah leukosit dalam darah manusia normal adalah  $5000-9000/mm^3$ , bila jumlahnya lebih dari  $10.000/mm^3$ , keadaan ini disebut leukositosis, bila kurang dari  $5000/mm^3$  disebut leukopenia. Leukosit terdiri dari dua golongan utama, yaitu agranular dan granular. Leukosit agranular mempunyai sitoplasma yang tampak homogen dan intinya berbentuk bulat atau berbentuk ginjal. Leukosit granular mengandung granula spesifik (yang dalam keadaan hidup berupa tetesan setengah cair) dalam sitoplasmanya dan mempunyai inti yang memperlihatkan banyak variasi dalam bentuknya (Effendi, 2003).

Ada enam macam leukosit (sel darah putih) yang secara normal ditemukan dalam darah. Keenam sel tersebut adalah neutrofil polimorfonuklear, eosinofil

polimorfonuklear, basofil polimorfonuklear, monosit, limfosit, dan sel plasma. Selain itu, terdapat sejumlah besar trombosit, yang merupakan pecahan dari tipe ketujuh sel darah putih yang dijumpai dalam sumsum tulang, yakni megakariosit.

Persentase normal dari sel darah putih kira-kira sebagai berikut:

1. Neutrofil polimorfonuklear	62,0%
2. Eusinofil polimorfonuklear	2,3%
3. Basofil polimorfonuklear	0,4%
4. Monosit	5,3%
5. Limfosit	30,0%
6. Trombosit	300.000/microliter darah

Sumber : Guyton dan Hall, 2008

Membran sel neutrofil berfungsi sebagai barier semipermeabel yang memungkinkan molekul yang berukuran kecil dapat keluar masuk ke dalam sel. Hasil pengamatan mikroskop elektron terhadap membran sel menunjukkan bahwa membran sel merupakan lipid bilayer (disebut sebagai *fluid-mosaic model*). Molekul penyusun utama adalah fosfolipid, yang terdiri dari bagian kepala yang polar (hidrofilik) dan dua ekor nonpolar (hidrofobik). Fosfolipid ini tersusun atas bagian nonpolar membentuk daerah hidrofobik yang diapit oleh daerah kepala yang pada bagian dalam dan luar membran. Komposisi membran sel adalah protein 55%, fosfolipid 25%, kolesterol 13%, lipid lain 4%, dan karbohidrat 3% (Guyton dan Hall, 2008).

Protein pada membran sel sebagian besar tersusun atas glikoprotein. Salah satunya terdiri dari protein integral yang memiliki fungsi sebagai reseptor. Dalam hal ini protein integral yang tersebar di membran sel berfungsi sebagai sarana penyampaian informasi mengenai lingkungan di luar ke dalam sel. Pada neutrofil reseptor ini berupa reseptor Fc (FcR) dan reseptor C3b (C3bR) yang berinteraksi dengan sebuah antibodi yang diangkut darah yaitu IgG dan sebuah komponen komplemen dari plasma darah yaitu C3b, yang melekat pada permukaan bakteri pada proses opsonisasi (Guyton dan Hall, 2008).

Neutrofil memiliki umur yang pendek, hanya beberapa hari. Terdapat granula yang mengandung sejumlah faktor bakterisidal. Granulosit (neutrofil) mengandung sedikitnya dua tipe granula, yaitu : (1) Azurofil atau granula primer dan (2) granula sekunder atau spesifik (Jawetz, 2005). Granula primer ini berdiameter 0,4 mikron mengandung lisozim, enzim hidrolitik lain, dan beberapa protein kationik serta defensin, suatu antimikroba. Granula yang sekunder atau spesifik mengandung laktoferin dan beberapa jenis enzim termasuk kolagenase. Kedua jenis granula ini penting dalam penghancuran benda-benda yang ditelan dan dalam pembunuhan mikroorganisme. Produksi dan pelepasan granulosit diduga dibawah pengendalian faktor seluler humoral (Jawetz, 2005).

#### 2.2.2 Mekanisme Neutrofil dalam Pertahanan Tubuh

Neutrofil merupakan sel pertahanan tubuh non spesifik yang pertama kali mengatasi adanya antigen dengan memfagosit antigen tersebut. Neutrofil berperan penting pada respon radang akut, dimana terjadi perubahan-perubahan vaskuler dan eksudasi. Beberapa jam setelah dimulai radang akut, terjadi peningkatan jumlah neutrofil dalam darah, kadang-kadang sampai empat hingga lima kali lipat dari jumlah normal. Hal ini disebabkan karena adanya mediator peradangan seperti histamin, bradikinin, serotonin, prostaglandin, beberapa produk sistem komplemen, dan produk reaksi pembuluh darah yang memasuki aliran darah kemudian ditranspor ke sumsum tulang guna menggerakkan neutrofil-neutrofil ke dalam sirkulasi untuk segera menuju daerah radang. Di dalam jaringan neutrofil memiliki sifat yaitu diapedesis, ameboid, kemotaksis, dan fagositosis (Guyton dan Hall, 2008).

Proses fagositosis diawali dengan migrasi neutrofil. Celah antara sel endotel pembuluh darah dilewati dengan cara diapedesis. Jadi walaupun ukuran celahnya jauh lebih kecil daripada besarnya sel, pada suatu ketika sebagian kecil sel tersebut meluncur dan berkonstriksi sesuai dengan ukuran celah tersebut. Kemudian selanjutnya neutrofil bergerak melalui jaringan dengan gerakan ameboid. Beberapa sel dapat bergerak dengan kecepatan sebesar 40  $\mu\text{m}/\text{menit}$ , beberapa kali panjangnya sendiri tiap menit (Guyton dan Hall, 2008).

Neutrofil menuju jaringan terinfeksi dengan cara merangkak dan diarahkan oleh suatu kemotaktik faktor (kemoatraktan) sehingga neutrofil akan bergerak ke arah konsentrasi kemoatraktan lebih tinggi. Kemoatraktan yang mengarahkan gerak neutrofil antara lain adalah produk bakterial, formil-methionil-leucocil-protein (F-MLP), lektin, komplemen C5a, kalikrein, dan faktor Hageman (Ferencik, 1993). Sejumlah zat kimia dalam jaringan menyebabkan leukosit bergerak mendekati atau menjauhi sumber zat kimia. Fenomena ini dikenal sebagai hasil kemotaksis. Hasil-hasil degenerasi jaringan yang meradang khususnya jaringan polisakarida dan salah satu hasil reaksi zat-zat kompleks yang dinamakan komplemen dapat menyebabkan neutrofil bergerak mendekati daerah peradangan. Selain itu sejumlah toksin bakteri juga dapat menyebabkan kemotaksis leukosit (Guyton dan Hall, 2008).

Kemotaksis tergantung dari adanya gradien konsentrasi zat kemotaksis. Konsentrasi paling besar tergantung pada sumber dan waktu zat menyebar dengan difusi menjauhi sumbernya, konsentrasinya berkurang sebanding jarak kuadrat. Pada sisi sel yang menjauhi zat kemotaktik, konsentrasinya lebih sedikit daripada tempat yang menuju sumber. Konsentrasi yang tersebar pada salah satu sisi menyebabkan pseudopodi menonjol ke arah sumber dari zat kemotoksik (Guyton dan Hall, 2008).

Setelah berada di lokasi di mana bakteri tersebut berada, akan terjadi perlekatan atau adhesi antara bakteri dengan neutrofil. Perlekatan tersebut dipermudah oleh proses opsonisasi, sehingga opsonin yang mengikat bakteri mudah melekat pada reseptornya di membran neutrofil. Setelah melekat, neutrofil akan membentuk pseudopodia yang dijulurkan di sekitar bakteri, mengelilingi bakteri dan berfusi membentuk vesikel vakuola fagosom. Membran yang menyelimuti bakteri, sedikit demi sedikit menjauh dari permukaan membran dan fagosom dimasukkan ke dalam sel. Bakteri yang berada dalam fagosom selanjutnya dibunuh oleh mekanisme bakterisidal (Ferencik, 1993).

Fungsi neutrofil yang paling penting adalah fungsi fagositosis. Sebenarnya fagositosis harus memilih zat yang akan difagosit, karena bila tidak, sebagian dari struktur tubuh sendiri akan dimakan. Sebuah sel neutrofil dapat memfagosit 5

sampai 20 bakteri sebelum sel neutrofil itu sendiri menjadi inaktif dan mati. Keberhasilan proses fagositosis dipengaruhi oleh faktor neutrofil, bakteri yang difagosit, dan lingkungan. Faktor neutrofil yakni umur sel, energi yang tersedia, integritas komponen seluler serta faktor kemotaktik. Faktor bakteri yang difagosit meliputi susunan dinding bakteri, kapsul, toksin, dan sifat permukaan bakteri. Faktor lingkungan yang mempengaruhi proses fagositosis adalah temperatur, pH, osmolaritas, komposisi ionik, dan tegangan antar permukaan (Wahyuningsih, 2009).

### 2.3 *Porphyromonas gingivalis*

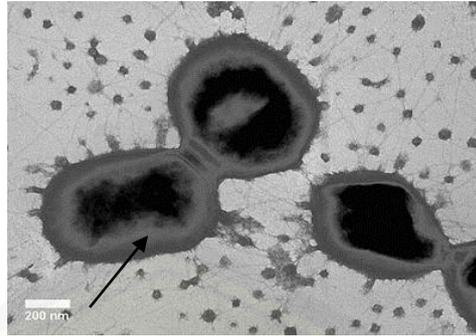
#### 2.3.1 Klasifikasi

Klasifikasi *P. gingivalis* yaitu:

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Bacteroidetes</i>
Class	: <i>Bacteroides</i>
Ordo	: <i>Bacteriodales</i>
Family	: <i>Porphyromonadaceae</i>
Genus	: <i>Porphyromonas gingivalis</i> (Naito dkk., 2008).

#### 2.3.2 Karakteristik

*P. gingivalis* merupakan bakteri obligat anaerob gram negatif yang berbentuk *coccobacilli* dengan panjang 0,5-2  $\mu\text{m}$ , tidak mempunyai alat gerak (*non motile*), dan tidak berspora (*non-spore forming*). *P. gingivalis* berukuran kecil dari 0,5-0,8 hingga 1,0-1,5  $\mu\text{m}$ , tetapi terkadang ada yang lebih panjang 4-6  $\mu\text{m}$ , hal ini mungkin disebabkan oleh perubahan bentuk *P. gingivalis* dapat tumbuh dengan optimal pada suhu 36,8-39°C dengan pH antara 7.5 sampai 8 (Samaranayake, 2002).



Gambar 2.3 Gambaran mikroskopis *P. gingivalis* dengan menggunakan mikroskop electron (MicrobeWiki, 2008)

### 2.3.3 Mekanisme Perlekatan Bakteri dengan Sel Inang

Bakteri mengadakan perlekatan dengan dengan sel inang dengan interaksi hidrofobik, yaitu perlekatan antara partikel hidrofobik (menolak air) pada membran sel bakteri dengan membran sel inang. Bakteri *P. gingivalis* juga difagosit melalui mekanisme awal perlekatan dengan bantuan opsonisasi oleh imunoglobulin dan aktivasi komplemen. Proses opsonisasi dimulai dengan melapisi partikel antigen (*P. gingivalis*) oleh antibodi (imunoglobulin) dan komponen komplemen sehingga lebih mudah terjadi perlekatan diantara *P. gingivalis* dan sel imun atau neutrofil, dimana membran neutrofil memiliki reseptor yang sesuai (Baratawidjaja, 2012).

Neutrofil berikatan dengan antigen melalui reseptor yaitu reseptor fraksi Fc antibodi dan komplemen yang diaktifkan. Reseptor Fc antibodi akan berikatan dengan antibodi (imunoglobulin) yang melekat pada antigen/bakteri, sedangkan reseptor komplemen yang diaktifkan akan berikatan dengan komplemen yang diaktifkan, dalam hal ini komplemen C3b (Rakhmawati, 2012).

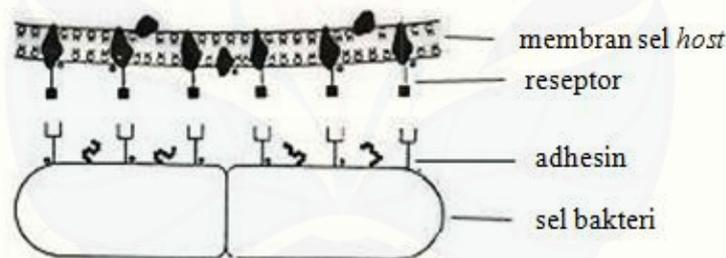
## 2.4 Mekanisme Adhesi

Kata *adhesive* berasal dari bahasa latin *adhaerere* yang berarti melekat. Secara terminologi, adhesi adalah suatu proses interaksi zat padat maupun cair dari suatu bahan atau *adherent* dengan bahan yang lain atau *adherend* pada sebuah *interface* atau penghubung. Adhesi berarti gaya tarik menarik atau daya

mengumpul antara molekul-molekul dari zat-zat yang tidak sejenis atau adhesi adalah perlekatan antara dua zat yang memiliki perbedaan jenis dan struktur (Amanda, 2010).

Proses adhesi merupakan tahap awal infeksi bakteri yang berperan dalam kolonisasi bakteri pada permukaan sel inang. Adhesi memperpendek jarak bakteri dengan permukaan sel inang sehingga mempermudah toksin dihasilkan oleh bakteri untuk melekat ke reseptornya. Adhesi dikenal dua bentuk yaitu adhesi bersifat non spesifik dan adhesi bersifat spesifik (Christensen, 1984).

Adhesi bakteri pada permukaan jaringan atau sel inang dapat terjadi apabila terdapat dua komponen, yaitu reseptor dan adhesin. Reseptor adalah komponen yang berupa residu peptida dan karbohidrat spesifik pada permukaan sel. Sedangkan adhesin bakteri adalah komponen makromolekul yang terdapat pada permukaan sel bakteri yang berinteraksi secara spesifik dengan reseptor sel inang, seperti *fimbriae*, *outer membran protein* (OMP), serta kapsul polisakarida (Santosaningsih, 2003).



Gambar 2.4 Struktur yang berperan dalam proses adhesi (Todara, 2008)

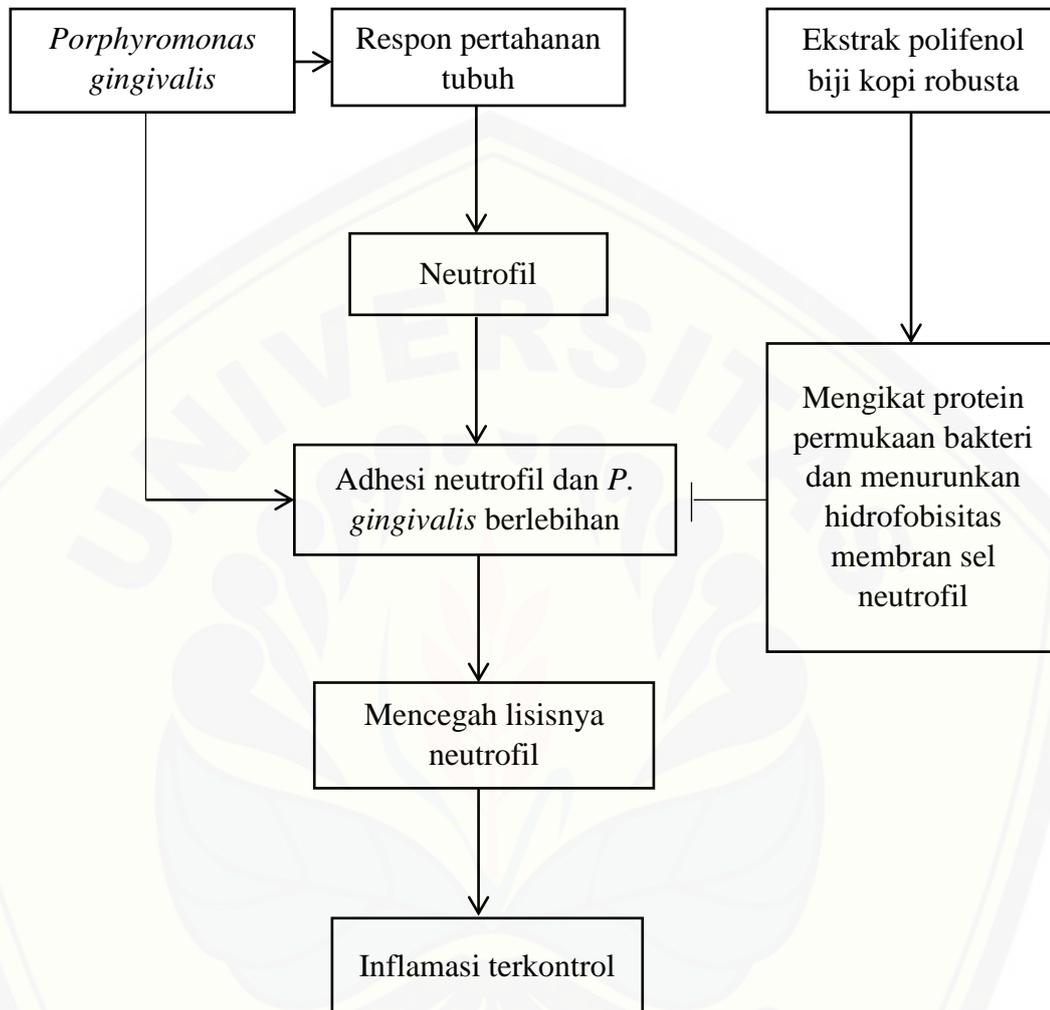
Perlekatan bakteri pada sel inang berfungsi sebagai penutup dan dapat merupakan langkah awal proses infeksi. Proses ini dipengaruhi oleh interaksi komponen permukaan bakteri dan sel inang dengan faktor lingkungan yang dapat mendukung, seperti *fibrinectin* (suatu protein yang bersifat adhesif), *fibrinogen*, *vitronektin* dan *laktoferin*. Struktur yang bertanggung jawab terhadap sifat adhesi bakteri adalah adhesin *fimbriae*, asam lipoteikoat dan protein adhesin. Interaksi yang terlibat dalam adhesi sebagian besar disebabkan oleh struktur permukaan hidrofob (Doyle, 1990). Bakteri mengadakan perlekatan dengan sel inang dengan

interaksi hidrofobik, yaitu perlekatan antara partikel hidrofobik (menolak air) pada membran sel bakteri dengan membran sel inang (Rakhmawati, 2012).

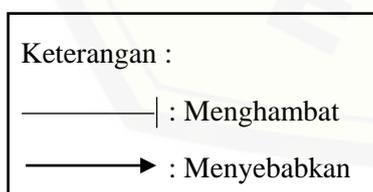
Sel neutrofil akan merespon adanya bakteri *P. gingivalis* yang masuk karena sel neutrofil aktif pada awal inflamasi yang diawali dengan proses perlekatan. Proses pelekatan ini terjadi karena adanya interaksi antara komponen permukaan bakteri dan sel inang. Proses adhesi dapat dibedakan dalam dua bentuk, yaitu bersifat spesifik dan stabil (*irreversible*) serta adhesi yang tidak spesifik dan labil (*reversible*) (Rakhmawati, 2012). Pada adhesi yang nonspesifik, perlekatan tidak melibatkan peran reseptor permukaan. Proses adhesi disebabkan karena adanya sifat hidrofobisitas agen dan perbedaan muatan listrik permukaan bakteri dengan permukaan sel inang sehingga perlekatan umumnya tidak kuat dan bersifat *irreversibel*. Sedangkan pada adhesi spesifik, perlekatan diperantarai oleh adhesin permukaan sel inang yang mampu berikatan dengan reseptor permukaan bakteri.

Semakin tinggi adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil dapat mengakibatkan sel neutrofil mengalami lisis dan menyebabkan pelepasan mediator inflamasi serta enzim proteolitik, pepsin, dan cathepsin, yang menyebabkan kerusakan pada jaringan sekitarnya sehingga respon inflamasi menjadi meningkat (Nussbaum, 2011). Hal ini ini dikarenakan sel neutrofil hanya mampu memfagositosis 3 – 20 bakteri kemudian sel neutrofil akan menjadi inaktif dan lisis (Pratiwi, 2012). Lisisnya sel neutrofil disebabkan oleh produksi asam susu yang meningkat selama proses fagositosis. Peningkatan produksi asam susu mengakibatkan penurunan pH pada cairan jaringan sehingga sel neutrofil mengalami lisis (Grossman, 1995).

## 2.5 Kerangka Konseptual



Gambar 2.5 Kerangka Konseptual



### 2.5.1 Penjelasan Kerangka Konseptual

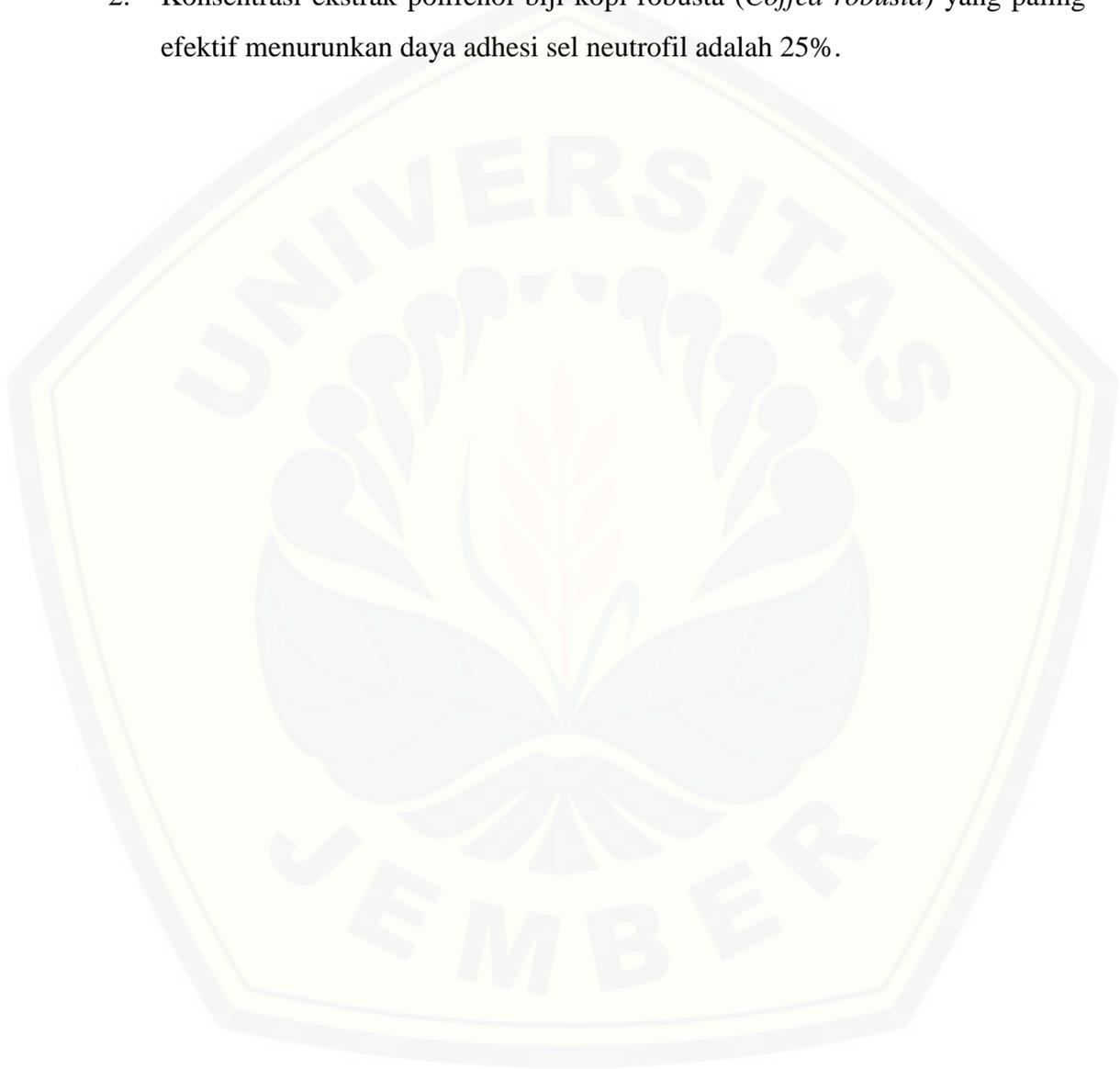
*P. gingivalis* merupakan salah satu penyebab utama terjadinya penyakit periodontal (Widyastuti, 2009). Respon *host* terhadap *P. gingivalis* dengan mengeluarkan beberapa sel radang salah satunya yaitu neutrofil (Newman, 2006). Neutrofil berperan penting dalam memfagositosis dan mengeliminasi *P. gingivalis*. Sel neutrofil akan bergerak menuju daerah inflamasi yang disebut dengan kemotaksis untuk mengadakan perlekatan atau adhesi dengan *P. gingivalis*. Adhesi tersebut dipermudah oleh proses opsonisasi yaitu pelapisan bakteri oleh opsonin sehingga mudah dikenali oleh sel neutrofil (Baratawidjaja, 2012). Adhesi ini melibatkan interaksi hidrofobik, yaitu interaksi antara adhesin pada *P. gingivalis* dengan reseptor pada membran sel neutrofil (Pratiwi, 2012).

Bakteri *P. gingivalis* selanjutnya akan difagositosis oleh sel neutrofil. Sebuah sel neutrofil dapat memfagositosis 3 sampai 20 bakteri sebelum sel neutrofil itu sendiri menjadi inaktif dan lisis (Pratiwi, 2012). Lisisnya sel neutrofil disebabkan oleh produksi asam susu yang meningkat selama proses fagositosis. Peningkatan produksi asam susu mengakibatkan penurunan pH pada cairan jaringan sehingga sel neutrofil menjadi lisis (Grossman, 1995). Lisisnya sel neutrofil menyebabkan pelepasan mediator inflamasi serta enzim proteolitik, pepsin, dan cathepsin, yang menyebabkan kerusakan pada jaringan sekitarnya sehingga respon inflamasi menjadi meningkat (Nussbaum, 2011).

Ekstrak polifenol biji kopi robusta dapat mengikat protein permukaan bakteri dan menurunkan hidrofobisitas membran sel neutrofil (Hamsari, 2010). Hal ini dapat menghambat adhesi *P. gingivalis* dengan sel neutrofil sehingga dapat mencegah kerusakan jaringan akibat lisisnya sel neutrofil dan inflamasi dapat terkontrol.

## 2.6 Hipotesis

1. Ekstrak polifenol biji kopi robusta (*Coffea robusta*) memiliki potensi sebagai antiinflamasi dengan menurunkan daya adhesi sel neutrofil yang diinduksi bakteri *P. gingivalis*.
2. Konsentrasi ekstrak polifenol biji kopi robusta (*Coffea robusta*) yang paling efektif menurunkan daya adhesi sel neutrofil adalah 25%.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris *in vitro*, yaitu penelitian yang dilakukan dengan memberi perlakuan terhadap variabel yang diteliti serta dilakukan di laboratorium.

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah penelitian dengan kelompok kontrol *The Post Test Only Control Group Design*, yaitu dilakukan pengukuran terhadap variabel yang diteliti setelah diberikan perlakuan, kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2012).

### 3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

#### 3.3.1 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2017

#### 3.3.2 Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang dan Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember.

### 3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak polifenol biji kopi robusta.

#### 3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah adhesi bakteri *P. gingivalis* terhadap sel neutrofil.

#### 3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini sebagai berikut:

- a. Waktu inkubasi

- b. Suhu inkubasi
- c. Konsentrasi ekstrak polifenol biji kopi robusta
- d. Konsentrasi suspensi bakteri *P. gingivalis*
- e. Isolat neutrofil

### 3.5 Definisi Operasional Penelitian

#### 3.5.1 Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta

Polifenol adalah substansi yang terkandung dalam biji kopi dan terdiri dari beberapa senyawa fenol. Pada penelitian ini, polifenol didapatkan dari biji kopi robusta yang berasal dari PTPN XII. Ekstrak polifenol biji kopi robusta berupa 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% .

#### 3.5.2 *Porphyromonas gingivalis*

*P. gingivalis* merupakan bakteri obligat anaerob gram negatif yang berbentuk *coccobacilli* dengan panjang 0,5 – 2 µm, tidak mempunyai alat gerak (*non motile*), dan tidak berspora (*non-spore forming*). *P. gingivalis* yang dipakai didapatkan dari Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember.

#### 3.5.3 Neutrofil

Neutrofil diambil dari darah vena perifer/ vena cubiti orang sehat atau yang tidak memiliki kelainan maupun riwayat penyakit sistemik, dengan kriteria laki laki dewasa, tidak memiliki penyakit sistemik, kelainan darah, dan tidak merokok. Isolasi neutrofil dilakukan dengan menggunakan teknik *gradient density* menggunakan bahan *Ficoll Hypaque Centrifugation*.

#### 3.5.4 Indeks Adhesi

Indeks adhesi adalah banyaknya bakteri yang melekat pada suatu sel dan dibuat rata-ratanya. Pada penelitian ini digunakan penghitungan indeks adhesi yaitu banyaknya *P. gingivalis* yang melekat pada sel neutrofil, baik neutrofil pada kelompok kontrol maupun neutrofil pada kelompok yang diberi perlakuan ekstrak, kemudian dibandingkan.

### 3.6 Sampel Penelitian

#### 3.6.1 Kriteria Isolat Neutrofil

Isolat neutrofil yang digunakan diambil dari darah subyek, yaitu orang sehat dengan kriteria laki-laki dewasa, tidak memiliki riwayat penyakit sistemik, kelainan darah dan kebiasaan merokok, serta bersedia mengisi *informed consent* sebagai tanda persetujuan bahwa darah yang diambil akan dijadikan sampel penelitian (Rakhmawati, 2012).

#### 3.6.2 Kriteria Biji Kopi

Kriteria biji kopi robusta yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Biji kopi robusta diperoleh dari PTPN XII
- b. Biji kopi mentah berwarna hijau kecoklatan
- c. Bentuknya tidak keriput

#### 3.6.3 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan menurut Budiarto (2002) 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

$\sigma$  = 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:

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

$$n = 1,96^2 = 3,84 \approx 4$$

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

#### 3.6.4 Penggolongan Sampel Penelitian

Sampel dibagi kedalam 5 kelompok, yaitu:

- K : (kontrol) sel neutrofil yang diinduksi *P. gingivalis* tanpa diberi ekstrak polifenol biji kopi robusta,
- P1 : sel neutrofil yang diberi ekstrak polifenol biji kopi robusta 3,125% kemudian diinduksi *P. gingivalis*,
- P2 : sel neutrofil yang diberi ekstrak polifenol biji kopi robusta 6,25% kemudian diinduksi *P. gingivalis*,
- P3 : sel neutrofil yang diberi ekstrak polifenol biji kopi robusta 12,5% kemudian diinduksi *P. gingivalis*,
- P4 : sel neutrofil yang diberi ekstrak polifenol biji kopirobusta 25% kemudian diinduksi *P. gingivalis*.

### 3.7 Alat dan Bahan

#### 3.7.1 Alat

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

#### 3.7.2 Bahan

Etanol Steril, Darah vena kapiler, *Double Ficoll Hypaque Gradien*, Biji Kopi Robusta, HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*), RPMI (*Rosewel Park Memorial Institute Media*), Medium complex (M119), *Methanol Absolute*, pewarna *Giemsa*, suspensi bakteri *P. gingivalis*.

### 3.8 Prosedur Penelitian

#### 3.8.1 *Ethical Clearance*

Sebelum dilakukan penelitian, mengurus perizinan pelaksanaan penelitian yang berupa *ethical clearance* ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

#### 3.8.2 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.

#### 3.8.3 Persiapan Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode sonikasi. Prosedur pembuatan ekstrak adalah sebagai berikut: biji kopi robusta ditimbang dengan timbangan dan diketahui berat dari biji kopi sebesar 721,1 gram. Kemudian biji kopi dioven dengan suhu 60°C selama 2 sampai 3 hari. Setelah dioven, biji kopi dimasukkan ke dalam *hammer mill* yang berfungsi untuk membuat biji kopi menjadi serbuk kopi. Kemudian 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 flavonoid murni. Cairan putih seperti susu dimasukkan kedalam alat sentrifugasi dengan putaran 4000 rpm selama 5 menit untuk mengendapkan partikel dari bubuk kopi sehingga didapatkan cairan seperti minyak. Cairan tersebut dikeringkan pada oven dengan suhu 60°C agar etanol menguap dan diapatkan dua lapisan yaitu pasta dan minyak. Sesudah didapatkan cairan minyak, ekstrak ditutup *falcon* dengan aluminium foil kemudian disimpan dalam lemari es.

### 3.8.4 Pengenceran ekstrak polifenol biji kopi robusta

Untuk mendapatkan berbagai konsentrasi yang diinginkan, maka pengenceran dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut (Rohaya, 2014):

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

Keterangan :

M1 : Kadar konsentrasi awal

M2 : Kadar konsentrasi akhir

V1 : Volume awal

V2 : Volume akhir

Adapun cara pengencerannya yaitu :

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

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

$$V1 = \frac{3,125 \times 4}{100}$$

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

Jadi ekstrak polifenol biji kopi robusta 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3,875 ml akuades steril ke dalam 0,125 ml ekstrak polifenol biji kopi robusta 100%.

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

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

$$V1 = \frac{6,25 \times 4}{100}$$

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

Jadi ekstrak polifenol biji kopi robusta 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3,75 ml akuades steril ke dalam 0,25 ml ekstrak polifenol biji kopi robusta 100%.

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

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

$$V1 = \frac{12,5 \times 4}{100}$$

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

Jadi ekstrak polifenol biji kopi robusta 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3,5 ml akuades steril ke dalam 0,5 ml ekstrak polifenol biji kopi robusta 100%.

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

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

$$V1 = \frac{25 \times 4}{100}$$

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

Jadi ekstrak polifenol biji kopi robusta 100% harus diencerkan dengan menambahkan 3 ml akuades steril ke dalam 1 ml ekstrak polifenol biji kopi robusta 100%.

### 3.8.5 Pembuatan RPMI dan Medium Complex

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

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

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

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

### 3.8.6 Isolasi Neutrofil

- Darah diambil dari vena cubiti sebanyak 6 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung heparin/Ka.EDTA kemudian dicampur sampai homogen.
- Setelah homogen, 3 ml larutan histopaque 1119 disiapkan lalu ditambahkan 3 ml lymphoprep secara perlahan-lahan melalui dinding tabung sehingga terbentuk 2 lapisan.
- Kemudian dilakukan *pipetting* 6 ml darah ke dalam tabung 2 lapisan tersebut secara perlahan-lahan melalui dinding tabung falcon sehingga terbentuk 3 lapisan (Histopaque 1119, Lymphoprep, dan darah).

- d. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 700 g selama 30 menit pada suhu 20°C.
- e. Kemudian terbentuk 6 lapisan (Plasma, Mononuclear, Lymphoprep, Polymorphonuclear, Histopaque 1119, dan eritrosit)
- f. Lapisan ke 4 Polymorphonuclear (cincin kabut) dilakukan *pipetting* dengan hati-hati kemudian dimasukkan ke dalam tabung steril.
- g. Setelah itu, sampel Polymorphonuclear diencerkan menggunakan PBS / HBSS (1 : 1) sampai homogen.
- h. Disentrifugasi dengan kecepatan 700 g selama 10 menit dengan suhu 20°C, dengan 3 kali pengulangan.
- i. Kemudian 1ml HBSS/ PBS pH 7.4 ditambahkan pada supernatan sampai homogen.
- j. Ditambahkan 5 µl *fungizone* dan 20 µl *Penicillin-streptomycin*.
- k. Setelah itu, Well Culture disiapkan kemudian *coverslip* steril dimasukkan pada masing-masing well sesuai yang dibutuhkan.
- l. Kemudian 100 µl supernatan hasil isolasi sel diteteskan pada *coverslip* yang sudah disiapkan.
- m. Inkubasi selama 20 – 30 menit pada suhu 37°C.
- n. Setelah diinkubasi, diambil dan ditambahkan 1 ml media kultur RPMI dan inkubasi lagi selama 20 – 30 menit pada suhu 37°C.
- o. Kemudian diamati di bawah mikroskop *inverted* dengan menggoyang secara perlahan untuk melihat penempelan selnya.
- p. Setelah diamati, dicuci menggunakan media RPMI sebanyak 3 kali dengan hati-hati untuk melepaskan kontaminasi sel.
- q. Diamati di bawah mikroskop *inverted* untuk melihat kontaminasi selnya.
- r. Setelah sel steril, media kultur diganti dengan menggunakan media kultur M199 kemudian sel siap untuk dilakukan perlakuan sel.

### 3.8.7 Inkubasi Neutrofil dengan Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta

Isolat neutrofil dalam well culture diinkubasi menggunakan *shaker incubator* selama 15 menit agar neutrofil melekat pada suhu 37°C mengandung

5% CO<sub>2</sub> kemudian dilakukan pengecekan dibawah mikroskop *inverted*. Setelah itu, neutrofil diresuspensi dengan 1000 µl RPMI, kemudian dibuang. Pada kelompok K neutrofil hanya diberi RPMI. Pada kelompok P1 ditambahkan 100 µl ekstrak polifenol biji kopi robusta dengan konsentrasi 3,125%. Pada kelompok perlakuan P2 ditambahkan ekstrak polifenol biji kopi robusta dengan konsentrasi 6,25%. Pada kelompok P3 ditambahkan ekstrak polifenol biji kopi robusta dengan konsentrasi 12,5%. Pada kelompok P4 ditambahkan ekstrak polifenol biji kopi robusta dengan konsentrasi 25%. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 sampel. Lalu dilakukan *pipetting* sampai neutrofil dan ekstrak homogen lalu diinkubasi selama 6 jam pada suhu 37° C. Kemudian diamati di bawah mikroskop *inverted* dengan melihat ketebalan dinding sel.

#### 3.8.8 *Porphyromonas gingivalis*

Bakteri *P. gingivalis* 100 µl ditambahkan sampai homogen. Setelah homogen, diamati perkembangan adhesi sel setiap jam dan dilakukan uji adhesi sel pada setiap kelompok. Setelah sel mulai banyak yang beradhesi, maka uji adhesi dihentikan. Sel difiksasi menggunakan methanol absolut selama 3 menit dan dikeringkan.

#### 3.8.9 Uji adhesi

Pengecatan dilakukan dengan perbandingan 1 : 4 menggunakan *buffer Giemsa*. Kemudian cat *Giemsa* ditetaskan pada *coverslip* yang terdapat sel. Didiamkan selama 5 menit setelah itu dilakukan pencucian dengan alkohol atau air mengalir dan dikeringkan. *Coverslip* siap untuk dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Penghitungan indeks adhesi dilakukan dengan cara menghitung jumlah bakteri yang melekat pada setiap sel yang dihitung pada 100 sel menggunakan mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400x kemudian dihitung rata-ratanya.

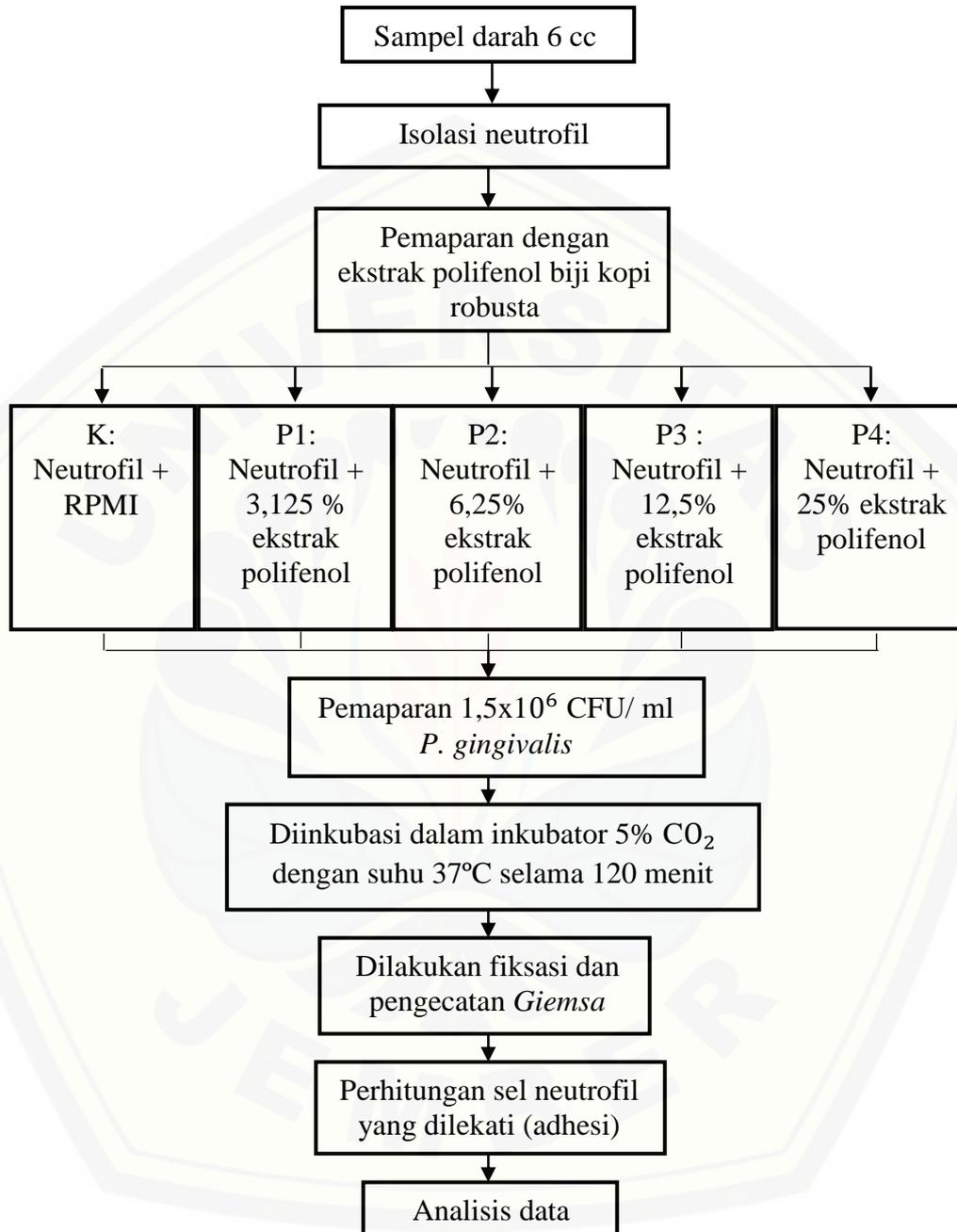
Penghitungan indeks adhesi dilakukan dengan rumus (Ningtyas, 2011):

$$\text{Indeks adhesi} = \frac{\text{Jumlah } P. \text{ gingivalis} \text{ yang melekat}}{\text{Jumlah total neutrofil yang dihitung (=100)}} \times 100\%$$

### 3.9 Analisis Data

Analisis data didahului dengan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas data menggunakan uji *Levene*. Dilanjutkan dengan uji statistik parametrik, yaitu uji *One Way Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok, kemudian dilanjutkan dengan uji *Least Significance Difference (LSD)* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna.

### 3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta (*Coffea robusta*) terhadap daya adhesi sel neutrofil yang diinduksi bakteri *P. gingivalis*

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak polifenol biji kopi robusta mampu menghambat adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil
2. Ekstrak polifenol biji kopi robusta dengan konsentrasi 25% paling efektif dalam menghambat adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil dibandingkan konsentrasi yang lain.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan saran yang dapat diberikan adalah sebagai berikut:

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta terhadap daya adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil dengan konsentrasi lain dibawah 50%.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aplikasi ekstrak polifenol biji kopi robusta sebagai obat untuk penyakit periodontal.
- c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi ekstrak polifenol biji kopi robusta terhadap respon neutrofil pada mikroflora lain yang bersifat patogen di rongga mulut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas A. K., Lichtman A. H., dan Pober J. S. 2015. *Celluler and Moleculer Immunology*, 8th Ed. Philadelphia: W. B Saunders Company.
- Amanda, L. 2010. *Sistem Adhesi Kedokteran Gigi*. www.respiratory.usu.ac.id. [17 Oktober 2010].
- Anusavice, K. J., 2004, *Phillips Buku Ajar Ilmu Bahan Kedokteran Gigi*, 10 th ed, Elsevier.
- Arifianti, L., Rice D. O., dan Idha K. 2014. *Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi terhadap Kadar Sinensetin dalam Ekstrak daun Orthosipon Stamineus Benth*. E-Journal Planta Husada. 2(1):1-4
- Aziz, Tamzil., Sendry F., dan Aris D. Mario. 2014. *Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Persen Yield Alkaloid dari Daun Salam India (Murraya koenigii)*. Palembang: Universitas Sriwijaya.
- Baratawidjaja, K.G. 2012. *Imunologi Dasar: Edisi Ketiga*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Black, J. M., Jacobs, E. M. 1993. *Medical Surgical Nursing 4th Edition*. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Block, K. I. and M. N. Mead. 2003. Immune system effects of Echinacea, Ginseng and Astragalus: A review. *Integrative cancer therapies*. 2(3): 247 – 267.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. 2012. Jawetz, melnick, & adelberg's *medical microbiology*. 25th Edition. Terjemahan Jakarta: EGC.
- Budiarto, E. 2002. *Biostatistik untuk Kedokteran dan Kesehatan Masyarakat*. Jakarta: EGC. 15-42.
- Chamidah, S. 2012. "*Daya Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (Coffea robusta) Terhadap Aktivitas Pertumbuhan Porphyromonas Gingivalis*". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Program Sarjana (S1) Universitas Jember.
- Christensen, G. D., Beachey, E. H. 1984. *The Molecular Basis For The Localization of Bacterial Infections*. Adv Intern Medicine.

- Cutler, C. W., J. R. Kalmar, and C. A. Genco. 1995. Pathogenic Strategies of Oral Anaerob *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol.* Vol. 45 (3).
- Daniswara, Nanda. 2008. *Perbandingan Efektivitas Air Perasan Buah Nanas (Ananas comosus (L.) Merr) 100%, Zinc Pyrithione 1% dan Ketokonazol 1 % Secara In Vitro Terhadap Pertumbuhan Pityrosporum ovale*. Skripsi. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Laporan Survey Kesehatan Rumah Tangga (SKRT)*. Jakarta: Badan Litbangkes.
- Ditjenbun (Direktorat Jenderal Perkebunan). 2009. *Statistik Perkebunan Kopi 2008-2010*. Jakarta: Ditjenbun.
- Dorland. 2011. *Kamus Saku Kedokteran Dorland*. Edisi 28. Alih Bahasa oleh Poppy Kumala, dkk. Jakarta: EGC.
- Dorward, D. A., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Haslett, C., and Dhaliwal, K. 2012. Imaging Inflammation: Molecular Strategies to Visualize Key Components of The Inflammatory Cascade, From Initiation to Resolution. *Pharmacol Ther.* 135: 182-199
- Doyle, Rosenberg. 1990. *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. New York: SocMicrobial.
- Effendi, Zukesti. 2003. *Peranan Leukosit sebagai Anti Inflamasi Alergik dalam Tubuh*. Sumatra Utara : Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatra Utara.
- Ermawati, T. 2014. *Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (Coffea robusta) terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  pada Tikus Periodontitis yang Diinduksi Porphyromonas gingivalis*. Jember: Universitas Jember.
- Farah, A. 2014. *Coffee Constituents*. Akses 11 Desember 2014. IFTPressBook. [www.ift.org](http://www.ift.org).
- Ferencik, M. 1993. *Handbook of Immunocemistry 1st Ed*. Melbourne: Glasgow.
- Ferrazzano, Amato, Ingenito, Natale, and Pollio. 2011. *Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: a Review*. *J. Mol.* 16: 1486-1507.
- Frankhauser, D. B. 2002. *Histologi of Circulatory System*. [online]. [http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Anatomy\\_&\\_Physiology/A&P203/Circulatory\\_System/Circulatory\\_Sys\\_Histology.htm](http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Anatomy_&_Physiology/A&P203/Circulatory_System/Circulatory_Sys_Histology.htm). [ 8 Februari 2012].

- Gaw, Mc. 2002. Periodontal Disease and Preterm Delivery of Low Birth Weight Infants. *J Can Dent Assoc.* Vol. 68(3): 165-9
- Grossman IL, Oliet S, Rio CED. 1995. *Ilmu Endodontik dalam Praktik*. Ed.11. Jakarta: EGC.
- Guyton, A.C., dan Hall, J.E. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran: Edisi 11*. Jakarta: EGC .
- Hamsari, Evan. 2010. *Teh Dapat Menghambat Pembentukan Karies Gigi*. <http://www.infogigi.com/kesehatan-gigi/teh-dapat-menghambat-pembentukan-karies-gigi.html>. [1 Juni 2011].
- Hattenschwiler, S dan Vitousek, P. M. 2000. *The Role of Polyphenols Interrestrial Ecosystem Nutrient Cycling. Review PII: S0169-5347(00)01861-9 TREE vol. 15*. 6 Juni 2000.
- Hideo, Y., Kazuyuki, I., Karsuji, O, A. 2001. *DNA Vaccine Induces Protective Immunity Infection by Porphyromonas gingivalis in a Murine Model Infection and Immunity*. Vol.69(5).
- Iriano, A. 2008. *Efek Antibakteri Infusum Aloe vera terhadap Porphyromonas gingivalis In Vitro (Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Infundasi)* [Skripsi S-1], Fakultas Kedokteran Gigi Program Studi Pendidikan Dokter Gigi. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Jawetz, Melnick dan Adelberg. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Katzung, B. G. 2001. *Farmakologi Dasar dan Klinik edisi pertama*. Salemba Medika. Jakarta.
- Khotimah, S. N. 2017. *Beberapa Tumbuhan Yang Mengandung Senyawa Aktif Inflamasi*. Sumedang: Universitas Padjajaran.
- Kriswandidi, L. I., Sumarno, I. G. W. Ardani. 2005. Karakterisasi Adesin *Fimbriae Streptococcus mutans* lokal yang Berperan Dalam Patogenesis Penyakit Karies Gigi. *Jurnal Penelitian Medika Eksakta*. 6(1) : 6-15.
- MicrobeWiki. 2008. (Online) *Porphyromonas* <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Porphyromonas>. (diakses tanggal 15 November 2017).

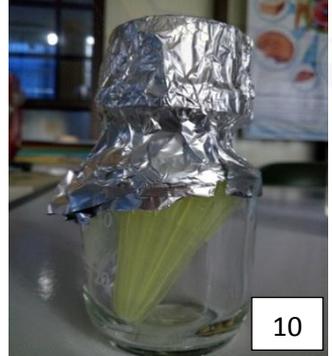
- Mubarokah, S. N., I Ketut G. M., dan Sumarno. 2009. 49.4 Kda Outer membrane Protein of *Porphyromonas gingivalis* is Hemagglutin and Adhesin Protein to Neutrophil. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 25 (2) : 48 - 59
- Naito M., Hirakawa H., Yamashita A., Ohara N., Shoji M., Yukitake H., et al. . (2008). *Determination of the genome sequence of Porphyromonas gingivalis strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in P. gingivalis*. *DNA Res.* 15, 215–225. 10.1093/dnares/dsn013 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Cross Ref](#)].
- Najiyati, S. dan Danarti. 2009. *Kopi: Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Newman, N. 2012. *Oral Microbiology for Dentistry Second Edition*. USA: W. B. Saunders Company.
- Ningtyas, T. 2011. *Inhibisi Ekstrak daun Beluntas terhadap Indeks Adhesi Streptococcus mutans pada Neutrofil*. Skripsi. Jember: Program Sarjana Universitas Jember.
- Notoadmodjo, Soekidjo. 2012. *Metodologi Penelitian Kesehatan Edisi Revisi*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Novak, I., P.Janeiro, M.Seruga, dan A.M. Oliveira - Brett. 2008. *Ultrasound Extracted Flavonoids from Four Varieties of Portuguese Red Grape Skins Determined by Reverse - Phase High - Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection*. *Analytica Chimica Acta* 630. Hlm 107 – 115.
- Nussbaum, G., Shapira, L. 2011. *How Has Neutrophil Research Improved Our Understanding of Periodontal Pathogenesis?*. *J. Clin Periodontol*.38 (Suppl.11) 49-59.
- Parhusip, A. 2004. Pengaruh Ekstrak Andaliman terhadap Hidrofobisitas Bakteri *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhimurium*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 2(2) : 1-10.
- Pratiwi, L. 2012. *Adhesi Porphyromonas gingivalis Pada Neutrofil Yang Diinkubasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (Hibiscus sabdariffa L.)*. Jember: Universitas Jember.
- Rakhmawati, N. Y. I. 2012. *Daya Adhesi Streptococcus Mutans Pada Netrofil Yang Diinkubasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao (Theobroma Cacao L.)*.Skripsi. Jember : Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

- Ramanaviciene, Almira, Mostovojus, Voktoras, Bachmatova, Iriana, dan Ramanavicius. 2003. *Anti-bacterial Effect on Caffeine on Eschericia coli and Pseudomonas floescens*. *Journal Acta Medica Lituania*. 10 (4): 185-188.
- Rohaya, S., Hariwati, L. R. W, dan H. Sujuti. 2014. Efek Pemberian Ekstrak Kulit Jeruk Keprok (*Citrus reticulata*) terhadap Cell-Cycle GI Arrest dan Apoptosis pada Sel Kultur Retinoblastoma. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 28(2): 68-73.
- Rodriguez, S.B. 2016. *Peptydilarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis expressed in Eschericia coli: Enzyme characterization and catalytic mechanism*.
- Sabir, A., Tabbu, C. R., Agustiono, P., dan Sosroseno, W. 2005. *Histological Analysis of Rat Dental Pulp Tissue Capped With Propolis*. Makassar: FKG UNHAS.
- Samaranayake, L. P. 2002. *Essential Microbiology For Dentistry*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, page 175, 217-223, 425-426, 719-720.
- Santosaningsih, D. 2003. Peranan Protein Fimbriae dan Lipopolisakarida terhadap Perlekatan Bakteri Enterohemorrhagic *Eschericia coli* (EHEC) 0157 pada Enterosit Kelinci secara in vitro: *Penelitian Eksperimental Laboratoris*. Tidak diterbitkan. Tesis. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Santoso, S. 2002. Protein Adhesin Salmonella Typhi sebagai Faktor Virulensi Berpotensi Imunogenik pada Produksi S-IGA Protektif. *Disertasi*. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Septianus, WS. 2011. *Komposisi Kimia Biji Kopi*. ([ws\\_septianus@yahoo.com](mailto:ws_septianus@yahoo.com). Diakses tanggal 22 Februari 2011).
- Susilawati, I.D.A. 2008. "*Induksi Porphyromonas gingivalis terhadap Aktivitas Kolagenolisis Neutofil pada Kolagen Tipe IV (Studi in vitro Mekanisme Kolagenolisis Plak Aterosklerotik)*". Tidak Diterbitkan. Disertasi. Malang: Program Doktor Ilmu Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Todar, Kenneth. 2008. *The Normal Bacterial Flora of Humans*. <http://www.textbookofbacteriology.net>. [1 September 2017].

- Thomas, A. N. S., 2012. *Tanaman Obat Tradisional*. Edisi 1. Cetakan ke-23. Yogyakarta: kanisius Hal. 134.
- Vilkhu, K., R. Mawson, L. Simons dan D. Bates. 2006. *Application and Opportunities For Ultrasound Assisted Extraction In The Food Industry (A Review)*. Food innovation: Emerging Science, Technologies & Application (FIESTA). Australia.
- Widyastuti, Ratih. 2009. *Periodontitis: Diagnosis dan Perawatannya*. Jurnal ilmiah dan Teknologi Kedokteran Gigi vol.6 no.1.
- Wijayanti, P. J. 2008. "*Karakterisasi Protein Adhesin OMP (Outer Membran Protein) 66,29 kDa Aeromonas salmonicida Terhadap Sel Epitel Usus Ikan Mas (cyprinus carpio l)*". Skripsi. Malang : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.
- Wilson, J. W., Schurr, M. J., LeBlanc, C. L., Ramamurthy, R., Buchanan, K. L., and Nickerson, C. A. 2002. Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. *Postgraduate Medical Journal* Vol. 78: 216-224.
- Yowanda, Ikhsan. 2015. *Perbandingan Daya Hambat Biji Kopi Robusta (Coffea canephora) dan Arabika (Coffea arabica) Terhadap Pertumbuhan Candida albicans*. Banda Aceh: FKG UNSYIAH.

Lampiran A. Foto Alat dan Bahan Penelitian

A.1 Alat Penelitian





13



14



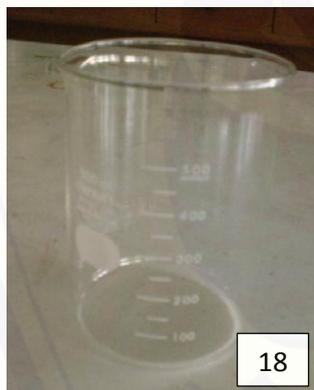
15



16



17



18



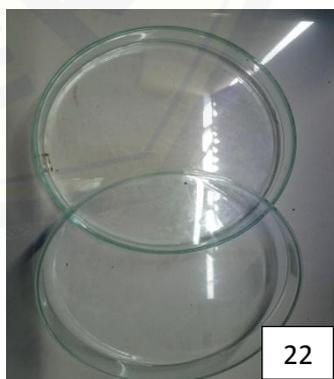
19



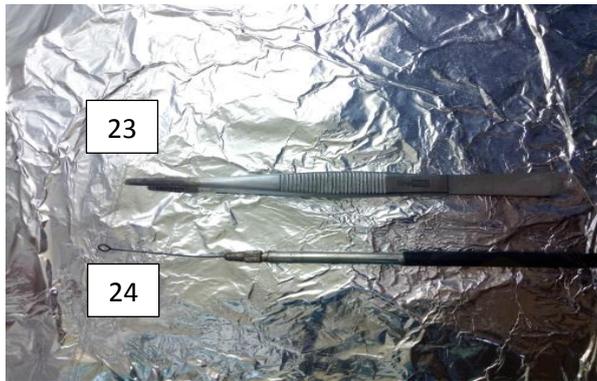
20



21



22



Keterangan:

- 1) Mikropipet
- 2) Tabung heparin
- 3) *Dyspossible syringe*
- 4) Tabung *centrifuge*
- 5) *Laminar flow cabinet*
- 6) *Torniquet*
- 7) *Centrifuge*
- 8) *Blue tip*
- 9) *Syringe filter*
- 10) *Yellow tip*
- 11) Densichek
- 12) Inkubator *shaker*
- 13) Tabung falcon
- 14) Oven

- 15) *Desikator*
- 16) Vortex
- 17) *Well plate*
- 18) *Becker glass*
- 19) Mikroskop *Inferted* yang tersambung dengan komputer
- 20) *Cover glass*
- 21) Toples kaca
- 22) Petridish
- 23) Pinset
- 24) Ose
- 25) *Coverslip*
- 26) *Handscoon*
- 27) Tisu
- 28) Masker



## A.2 Bahan Penelitian



Keterangan:

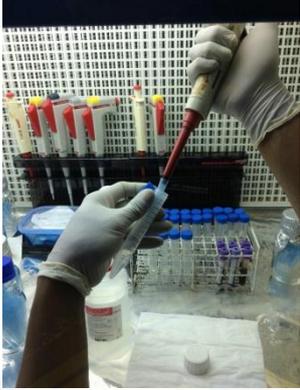
- 1) *Hank's Balance Salt Solution (HBSS)*
- 2) *Aquadest steril*
- 3) *Lymphoprep*
- 4) *Pewarna giemsa*
- 5) *Roswell Park Memorial Institute (RPMI)*
- 6) *Media 199 (M199)*

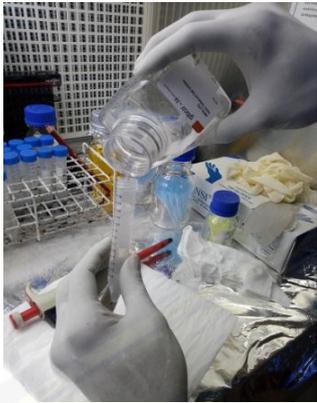
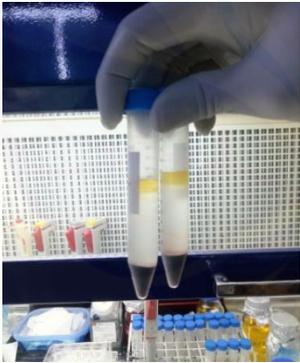
- 7) Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta
- 8) Methanol
- 9) Darah vena perifer
- 10) Etanol 96%
- 11) *Penicillin-streptomycin solution stabilized*
- 12) *Fungizone*

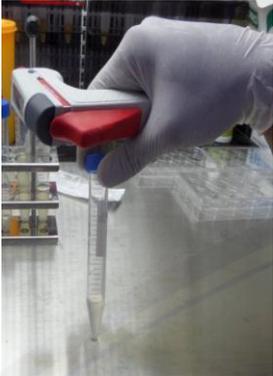


## Lampiran B. Prosedur Isolasi Neutrofil

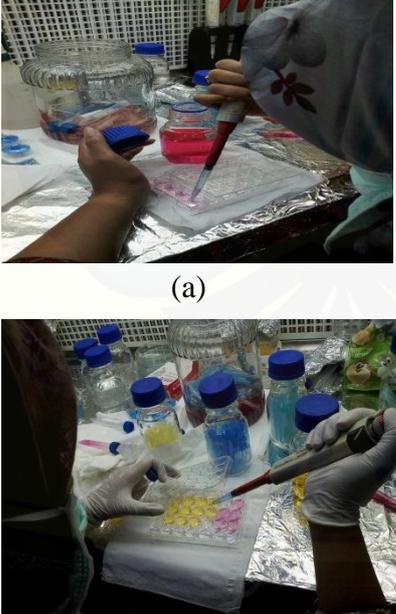
No	Gambar	Keterangan
1		Pengambilan darah vena perifer subyek sebanyak 6 cc dari menggunakan <i>dysposable syringe</i>
2		Darah dicampur dengan antikoagulan (heparin) dalam tabung heparin.
3		Memasukkan 3 ml larutan histopaque 1119 dalam tabung falcon

4		Menambahkan 3 ml larutan Lymphoprep
5		Darah dimasukkan ke dalam tabung falcon
6		Sentrifugasi dengan kecepatan 700 g selama 30 menit

7		<p>Lapisan PMN diambil, lalu dimasukkan kedalam tabung falcon lain dan ditambahkan HBSS dan dilakukan <i>pipetting</i> sampai homogen</p>
8		<p>Sentrifugasi dengan kecepatan 700 g selama 10 menit</p>
9		<p>Sentrifugasi menghasilkan 6 lapisan</p>
10		<p>Ambil lapisan yang mengandung neutrofil kemudian letakkan pada tabung falcon dan ditambahkan HBSS</p>

11		<p>Membuang lapisan atas. Ambil lapisan yang mengandung neutrofil kemudian letakkan pada tabung falcon</p>
12		<p>Ditambahkan antijamur yaitu <i>fungizone</i> sebanyak 5 <math>\mu</math>l dan antibakteri yaitu <i>penicillin-streptomycin solution stabilised</i> sebanyak 20 <math>\mu</math>l</p>

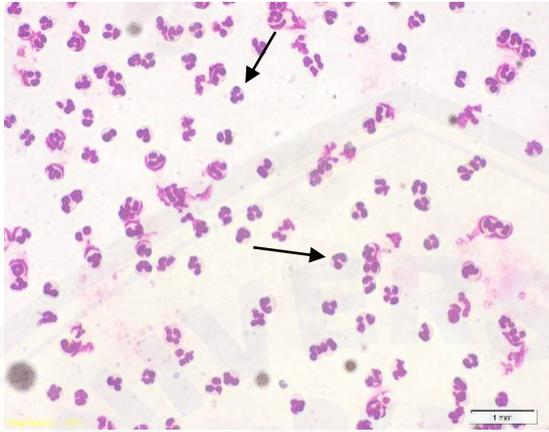
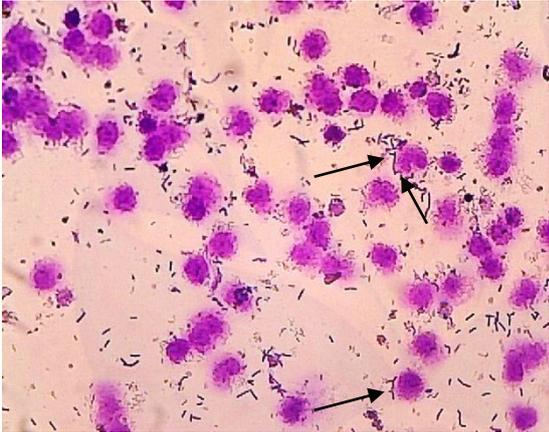
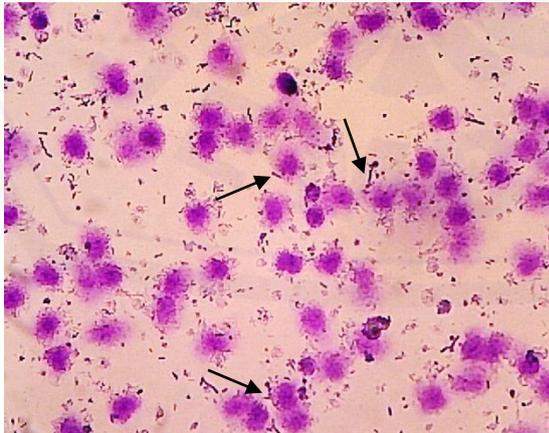
## Lampiran C. Prosedur Uji Adhesi

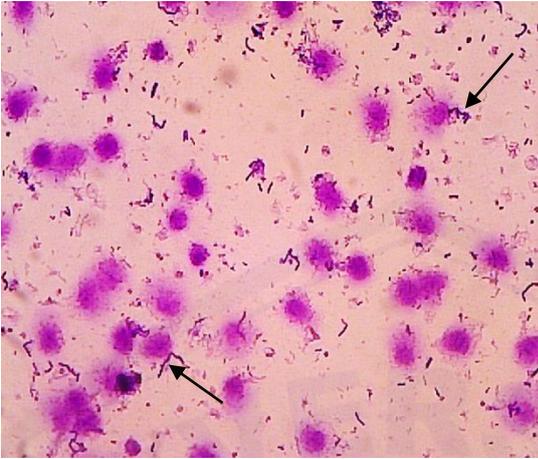
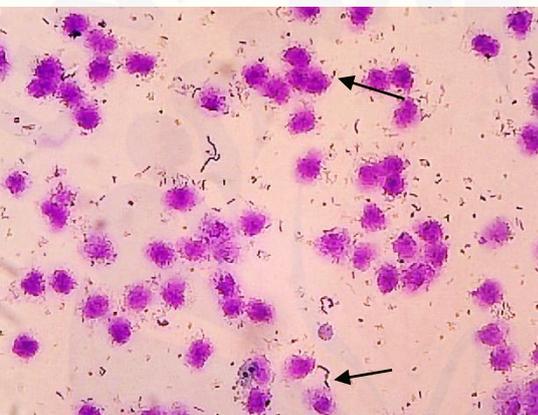
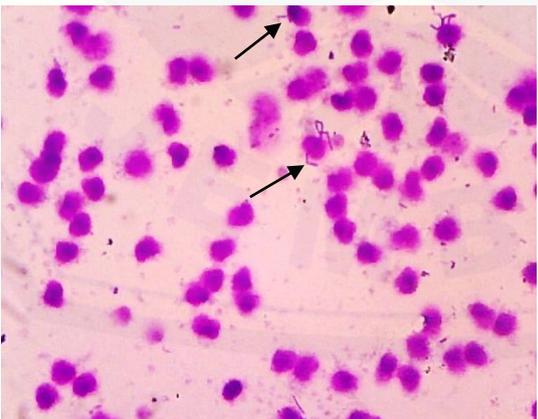
No	Gambar	Keterangan
1		<p>Neutrofil ditapiskan pada <i>coverslip</i> 100 <math>\mu</math>l kemudian diinkubasi dalam <i>shaker incubator</i> selama 20 menit 37<sup>0</sup>C</p>
2		<p>Dilakukan pengecekan di bawah mikroskop <i>inverted</i> dan diinkubasi lagi selama 30 menit pada suhu 37<sup>0</sup> C</p>
3	 <p>(a)</p> <p>(b)</p>	<p>(a) Pemberian larutan RPMI (b) Larutan RPMI diambil, lalu digantikan dengan media complete (M199) sebanyak 1000 <math>\mu</math>l</p>

4		<p>Ditambahkan ekstrak polifenol biji kopi robusta dengan konsentrasi 3,125%, 6,25%, 12,5%, dan 25% sebanyak 100 <math>\mu</math>l</p>
5		<p>Diinkubasi dengan <i>shaker incubator</i> selama 3 jam pada suhu 37°C</p>
6		<p>Medium inkubasi dibuang, dan digantikan dengan M199 sebanyak 1000 <math>\mu</math>l</p>
7		<p>Ditambahkan suspensi <i>P. gingivalis</i> 100 <math>\mu</math>l, diinkubasikan selama 4 jam dalam suhu 37°C, 5% CO<sub>2</sub></p>

8		Dilakukan pencucian dengan HBSS
9		Fiksasi dengan menggunakan metanol absolut, lalu metanol dibuang kemudian dikinginkan dengan posisi miring
10	 <p>(a)</p>  <p>(b)</p>	(a)Pengecatan dengan <i>Giemsa</i> (b)Cat <i>Giemsa</i> dibuang, dan dibilas dengan air mengalir lalu dilakukan pengeleman <i>coverslip</i> ke <i>object glass</i>

## Lampiran D. Foto Hasil Pengamatan

No	Gambar	Keterangan
1		<p>Isolat neutrofil. Tampak neutrofil memiliki nucleus dengan dua hingga lima lobus yang berwarna keunguan (tanda panah). Pengamatan dengan menggunakan mikroskop <i>inverted</i> (pengecatan Giemsa, perbesaran 400 kali).</p>
2		<p>Neutrofil yang tidak diinkubasi ekstrak polifenol biji kopi robusta (kelompok kontrol). Tanda panah menunjukkan neutrofil yang diadhesi <i>P. gingivalis</i> (Pengecatan Giemsa, perbesaran 400 kali)</p>
3		<p>Neutrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kopi robusta 3,125% (kelompok P1). Tanda panah menunjukkan neutrofil yang diadhesi <i>P. gingivalis</i> (Pengecatan Giemsa, perbesaran 400 kali)</p>

4		<p>Neutrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kopi robusta 6,25% (kelompok P2). Tanda panah menunjukkan neutrofil yang diadhesi <i>P. gingivalis</i> (Pengecatan Giemsa, perbesaran 400 kali)</p>
5		<p>Neutrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kopi robusta 12,5% (kelompok P3). Tanda panah menunjukkan neutrofil yang diadhesi <i>P. gingivalis</i> (Pengecatan Giemsa, perbesaran 400 kali)</p>
6		<p>Neutrofil yang diinkubasi ekstrak polifenol biji kopi robusta 25% (kelompok P4). Tanda panah menunjukkan neutrofil yang diadhesi <i>P. gingivalis</i> (Pengecatan Giemsa, perbesaran 400 kali)</p>

**Lampiran E. Hasil Penghitungan Adhesi**

## 1. Kelompok K (kontrol)

Sampel	Jumlah Neutrofil yang dilekati	Jumlah Neutrofil keseluruhan	Indeks Adhesi
A	87	100	0,87
B	93	100	0,93
C	88	100	0,88
D	90	100	0,90

## 2. Kelompok P1 (konsentrasi 3,125%)

Sampel	Jumlah Neutrofil yang dilekati	Jumlah Neutrofil keseluruhan	Indeks Adhesi
A	81	100	0,81
B	84	100	0,84
C	89	100	0,89
D	86	100	0,86

## 3. Kelompok P2 (konsentrasi 6,25%)

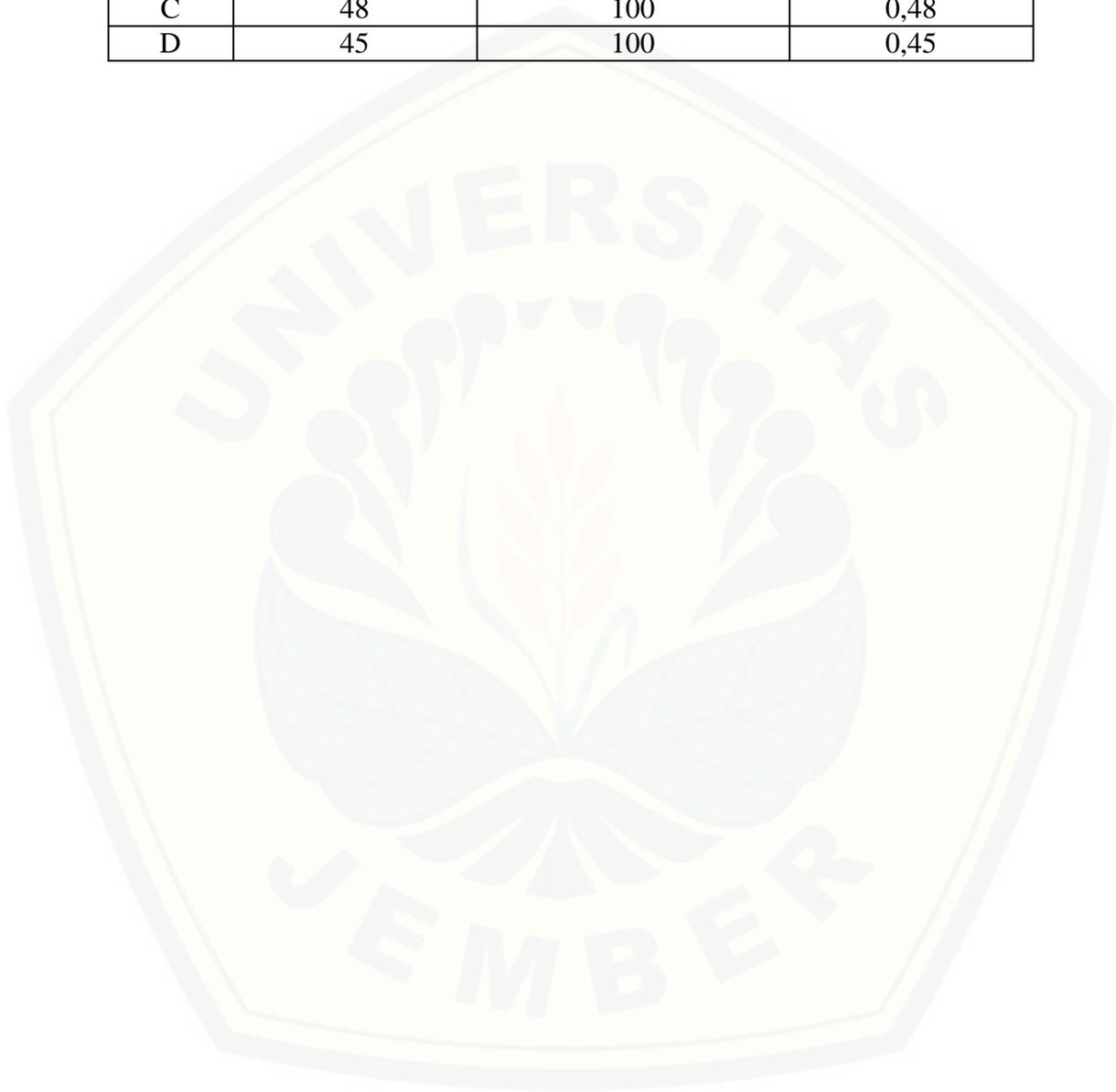
Sampel	Jumlah Neutrofil yang dilekati	Jumlah Neutrofil keseluruhan	Indeks Adhesi
A	65	100	0,65
B	68	100	0,68
C	76	100	0,76
D	71	100	0,71

## 4. Kelompok P3 (konsentrasi 12,5%)

Sampel	Jumlah Neutrofil yang dilekati	Jumlah Neutrofil keseluruhan	Indeks Adhesi
A	48	100	0,48
B	56	100	0,56
C	51	100	0,51
D	53	100	0,53

## 5. Kelompok P4 (konsentrasi 25%)

Sampel	Jumlah Neutrofil yang dilekati	Jumlah Neutrofil keseluruhan	Indeks Adhesi
A	41	100	0,41
B	38	100	0,38
C	48	100	0,48
D	45	100	0,45



## Lampiran F. Analisis Data Penelitian

### 1. Hasil Nilai Rata-Rata dan Standard Deviasi dengan SPSS 16

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Konsentrasi 3,13%	4	38.00	48.00	43.0000	4.39697
Konsentrasi 6,25%	4	48.00	56.00	52.0000	3.36650
Konsentrasi 12,5%	4	65.00	76.00	70.0000	4.69042
Konsentrasi 25%	4	81.00	89.00	85.0000	3.36650
Kontrol	4	87.00	93.00	89.5000	2.64575
Valid N (listwise)	4				

### 2. Hasil Uji Normalitas dengan menggunakan *Shapiro-Wilk*

Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Indeks Adhesi kontrol	.215	4	.	.946	4	.689
Konsentrasi 3,13%	.133	4	.	1.000	4	1.000
konsentrasi 6,25%	.166	4	.	.984	4	.925
konsentrasi 12,5%	.133	4	.	1.000	4	1.000
konsentrasi 25%	.269	3	.	.949	3	.567

a. Lilliefors Significance Correction

### 3. Hasil Uji Homogenitas dengan menggunakan *Levene Test*

Test of Homogeneity of Variances

Indeks Adhesi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.240	1	18	.630

4. Hasil Uji Beda dengan menggunakan Uji *One Way Anova**Anova*

Indeks Adhesi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4410.450	1	4410.450	38.291	.000
Within Groups	2073.300	18	115.183		
Total	6483.750	19			

5. Hasil Uji LSD (*Least Significance Difference*)

Multiple Comparisons

Indeks Adhesi

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	konsentrasi 3,13%	4.50000 <sup>*</sup>	3.04275	.160	-1.9855	10.9855
	konsentrasi 6,25%	19.50000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	13.0145	25.9855
	konsentrasi 12,5%	37.50000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	31.0145	43.9855
	konsentrasi 25%	44.75000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	38.2645	51.2355
konsentrasi 3,13%	Kontrol	-4.50000 <sup>*</sup>	3.04275	.160	-10.9855	1.9855
	konsentrasi 6,25%	15.00000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	8.5145	21.4855
	konsentrasi 12,5%	33.00000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	26.5145	39.4855
	konsentrasi 25%	40.25000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	33.7645	46.7355
konsentrasi 6,25%	Kontrol	-19.50000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	-25.9855	-13.0145
	konsentrasi 3,13%	-15.00000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	-21.4855	-8.5145
	konsentrasi 12,5%	18.00000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	11.5145	24.4855
	konsentrasi 25%	25.25000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	18.7645	31.7355
konsentrasi 12,5%	Kontrol	-37.50000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	-43.9855	-31.0145
	konsentrasi 3,13%	-33.00000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	-39.4855	-26.5145
	konsentrasi 6,25%	-18.00000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	-24.4855	-11.5145
	konsentrasi 25%	7.25000 <sup>*</sup>	3.04275	.031	.7645	13.7355
konsentrasi 25%	Kontrol	-44.75000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	-51.2355	-38.2645
	konsentrasi 3,13%	-40.25000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	-46.7355	-33.7645
	konsentrasi 6,25%	-25.25000 <sup>*</sup>	3.04275	.000	-31.7355	-18.7645
	konsentrasi 12,5%	-7.25000 <sup>*</sup>	3.04275	.031	-13.7355	-.7645

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

## Lampiran G. Surat Keterangan Identifikasi Biji Kopi Robusta

**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>

Kode Dokumen : FR-AUK-064  
Revisi : 0

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN**

No: 010/ PL17.3.1.02/LL/2018

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 0446/UN25.8/TL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Muhammad Sandy Irianto  
NIM : 141610101026  
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, 1 Maret 2018  
K. Laboratorium Tanaman  
  
Ir. Wilik Mastuti, MP  
NIP. 195808201987032001

Lampiran H. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

	<b>KOMISI ETIKA PENELITIAN</b>
	<b>FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA</b> 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

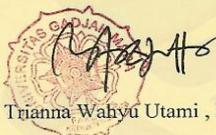
Unit/Lembaga : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

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, M.DSc., Ph.D	 Prof. Dr.drg. Pinandi Sri Pudyani, SU., Sp.Ort(K)

## Lampiran I. Surat Keterangan Identifikasi Bakteri


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

---

Nomor : 285/UN25.8.TL/2018  
 Perihal : Identifikasi Bakteri

05 APR 2018

Kepada Yth  
 Kepala Laboratorium Biomedik  
 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  
 Di  
 Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin identifikasi bakteri bagi mahasiswa kami dibawah ini :

1	Nama	: Muhammad Sandy Irianto
2	NIM	: 141610101026
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Mastrip II No.10 Jember
6	Judul Penelitian	: Potensi Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta (Coffea Robusta) Terhadap Daya Adhesi Sel Neutrofil Yang Diinduksi Bakteri Porphyromonas Gingivalis
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: -
9	Waktu	: Desember 2017 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Menganalisis Potensi Ekstrak Polifenol Biji Kopi Robusta (Coffea Robusta) Terhadap Daya Adhesi Sel Neutrofil Yang Diinduksi Bakteri Porphyromonas Gingivalis
11	Dosen Pembimbing	: 1. drg. Tantin Ermawati, M.Kes 2. drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an, Dekan  
 Wakil Dekan I,  
  
  
 Dr. drg. IIDA Susilawati, M.Kes  
 NIP. 196709031986022001

## Lampiran J. Informed Consent

**SURAT PERSETUJUAN**  
**INFORMED CONSENT**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

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

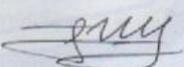
Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari :

Nama : Qurrotulaini Wahyu Pratiwi  
NIM : 141610101035  
Fakultas : Kedokteran Gigi  
Alamat : Ji. 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 )