



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SEDUHAN BUBUK KOPI
ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP PRODUKSI
RADIKAL SUPEROKSIDA MONOSIT IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh:

Prisca Vianda Sukma

NIM 141610101019

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SEDUHAN BUBUK KOPI
ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP PRODUKSI
RADIKAL SUPEROKSIDA MONOSIT IN VITRO**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh:

Prisca Vianda Sukma

NIM 141610101019

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SEDUHAN BUBUK KOPI
ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP PRODUKSI
RADIKAL SUPEROKSIDA MONOSIT IN VITRO**

Oleh:

Prisca Vianda Sukma

NIM 141610101019

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti M.Si

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

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, segala puji hanya milik Allah, karena atas ridho dan kehendak-Nya saya dapat menyelesaikan tugas akhir ini dengan lancar.
Terimakasih atas segala nikmat, augerah dan karunia-Mu Tuhan.
2. Nabi Muhammad SAW, tauladan bagi seluruh umat manusia.
3. Kedua orang tua tercinta, papa Drs. H. April Soesilo, M. Pd dan mama Dra. Hj. Sukayah yang telah memberikan kasih sayang, dukungan, doa yang tak pernah putus, dan pengorbanan yang tiada batas selama ini.
4. Bapak-Ibu guru sejak taman kanak-kanak, sampai SMA yang telah membimbing, mendidik, dan memberikan ilmu kepada saya.
5. Dosen-dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah membimbing, mendidik, dan memberikan ilmunya kepada saya.
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap”
(Terjemahan Q.S Al-Insyirah, 6-8)^{*)}

“Ridha Allah terletak pada ridha kedua orang tua dan murka-Nya terletak pada kemurkaan keduanya.”
(Hadist Riwayat Ath-Thabarani)

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 1989. Al-Quran dan Terjemahannya.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Prisca Vianda Sukma

NIM : 141610101019

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Produksi Radikal Superoksida Monosit In Vitro” adalah benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang saya sebut sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Dengan 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, 24 April 2018

Yang menyatakan,

Prisca Vianda Sukma

141610101019

PENGESAHAN

Karya ilmiah skripsi berjudul “Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Produksi Radikal Superoksida Monosit In Vitro” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Selasa, 24 April 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji Ketua

Penguji Anggota

drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes
NIP. 197608092005012002

drg. Dyah Indartin Setyowati, M.kes
NIP. 196809301997022000

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si
NIP. 196705021997022001

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

Mengesahkan

Dekan,

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

NIP 196901121996011001

RINGKASAN

Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Produksi Radikal Superoksida Monosit In Vitro; Prisca Vianda Sukma, 141610101019; 2018; 39 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Monosit merupakan salah satu jenis leukosit yang berperan dalam pertahanan pertama terhadap serangan mikroorganisme yang dapat membahayakan tubuh yaitu dengan fagositosis. Selama fagositosis mikroorganisme dapat dibunuh menggunakan melalui produk respiratory burst yakni radikal superoksida. Produksi radikal superoksida dalam jumlah yang berlebih dapat menyebabkan “stress oksidatif” dan kerusakan jaringan, seperti kerusakan dinding pembuluh darah, molekul protein, DNA, karbohidrat, dan lipid. Oleh karena itu diperlukan suatu antioksidan untuk dapat meredam produksi ROS yang berlebih. Antioksidan tersebut dapat diperoleh dari bahan alam yaitu biji kopi robusta. Biji kopi robusta mengandung senyawa kimia kafein, asam klorogenat, fenol, alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan trigonelin. Kandungan asam klorogenat dan polifenol biji kopi robusta merupakan sumber antioksidan terbesar. Tujuan penelitian ini adalah Mengkaji aktivitas antioksidan seduhan bubuk kopi robusta terhadap radikal superoksida monosit yang distimuli antigen bakterial.

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories*. Obyek penelitian ini adalah isolat monosit vena perifer manusia yang diberi perlakuan terhadap seduhan bubuk kopi robusta (*Coffea canephora*). Penelitian dilakukan pada bulan November 2017 – Februari Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Variabel bebas pada penelitian ini adalah seduhan bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen produksi PTPN XII. Dengan metode seduhan kopi dibuat dengan perbandingan 3 gr dan 6 gr bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen produksi PTPN XII dengan 200 ml aquades mendidih 99,9°C yang kemudian ditempatkan pada *hotplate stirrer* dengan kecepatan 60 rpm selama 1 menit, lalu didiamkan pada suhu ruangan selama 3-4 menit. Variabel terikat dalam

penelitian ini adalah aktivitas antioksidan pada seduhan bubuk kopi robusta. Penelitian ini menggunakan metode uji *Nitro Blue Tetrazolium* untuk melihat produksi radikal superoksida yang ditandai adanya produksi formazan pada sekitar membran monosit. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah isolat monosit yang berasal dari darah vena perifer yang dilakukan isolasi sehingga didapatkan jenis dan jumlah sel yang sama. Variabel terkontrol berikutnya adalah antigen *Streptococcus mutans* yaitu pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*. Pada penelitian ini dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok kopi 1 (isolat monosit, seduhan bubuk kopi robusta 6gr/200ml, antigen bakteri *Streptococcus mutans*), kelompok kopi 2 (isolat monosit, seduhan bubuk kopi robusta 3gr/200ml, antigen bakteri *Streptococcus mutans*, dan kelompok tanpa kopi (isolat monosit, antigen bakteri *Streptococcus mutans*).

Penghitungan radikal superoksida pada sel monosit yaitu penghitungan melalui intraseluler. Penghitungan intraseluler dilakukan dengan menghitung prosentase sel yang mengandung partikel formazan berwarna kebiruan. Berdasarkan hasil rata-rata produksi formazan pada ketiga kelompok didapatkan hasil pada kelompok kopi 1 dengan seduhan kopi sebanyak 6 gr sebesar 39,5%, kelompok kopi 2 dengan seduhan kopi sebanyak 3 gr sebesar 39,25%, dan kelompok tanpa seduhan kopi sebesar 51,25%. Hasil analisis statistik dengan Uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap nilai rata-rata produksi radikal superoksida adalah 0,139 yang artinya $p > 0,05$, data terdistribusi normal. Hasil homogenitas dengan uji *Levene Test* adalah 0,089 yang artinya $p > 0,05$ data homogen. Analisis Statistik Uji *One Way Anova* terhadap nilai rata-rata produksi radikal superoksida adalah terdapat perbedaan. Selanjutnya dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) sebagai uji beda lanjutan untuk mengetahui perbedaan kemaknaan pada masing-masing kelompok, dan terdapat perbedaan bermakna pada beberapa kelompok. Hal tersebut dikarenakan kopi mempunyai efek antioksidan yang dapat menghambat produksi radikal superoksida.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Produksi Radikal Superoksida Monosit In Vitro”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan tak lepas dari bimbingan, bantuan, serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Kedua orang tua penulis, Papa Drs. H. April Soesilo, M. Pd dan mama Dra. Hj. Sukayah terimakasih atas untaian doa, kasih sayang, nasehat, serta semangat yang selalu terurai senantiasa menjadikan motivasi.
2. drg. Rahardyan Panaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah memberikan bimbingan, saran, dan meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan;
3. Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, saran, dan meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan;
4. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, saran, dan meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan;
5. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes selaku Dosen Penguji Utama yang telah memberikan bimbingan, saran, kritik, dan meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan;
6. drg. Dyah Indartin Setyowati, M. Kes selaku Dosen Penguji Pendamping yang telah memberikan bimbingan, saran, kritik, dan meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan;
7. drg. Nadie Fatimatuzzahro, MD.Sc selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu memberikan motivasi, perhatian dan membimbing saya dari

awal semester hingga diselesaikannya skripsi ini;

8. Seluruh dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang mendidik dan memberikan bekal ilmu kepada penulis;
9. Teknisi laboratorium Bioscience, laboratorium histologi, dan laboratorium mikrobiologi Universitas Jember yang telah membantu dalam proses penelitian;
10. Teman-teman yang membantu terlaksananya penelitian ini Azizah Saafatin, Grace Valencia Handoko, Zakiya Ulpiyah, Arina Nur R, Rr. Dianita Rahma dan Dea Lili A yang selalu menemani saat penelitian berlangsung;
11. Sahabat-sahabat saya Chintya Chahyaningtyas, Virginia Hanun, Khoirina Safitri, Hanandhito Wibhisono, Christian Dwi Ananta, Afthin Maritta Noviyanti, Arwinda Hening Pangestu, Larasati Pusitaningrum, Ismi Inayatur Yusha, dan Fadhilah Rusmaputeri terimakasih atas segala dukungan dan motivasi sehingga skripsi ini dapat diselesaikan;
12. Teman-teman tutorial GUNDALA yang membuat saya bisa survive di fkg;
13. Sahabat KKN UMD 53 yang selalu memberi motivasi dan dukungan;
14. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis berharap, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PEMBIMBING	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Monosit	4
1.4.1 Diferensiasi.....	4
1.4.2 Fungsi Monosit	5
2.2 Radikal Bebas	6
2.2.1 Reactive oxygen species (ROS).....	7
2.2.2 Kerusakan akibat ROS	8
2.3 Kopi.....	9
2.3.1 Taksonomi dan Deskripsi Kopi Robusta (Coffea robusta).....	9
2.3.2 Biji Buah Kopi.....	10
2.3.3 Komposisi Kimia Biji Kopi.....	11
2.4 Antioksidan	13

2.4.1 Antioksidan Endogen	14
2.5 Kerangka Konsep	16
2.6 Hipotesis	17
BAB 3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	18
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.3 Variabel	18
3.3.1 Variabel Bebas.....	18
3.3.2 Variabel Terikat	19
3.3.3 Variabel Terkendali	20
3.4 Subyek Penelitian	20
3.5 Alat dan Bahan	22
3.5.1 Alat.....	22
3.5.2 Bahan	22
3.6 Prosedur Penelitian	23
3.6.1 Pembuatan seduhan bubuk kopi robusta, Uji NBT dan Uji aktivitas antioksidan pada monosit	23
3.6.2 Uji Aktivitas Antioksidan Seduhan Biji Kopi Robusta pada monosit..	26
3.7 Analisis Data	29
3.8 Alur Penelitian	30
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Hasil	31
4.2 Analisis Data	33
4.3 Pembahasan	35
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Sel monosit.....	4
2.2 Perkembangan limfosit dalam sumsum tulang.....	5
2.3 Pembentukan radikal oleh reaksi fenton dan heber.....	7
2.4. Pembentukan spesies oksigen reaktif.....	8
2.5 Penampang melintang buah kopi	11
2.6 Bagan Kerangka Konsep	16
3.1 Prosedur uji aktivitas antioksidan seduhan bubuk kopi robusta.....	23
3.2 Prosedur penghitungan monosit.....	29
3.3 Alur Penelitian.....	30
4.1 Grafik diagram batang rata-rata produksi radikal superoksida secara intraseluler	32
4.2 Gambaran sel monosit yang memproduksi radikal superoksida dengan perbesaran 1000x.....	32

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi kimia kopi robusta.....	11
4.1 Hasil prosentase produksi radikal superoksida intraseluler .	31
4.2 Hasil analisis statistik dengan Uji <i>Kolmogrov-Smirnov</i> terhadap nilai rata-rata produksi radikal superoksida	33
4.3 Hasil analisis statistik dengan Uji <i>Levene</i> terhadap nilai rata-rata produksi radikal superoksida	33
4.4 Hasil analisis statistik dengan Uji <i>One Way Anova</i> terhadap nilai rata-rata produksi radikal superoksida	34
4.5 Hasil Uji statistik LSD terhadap selisih rata-rata produksi radikal superoksida	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Surat Keterangan	43
A.1 Ethical Clearance	43
A. 2 Surat Ijin Penelitian.....	44
A.3 Informed Consent.....	45
A.4 Surat Keterangan Identifikasi Bakteri.....	47
B. Analisis Data	48
B.1 Hasil Uji <i>Kolmogrov-Smirnov</i>	49
B.2 Hasil Uji <i>Levene</i>	49
B.3 Hasil Uji <i>One Way Anova</i>	49
B.4 Hasil Uji <i>LSD</i>	50
C. Foto hasil penelitian kelompok kopi 1 dengan seduhan kopi 6 gr	51
D. Foto hasil penelitian kelompok kopi 2 dengan seduhan kopi 3 gr	55
E. Foto hasil penelitian kelompok tanpa kopi	59
F. Foto alat dan bahan	63
G. Prosedur pembuatan kopi	66
H. Prosedur pembuatan antigen <i>Streptococcus mutans</i>	67
I. Prosedur isolasi monosit	68
J. Prosedur penempelan sel	69
K. Prosedur perlakuan	71

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Monosit merupakan salah satu jenis leukosit yang berperan dalam pertahanan pertama terhadap serangan mikroorganisme yang dapat membahayakan tubuh yaitu dengan fagositosis. Fagositosis adalah proses pengenalan antigen/mikroba, menelan, mencerna dan degradasi. Selama fagositosis mikroorganisme dapat dibunuh melalui produk *respiratory burst* yakni radikal superoksida (Baratawidjaja, 2004).

Radikal superoksida merupakan salah satu jenis radikal bebas dari *Reactive oxygen species* (ROS) yang dibutuhkan dalam proses fisiologis dalam jumlah yang sedikit dan dapat menyebabkan patologi dalam jumlah yang berlebih (Arvin, 2000; Behr *et al.*, 2012; Baratawidjaja, 2004). Proses fisiologis yang terjadi misalnya, sistem kekebalan tubuh, antibakteri, dan transduksi sinyal. ROS dalam jumlah yang berlebih dapat menyebabkan “stress oksidatif” dan kerusakan jaringan, seperti kerusakan dinding pembuluh darah, molekul protein, DNA, karbohidrat, dan lipid. (Yahsin *et al.*, 2013). Oleh karena itu diperlukan suatu antioksidan untuk dapat meredam produksi ROS yang berlebih (Behr *et al.*, 2012).

Antioksidan dapat dikategorikan beberapa macam yakni antioksidan enzimatis dan non-enzimatis (Nimse *et al.*, 2015). Terdapat beberapa macam antioksidan enzimatis, yakni enzim superoksida dismutase (SOD), glutathione peroksidase (GSH-px) dan katalase. Antioksidan non-enzimatis terdiri atas vitamin A, C, dan E serta beberapa macam antara lain karotenoid, flavonoid, tanin, asam klorogenat, polifenol, dan lain-lain (Lingga, 2012). Antioksidan non-enzimatis tersebut dapat diperoleh dari bahan alam, salah satunya yaitu dari biji kopi robusta.

Indonesia merupakan salah satu negara pengekspor kopi robusta terbesar di dunia. Saat ini, sekitar 95% dari areal kopi di Indonesia terdiri atas kopi robusta (Yahmadi, 2007). Produksi kopi robusta yang dikelola masyarakat umum atau perkebunan rakyat di Jember dalam setahun mencapai 100-200 ton (Erdiansyah *et*

al., 2014). Hal ini dikarenakan kopi robusta lebih mudah dikelola dibandingkan jenis kopi lainnya (Hariyati, 2014).

Biji kopi robusta mengandung senyawa kimia kafein, asam klorogenat, fenol, alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan trigonelin. Kandungan asam klorogenat dan polifenol biji kopi robusta merupakan sumber antioksidan terbesar (Antonio *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2015). Pada penelitian sebelumnya dibuktikan bahwa kadar antioksidan di dalam plasma darah penggemar kopi tergolong tinggi yaitu sebesar 11,1 ml/dl plasma (Lingga, 2012).

Jenis penyakit yang banyak ditemui di bidang kedokteran gigi adalah penyakit inflamasi kronis bakterial yang melibatkan aktivitas sel inflamasi makrofag (berasal dari monosit yang terstimulasi). Adanya antigen, misalnya dari produk bakteri, akan mengaktifasi monosit untuk memproduksi radikal superoksida dalam jumlah besar (Miyajima *et al.*, 2014). Produksi radikal superoksida tersebut diduga dapat diredam oleh kopi robusta (yang banyak mengandung antioksidan). Berdasarkan uraian tersebut peneliti tertarik untuk meneliti aktivitas antioksidan seduhan bubuk kopi robusta terhadap produksi radikal superoksida pada monosit yang distimuli dengan antigen bakterial, karena belum banyak diteliti.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Bagaimana aktivitas antioksidan seduhan bubuk kopi terhadap radikal superoksida monosit yang distimuli antigen bakterial?

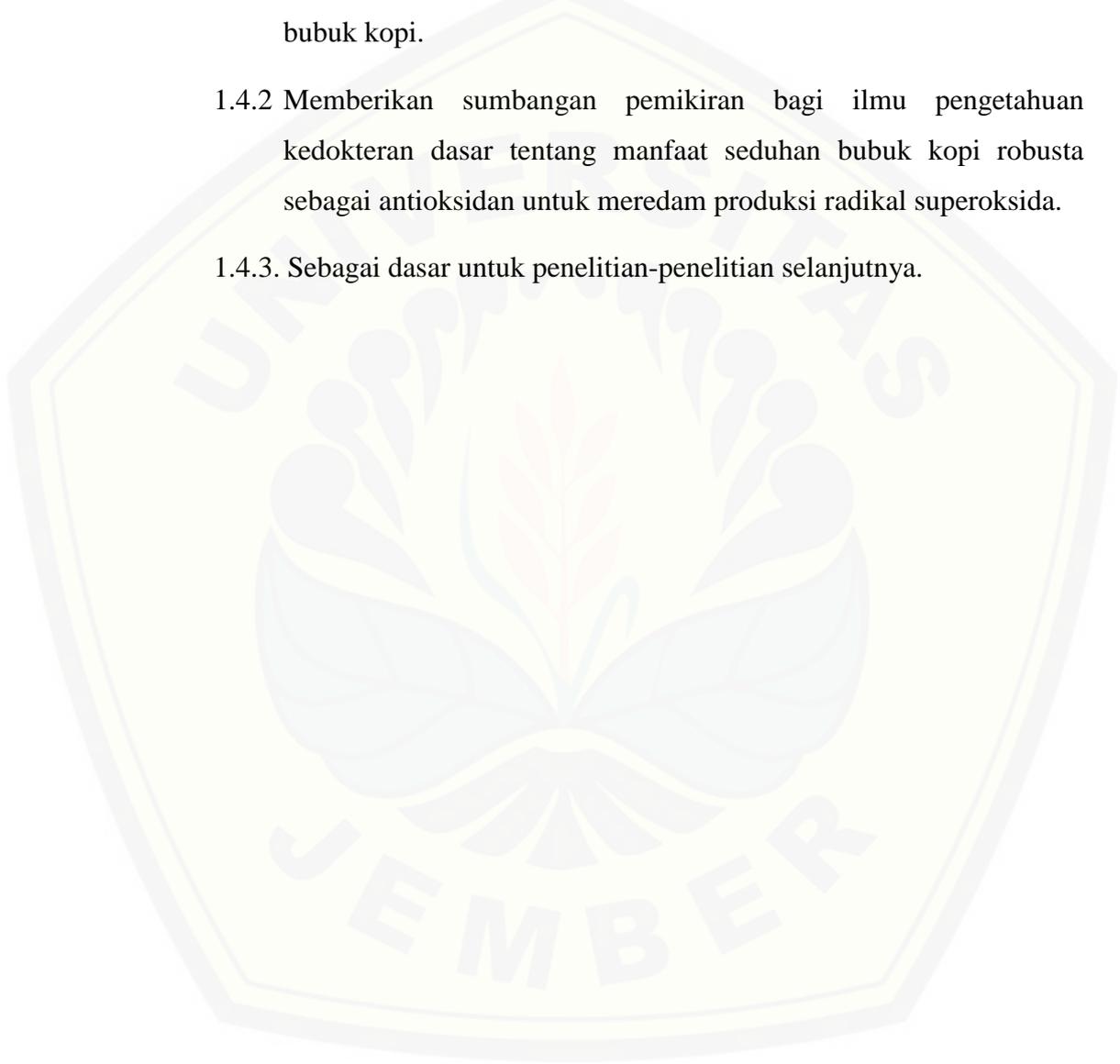
1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Mengkaji aktivitas antioksidan seduhan bubuk kopi robusta terhadap radikal superoksida monosit yang distimuli antigen bakterial.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

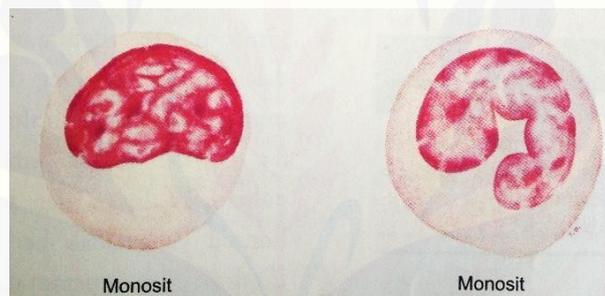
- 1.4.1 Meningkatkan pemahaman tentang aktivitas antioksidan seduhan bubuk kopi.
- 1.4.2 Memberikan sumbangan pemikiran bagi ilmu pengetahuan kedokteran dasar tentang manfaat seduhan bubuk kopi robusta sebagai antioksidan untuk meredam produksi radikal superoksida.
- 1.4.3. Sebagai dasar untuk penelitian-penelitian selanjutnya.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Monosit

Monosit adalah sel paling besar di dalam darah perifer. Inti besar, menyerupai secarik kain lap yang khas, beranekaragam, sering juga berbentuk seperti kacang merah. Kromatin longgar, berbenang-benang kasar dengan pepadatan pada tempat-tempat tertentu secara keseluruhan transparan. Nukleolus kecil dapat dikenali. Sitoplasma basofil muda atau biru abu-abu tua: (Gambar 2.1) (Fritz, 1999). Monosit beredar dalam darah dan masuk ke jaringan yang cedera melewati membran kapiler yang menjadi permeabel sebagai akibat dari reaksi peradangan (Corwin, 2009). Monosit bersirkulasi selama 20-40 hari, kemudian masuk ke dalam jaringan sebagai makrofag (Mehta, 2006).



Gambar 2.1 Sel monosit (Sumber: Tao, 2013).

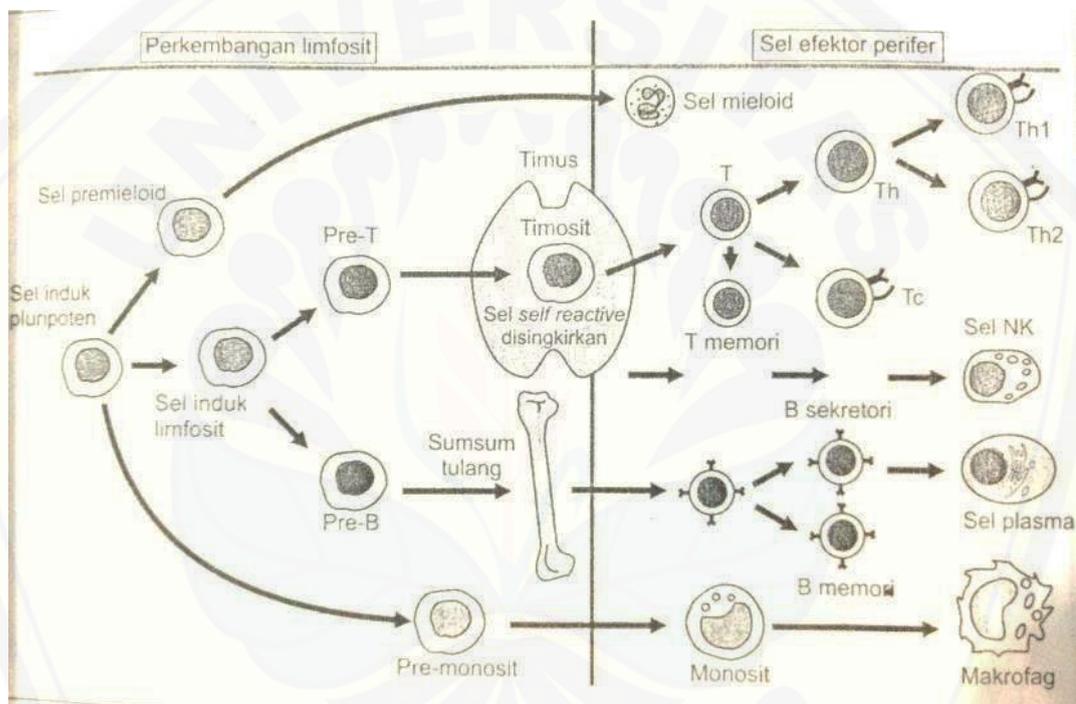
2.1.1 Diferensiasi

Sel-sel imun berasal dari sel perkusor (induk) yang pluripoten dalam sumsum tulang yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel preieloid, sel limfosit (T dan B) dan sel pre-monosit yang berdiferensiasi menjadi sel monosit-makrofag (Baratawidjaja, 2004).

Semua sel darah berasal dari sel induk hematopoietik yang berdiferensiasi menjadi jenis sel-sel yang lain. Untuk tiap sel terdapat pembaharuan untuk mempertahankan jumlahnya. Pada manusia hematopoiesis adalah pembentukan dan perkembangan sel darah putih mulai dari *yolk sac* selama beberapa minggu. Sel induk ini berdiferensiasi menjadi sel eritroid primitif yang mengandung hemoglobin

yolk sac (Baratawidjaja, 2004).

Selama hematopoiesis dalam sumsum tulang, sel progenitor granulosit menjadi premonosit yang meninggalkan sumsum tulang dan masuk ke dalam sirkulasi untuk selanjutnya berdiferensiasi menjadi monosit matang dan berperan dalam fungsi (Gambar 2.2). Monosit adalah fagosit yang didistribusikan secara luas sekali di organ limfoid dan organ lainnya. Hematopoiesis merupakan proses yang berjalan terus, sel matang diproduksi dengan kecepatan yang sama dengan kematiannya. Kematian utama disebabkan karena sel menjadi tua. (Baratawidjaja, 2004).



Gambar 2.2 Perkembangan berbagai jenis limfosit asal sel induk yang pluripoten dalam sumsum tulang (Sumber: Baratawidjaja, 2004).

2.1.2 Fungsi monosit

Di tempat ini monosit matang dan menjalankan fungsi utamanya yaitu fagositosis dan pembunuhan. Dalam jaringan, monosit sering memiliki proyeksi sitoplasmik panjang yang menyebabkannya dapat berkomunikasi secara luas dengan sel-sel lain (Mehta, 2006).

Meskipun berbagai sel dalam tubuh dapat melakukan fagositosis, tetapi sel

utama yang berperan dalam pertahanan non-spesifik adalah (monosit dan makrofag) serta sel polimorfonuklear atau granulosit. Sel-sel ini berperan sebagai sel yang mengenal dan menangkap antigen, mengolah dan selanjutnya mempresentasikannya ke sel T. Monosit dan makrofag berasal dari sel hematopoietik yang sama. Monosit berperan sebagai APC, mengenal, menyerang mikroba dan sel kanker dan juga memproduksi sitokin (Baratawidjaja, 2004).

2.2 Radikal Bebas

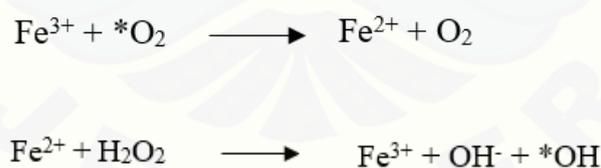
Radikal bebas merupakan spesies kimiawi dengan satu elektron tak berpasangan di orbital terluar. Keadaan kimiawi tersebut sangat tidak stabil dan mudah bereaksi dengan zat kimia anorganik atau organik. Saat dibentuk dalam sel, radikal bebas segera menyerang dan mendegradasi asam nukleat serta berbagai molekul membran. Selain itu, radikal bebas menginisiasi reaksi autokatalitik. Molekul yang bereaksi dengan radikal bebas diubah menjadi radikal bebas, semakin memperbanyak rantai kerusakan (Kumar, 2007). Reaktivitas radikal bebas merupakan upaya mencari pasangan elektron. Sebagai dampak kerja radikal bebas tersebut, akan terbentuk radikal bebas baru yang berasal dari atom atau molekul yang elektronnya diambil untuk berpasangan dengan radikal sebelumnya. Namun, bila dua senyawa radikal bertemu, elektron-elektron yang tidak berpasangan dari kedua senyawa tersebut akan bergabung dan membentuk ikatan kovalen yang stabil (Winarsih, 2007).

Radikal bebas bersifat reaktif dan dapat bereaksi dengan protein, asam nukleat, lipid, dan molekul lain untuk mengubah struktur molekul-molekul tersebut dan menyebabkan kerusakan jaringan. Reaksi-reaksi tersebut berperan penting dalam pembentukan berbagai oksidan (Murray, 2009). Radikal bebas dapat bersumber secara endogenus dan eksogenus. Secara endogenus berkaitan dengan laju metabolisme seiring dengan bertambahnya usia dan juga akan menyebabkan peningkatan oksidasi glukosa dalam siklus asam sitrat sehingga radikal bebas akan terbentuk lebih banyak. Secara eksogenus, bersumber dari paparan polutan juga semakin tinggi (Winarsih, 2007).

2.2.1 Reactive oxygen species (ROS)

ROS adalah metabolit oksigen yang utama yang dihasilkan melalui reduksi satu-elektron oksigen dan menghasilkan beberapa produk. Produk dari ROS tersebut adalah spesies oksigen reaktif (ROS): superoksida (O_2^-), radikal bebas hidroksil (OH^\cdot), dan hidrogenperoksida (H_2O_2). Radikal bebas mampu bereaksi dengan setiap molekul yang berkontak dengannya sehingga mampu menarik elektron dan membentuk radikal bebas yang baru dalam reaksi berantai oksidatif sitotoksik (Marks, 2000).

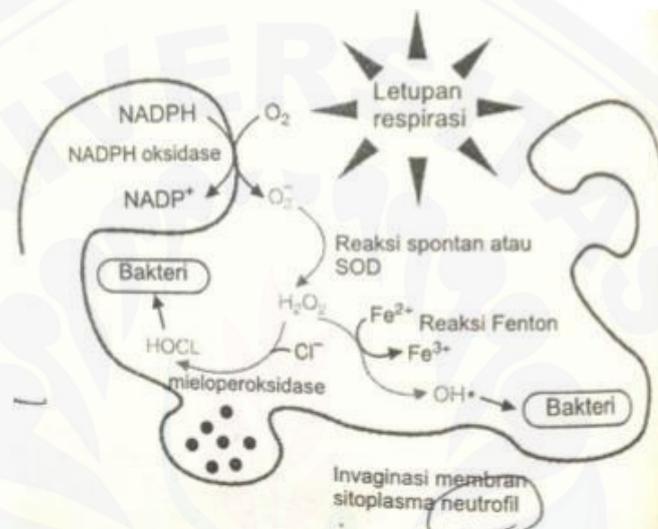
Radikal superoksida juga dapat menghasilkan radikal yang lebih reaktif melalui reaksi dengan hidrogen peroksida dalam reaksi Haber-Weiss. Radikal hidroksil merupakan spesies oksigen reaktif yang paling poten, dan mungkin menjadi inisiator atau pencetus reaksi berantai yang membentuk peroksida lemak dan radikal organik. Hidrogenperoksida adalah zat pengoksidasi dan dengan adanya Fe^{2+} atau logam transisi lainnya, menghasilkan radikal hidroksil melalui reaksi fenton seperti reaksi pada (Gambar 2.3). Karena larut lemak, hidrogen peroksida dapat menimbulkan kerusakan di membran lokal yang mengandung Fe^{2+} yang terletak jauh dari tempat pembentukannya. Anion superoksida ,yang dapat terbentuk dari O_2 bebas dengan pemberian satu eletron ke radikal bebas lain, sangat reaktif tetapi memiliki kelarutan lemak yang terbatas dan tidak dapat berdifusi jauh (Marks, 2000).



Gambar 2.3 Pembentukan radikal hidroksil oleh reaksi fenton dan heber-Weiss. Dalam versi yang disederhanakan dari reaksi ini seperti diperlihatkan di sini, pemindahan elektron tunggal menghasilkan radikal hidroksil (Sumber: Marks, 2000).

Radikal Superoksida dibentuk di dalam sel darah merah oleh proses auto-oksidasi hemoglobin menjadi methemoglobin (sekitar 3% hemoglobin di sel darah merah manusia diperkirakan mengalami auto-oksidasi per-hari). Radikal superoksida diproduksi oleh sel fagositik oleh makrofag, neutrofil dan eosinofil terjadi

pembebasan ROS. Terjadi pengaktifan NADPH oksidase, yang diperkirakan terjadi di sisi sebelah luar membran plasma, mencetuskan ledakan pernafasan disertai pembentukan superoksida. Selama fagositosis, membran plasma membentuk invaginasi, sehingga superoksida dibebaskan ke dalam ruang vakuol. Anion superoksida menghasilkan spesies reaktif lain, termasuk hidrogenperoksida dan radikal hidrosil. Proses ini adalah pusat sistem pertahanan manusia terhadap mikroba dan dimaksudkan untuk merusak membran dan komponen sel lainnya dari organisme yang masuk (Gambar 2.4) (Marks, 2000).



Gambar 2.4 Pembentukan *spesies oksigen reaktif* selama ledakan pernapasan fagositik oleh makrofag, neutrofil dan eosinofil yang diaktifkan. Pengaktifan NADPH oksidase, yang diperkirakan terjadi di sisi luar membran plasma, mencetuskan ledakan pernafasan disertai pembentukan superoksida. Selama fagositosis, membran plasma membentuk invaginasi, sehingga superoksida dibebaskan ke dalam ruang vakuol. Anion superoksida baik secara spontan maupun secara enzimatis (melalui superoksida dismutase) menghasilkan spesies lain, termasuk H_2O_2 dan radikal hidrosil. Meiloperoksidase, suatu enzim yang mengandung Fe-hem dan terdapat di granula neutrofil. Diekskresikan di dalam vakuol, tempat enzim tersebut membentuk HOCL dan halida lainnya. Hasilnya adalah serangan terhadap membran dan senyawa lain dari sel bakteri, dan akhirnya lisis bakteri. Proses keseluruhan disebut sebagai ledakan pernapasan karena hanya berlangsung 30-60 menit, dan memerlukan oksigen (Sumber: Marks, 2000).

2.2.3 Kerusakan akibat ROS

Sasaran kerusakan sel akibat dari ROS adalah protein, lemak membran, karbohidrat, dan asam. Kerusakan radikal bebas ini diperkirakan berperan menimbulkan banyak penyakit. Oksidasi asam amino dalam protein menimbulkan

fragmentasi protein, pembentukan ikatan-silang, agregasi, dan kerentanan terhadap disgesti proteolitik (Marks, 2000; Kumar, et al., 2015).

Radikal bebas juga merupakan sumber utama kerusakan DNA. Pengikatan nonspesifik Fe^{2+} ke DNA yang mengalami gangguan oksidasi lokal setempat, yang dapat menyebabkan pemutusan untai dan perubahan basa DNA. Sampai tahap tertentu, kerusakan DNA ini dapat diperbaiki oleh sel tersebut (Marks, 2000; Kumar et al., 2015).

2.3 Kopi

Ada beberapa jenis kelompok kopi yang dikenal, diantaranya adalah kopi arabika, dan kopi robusta. Kopi robusta (*Coffea canephora*) banyak ditanam di Afrika, India dan Indonesia. Kopi robusta (*Coffea canephora*) dimasukkan ke Indonesia pada tahun 1900. luas areal pertanaman kopi robusta di Indonesia lebih besar daripada luas areal pertanaman kopi arabika sehingga produksi kopi robusta lebih banyak sehingga produksinya jauh lebih tinggi. Oleh karena itu kopi ini cepat berkembang, dan mendesak kopi-kopi lainnya. Saat ini lebih dari 90% dari areal pertanaman kopi Indonesia terdiri atas kopi robusta (AAK, 1988; Prastowo, 2010; Rahardjo, 2012)

2.3.1 Taksonomi dan Deskripsi Kopi Robusta (*Coffea robusta*)

Taksonomi tanaman kopi robusta (*Coffea robusta*)

Kingdom	:	<i>Plantae</i>
Subkingdom	:	<i>Tracheobionta</i>
Super Divisi	:	<i>Spermatophyta</i>
Divisi	:	<i>Magnoliophyta</i>
Kelas	:	<i>Magnoliopsida</i>
Sub Kelas	:	<i>Asteridae</i>
Ordo	:	<i>Rubiales</i>
Famili	:	<i>Rubiaceae</i>
Genus	:	<i>Coffea</i>
Spesies	:	<i>Coffea canephora</i>

Tanaman kopi memiliki batang yang keras dan berwarna putih keabu-abuan. Daunnya mengkilat, berbentuk bulat telur dengan tepian rata dan pangkal yang tumpul. Bunganya merupakan bunga berjenis majemuk, warnanya hijau, berbentuk payung, kelopaknya terbagi lima bagian. Buah kopi sendiri bentuknya bulat telur. Ketika muda berwarna hijau dan saat matang dan tua berwarna merah. Biji berbentuk bulat telur, berbelah dua dan keras (LPPM IPB, 2014).

Biji kopi robusta berwarna coklat kehitaman dapat tumbuh pada ketinggian 800 m dpl, rasanya lebih pahit dan mengandung kafein lebih besar dibanding jenis arabika sehingga biasanya kopi jenis ini berharga lebih murah (LPPM IPB, 2014).

Kopi memiliki nama latin *Coffea* sp. Buah kopi terdiri atas 4 bagian yaitu lapisan kulit luar (exocarp), daging buah (mesocarp), kulit tanduk (parchment), dan biji (endosperm) (Marcelinda, 2016).

2.3.2 Biji Buah Kopi

Sebagian besar, buah terdapat pada cabang primer atau sekunder sebagaimana halnya dengan bunga. Dari bunga sampai menjadi buah itu masak, memakan waktu 7 - 9 bulan. Buah kopi muda berwarna hijau, tetap setelah tua menjadi kuning dan kalau masak warnanya menjadi merah. Buah besar kira-kira (1,5 × 1) cm dan bertangkai pendek (AAK, 1988).

Pada umumnya buah kopi mengandung 2 butir biji, biji tersebut mempunyai dua bidang, bidang yang datar (perut) dan bidang yang cembung bulat panjang yang disebut dengan kopi "lanang". Kadang-kadang ada yang hampa, sebaliknya ada pula yang berbiji 3 - 4 butir yang disebut dengan poly sperma. Tidak semua bakal buah bisa menjadi buah sampai masak melainkan ada yang berguguran setelah berumur 8 - 10 minggu, dan bahkan ada pula yang gagal waktu mereka masih berbentuk bunga. Justru kegagalan terbanyak adalah pada saat mereka masih dalam bentuk bunga, kegagalan bisa mencapai 60%. (AAK, 1988).

Buah terdiri dari (1) kulit; (2) biji. (1) Kulit terdiri dari: Biji kopi terdiri dari dua bagian, yaitu: (a) Kulit biji yang merupakan selaput tipis memblut biji yakni yang disebut selaput perak atau kulit ari; (b) Putih lembaga (endosperm). Pada permukaan yang datar saluran yang arahnya memanjang dan ke dalam, merupakan

lubang yang panjangnya sama dengan bijinya. Sejajar dengan saluran itu terdapat satu lubang yang berukuran lebih sempit dan merupakan satu kantong yang tertutup. Di sebah kantong terdapat lembaga (embrio) dengan sepasang daun tipis dan dasar akar yang berwarna putih.



Gambar 2.5 Penampang melintang buah kopi (Sumber:web.ipb.ac.id)

2.3.3 Komposisi Kimia Biji Kopi

Banyaknya komponen kimia didalam kopi seperti kafein, asam klorogenat, trigonelin, karbohidrat, lemak, asam amino, asam organik, aroma volatile dan mineral dapat menghasilkan efek yang menguntungkan dan membahayakan bagi kesehatan penikmat kopi.

Adapun komposisi kimia dari biji kopi robusta dapat dilihat pada tabel berikut ini :

Tabel 2.1 Komposisi kimia kopi

Komponen	Biji Kopi	Kopi Bubuk
Mineral	4.0-4.5	4.6-5.0
Kafein	1.6-2.4	-2.0
Trigonelline	0.6-0.75	0.3-0.6
Lipid	9.0-13.0	6.0-11.0
Total Asam Klorogenat	7.0-10.0	3.9-4.6
Asam Alifatik	1.5-2.0	1.0-1.5
Oligoskarida	5.0-7.0	0.3-5
Total Polisakarida	37.0-47.0	-
Asam Amino	2.0	0
Protein	11.0-13.0	13.5-15.0
Asam Histamin	-	16.0-17.0

(Sumber: Yusianto,1999 dalam Panggabean, 2011)

Kafein adalah salah satu jenis alkaloid yang banyak terdapat dalam biji kopi, daun teh, dan biji coklat. Kafein memiliki efek farmakologis yang bermanfaat secara klinis, seperti menstimulasi susunan syaraf pusat, relaksasi otot polos terutama otot polos bronkus dan stimulasi otot jantung (Rizky, 2015). Kafein memiliki efek farmakologis yang bermanfaat secara klinis seperti menstimulasi susunan saraf, relaksasi otot polos terutama otot polos bronkus dan stimulus otot jantung. Efek berlebihan (over dosis) mengkonsumsi kafein dapat menyebabkan gugup, gelisah, tremor, insomnia, hipertensi, mual dan kejang (Farmakologi UI, 2002).

Asam klorogenat termasuk keluarga dari ester yang terbentuk dari gabungan asam kuinat dan beberapa asam transsinamat, umumnya caffeic, p-coumaric, dan asam ferulat. Asam klorogenat dapat melindungi tumbuhan kopi dari mikroorganisme dan radiasi UV sedangkan manfaat asam klorogenat bagi kesehatan manusia yaitu sebagai antioksidan, antivirus, hepatoprotektif. Asam klorogenat adalah suatu senyawa yang termasuk kedalam komponen fenolik, mempunyai sifat yang larut dalam air (Farhaty, 2016).

Pengujian secara in vitro telah dilakukan dan menunjukkan bahwa asam klorogenat dan asam kafein mempunyai kumpulan cixinal hydroxyl pada residu aromatis. Kedua senyawa tersebut mempunyai fungsi sebagai antimutagenik, antikanker dan adanya aktivitas antioksidan yang bekerja ada ROS (Reactive Oxygen Spesies). Kafein dan asam klorogenat dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dan menunjukkan aktivitas antioksidan yang memberikan penghambatan 50%. Disimpulkan bahwa asam klorogenat mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kafein, hal ini disebabkan karena asam klorogenat mempunyai banyak gugus hidroksil yang berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan (Farhaty,2016).

Alkaloid merupakan salah satu metabolisme sekunder yang terdapat pada tumbuhan, yang bisa dijumpai pada bagian daun, ranting, biji, dan kulit batang. Alkaloid mempunyai efek dalam bidang kesehatan berupa pemicu sistem saraf, menaikkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit, antimikroba, obat penenang, obat penyakit jantung dan lain-lain lain (Aksara, 2013).

Secara umum alkaloid sering digunakan dalam bidang pengobatan (Harborne, 1996). Alkaloid dapat berfungsi sebagai zat antioksidan hal ini didukung oleh penelitian uji antioksidan (Hanani *et al.*, 2005). Senyawa alkaloid yang terkandung dalam suatu jenis tanaman dapat bersifat sebagai bioaktif (Mustanir dan Rosnani, 2008). Alkaloid memiliki aktifitas antibakteri (Tanaka J.C.A, 2006). Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh alkaloid berasal dari berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung atom nitrogen yang bersifat basa dan merupakan bagian dari cincin heterosiklik (Ahmad, 1986). Alkaloid mempunyai kegiatan fisiologi yang menonjol dan sering digunakan secara luas dalam bidang pengobatan. Alkaloid merupakan senyawa yang mempunyai satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam gabungan dan sebagian dari sistem siklik (Harbone, 1996).

2.4 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (electron donor) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Akibatnya, kerusakan sel akan dihambat (Winarsih, 2007).

Berkaitan dengan reaksi oksidasi di dalam tubuh, status antioksidan merupakan parameter penting untuk memantau kesehatan seseorang. Tubuh manusia memiliki sistem antioksidan untuk menangkali reaktivitas radikal bebas, secara kontinu dibentuk sendiri oleh tubuh. Bila jumlah senyawa oksigen reaktif ini melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh, kelebihanannya akan menyerang komponen lipid, protein, maupun DNA sehingga mengakibatkan kerusakan-kerusakan yang disebut stress oksidatif. Namun demikian, reaktivitas radikal bebas dapat dihambat melalui 3 cara berikut.

- a. Mencegah atau menghambat pembentukan radikal bebas baru
- b. Menginaktivasi atau menangkap radikal dan memotong propagasi (pemutusan rantai)

c. Memperbaiki (repair) kerusakan oleh radikal (Winarsih,2007).

Tidak selamanya senyawa oksigen reaktif yang terdapat di dalam tubuh merugikan. Pada kondisi-kondisi tertentu keberadaannya sangat dibutuhkan. Misalnya, untuk membunuh bakteri yang masuk ke dalam tubuh. Oleh sebab itu, keberadaannya harus dikendalikan oleh sistem antioksidan dalam tubuh (Winarsih, 2007).

Antiosidan dapat berupa enzim (misalnya superoksida dismutase atau SOD, katalase dan glutathion proksidase), vitamin (misalnya vitamin E, C, A, dan B-karoten), dan senyawa lain (misalnya, flavonoid, albumin, bilirubin, seruloplasmin, dan lain-lain). Antioksidan enzimatis merupakan sistem pertahanan utama (primer) terhadap kondisi stres oksidatif. Enzim-enzim tersebut merupakan metaloenzim yang aktivitasnya sangat tergantung pada adanya ion logam aktivitas SOD bergantung pada logam Fe, Cu, Zn, dan Mn. Enzim katalase bergantung pada Fe (besi), dan enzim glutathion peroksidase bergantung pada Se (selenium). Antioksidan enzimatis bekerja dengan cara mencegah terbentuknya senyawa radikal bebas baru (Winarsih, 2007).

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

2.4.1 Antioksidan Endogen dan Eksogen

Kekurangan elektron pada superoksida yang nantinya diubah menjadi hidrogen peroksida dilakukan oleh superoksida dismutase biasa disebut sebagai pertahanan primer karena superoksida adalah inisiator reaksi adalah inisiator reaksi berantai yang kuat. Di dalam sitosol dan mitokondria sel terdapat bermacam-macam isozim superoksida dismutase. Aktivitas superoksida dismutase meningkat melalui induksi enzim oleh zat kimia atau keadaan yang meningkatkan pembentukan superoksida (Marks, 2000)

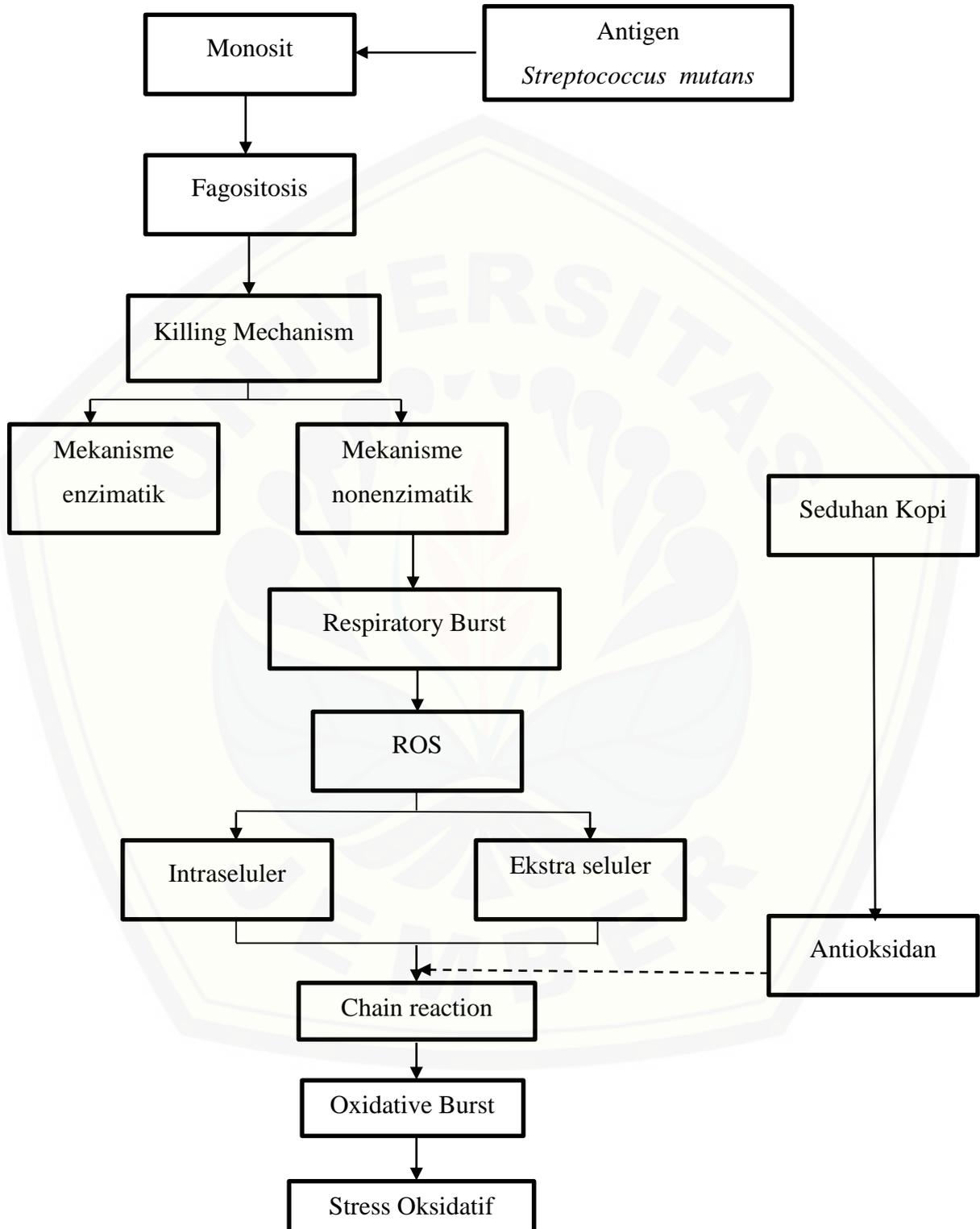
Katalase berfungsi untuk melindungi sel terhadap ledakan pernafasannya sendiri. Setelah terbentuk, hidrogen peroksida juga harus dikeluarkan untuk mencegah pembentukan radikal hidroksil. Rute utama untuk melaksanakan hal tersebut melibatkan dekomposisi hidrogenperoksida menjadi air oleh katalase dan glutathion peroksidase (Marks, 2000).

Glutathion peroksidase adalah suatu cara utama yang digunakan oleh tubuh untuk melindungi diri dari keusakan oksidatif. Enzim ini mengkatalisis reduksi hidrogen peroksida dan peroksida lemak (LOOH) oleh glutathion. Gugus sulfhidril pada glutathion (GSH) berfungsi sebagai donor elektron dan dioksidasi menjadi bentuk disulfida (GSSG) selama reaksi tersebut. Sel memiliki dua glutathion peroksidase, salah satunya memerlukan selenium (yang ada dalam makanan kita) untuk aktivitasnya dan bekerja terutama dengan hidroperoksida organik misalnya zat yang dihasilkan selama peroksidasi lemak di membran (Marks, 2000).

Dalam menjalankan aktivitasnya, enzim-enzim tersebut menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara mencegah reaksi berantai (polimerisasi) agar menjadi produk yang stabil dan tidak berbahaya bagi tubuh. Dengan kemampuan ini, maka antioksidan endogen juga disebut antioksidan pemecah rantai (*chain breaking antioxidant*) (Lingga, 2012).

Vitamin E (tokoferol), antioksidan yang paling banyak dalam, adalah suatu zat penyangkut radikal bebas yang lipofilik. Vitamin ini terutama berfungsi sebagai pelindung terhadap peroksidasi lemak di dalam membran. Dari tiga vitamin yang memiliki kemampuan berfungsi sebagai antioksidan dan menghentikan reaksi berantai radikal bebas (vitamin E, vitamin C, dan karotenoid) (Marks, 2000).

2.5 Kerangka Konsep



Gambar 2.6 Bagan kerangka konsep

Pengambilan isolat monosit didapat dari darah vena peripheral orang sehat yang diberi stimulan berupa antigen *Streptococcus mutans* yang mengaktivasi killing mechanism baik secara enzimatik dan nonenzimatik. Killing mechanism secara nonenzimatik mampu mengaktifasi *respiratory burst*. Salah satu produk *respiratory burst* monosit adalah radikal superoksida yang nantinya dapat menyebabkan *chain reaction* yang berkelanjutan. Akibat dari *oxidative burst* adalah terjadinya stress oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan dinding pembuluh darah, molekul protein, DNA, karbohidrat dan lipid. Untuk menekan produksi radikal superoksida dan memutus *chain reaction* peneliti menggunakan seduhan kopi sebagai bahan sumber antioksidan.

2.6 Hipotesis

Berdasarkan teori yang telah dikemukakan, hipotesis dari penelitian ini adalah seduhan bubuk kopi robusta dapat mencegah produksi radikal superoksida monosit yang distimuli dengan antigen bakterial.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories*. Obyek penelitian ini adalah isolat monosit vena perifer manusia yang diberi perlakuan terhadap seduhan bubuk kopi robusta (*Coffea canephora*).

Rancangan penelitian adalah *the post test only control group design*, yaitu melakukan pengamatan atau pengukuran produksi radikal superoksida monosit setelah perlakuan terhadap seduhan bubuk kopi robusta dan hasilnya dibandingkan dengan kontrol.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan November 2017 – Februari 2018 di Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3 Variabel

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah seduhan bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen produksi PTPN XII.

1. Definisi Operasional

Seduhan bubuk kopi robusta merupakan mencampur sesuatu dengan air panas yaitu pelarutan sediaan bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen produksi PTPN XII dengan aquades.

2. Metode

Seduhan kopi dibuat dengan perbandingan 3 gr dan 6 gr bubuk kopi robusta merek Gunung Ijen produksi PTPN XII dalam 200 ml aquades mendidih

99,9°C yang kemudian ditempatkan pada *hotplate stirrer* dengan kecepatan 60 rpm selama 1 menit, lalu didiamkan pada suhu ruangan selama 3-4 menit. Seduhan tersebut kemudian disaring menggunakan kertas saring. Pemberian dosis 3 gr/200ml dipilih berdasarkan aturan *single dose cup off coffee per day* yang merupakan simulasi kebiasaan meminum satu cangkir kopi 3gr/200ml dalam satu hari (Susilawati, 2014). Dosis 6gr/200ml dipilih untuk menguji keoptimalan antioksidan yang dihasilkan dari kedua seduhan kopi robusta tersebut.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan pada seduhan bubuk kopi robusta.

1. Definisi Operasional

Merupakan aktivitas antioksidan seduhan bubuk kopi robusta adalah kemampuan seduhan kopi dalam menangkap, menangkal, dan meredam produksi radikal superoksida

2. Metode

Aktivitas antioksidan seduhan bubuk kopi robusta didapat dengan berkurangnya produksi radikal superoksida menggunakan uji *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT).

3. Parameter

Jumlah produksi radikal superoksida dari monosit dengan adanya produksi dari formazan yang berwarna biru-keunguan pada sekitar membran monosit. (Yagisawa et al., 1996; Sim et al., 2006).

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

a. Isolat monosit

1. Definisi Operasional

Merupakan pengambilan sel monosit yang berasal dari darah vena perifer yang telah dilakukan isolasi pada sel tersebut.

2. Metode

Dengan menggunakan metode single filter (*Lymphoprep*).

3. Parameter

Jenis dan jumlah sel monosit yang sama yaitu diambil dari satu subyek yang sama.

b. Dosis dalam perlakuan antigen *Streptococcus mutans*

1. Definisi Operasional

Merupakan prosedur dalam pemberian antigen dari bakteri *Streptococcus mutans*.

2. Metode

Pembuatan antigen *Streptococcus mutans* diawali dengan pembuatan suspensi bakteri dan dilanjutkan dengan *filter* (pemisahan bakteri dengan medianya).

3. Parameter

Jenis dan jumlah antigen dari bakteri *Streptococcus mutans* yang sama yaitu dibuat dari satu jenis bakteri yang sama dan pada satu tempat yang sama.

3.4 Subyek Penelitian

Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat monosit yang diisolasi dari darah vena perifer orang sehat. Isolasi monosit menggunakan metode *single filter* (*Lymphoprep*).

Monosit diisolasi dari 9 ml darah yang bersal dari volunter dengan kriteria sebagai berikut :

- a. Orang sehat yang tidak memiliki riwayat kelainan darah serta penyakit sistemik berdasarkan hasil anamnesa dan *vital sign* normal.
- b. Tidak merokok
- c. Telah mengisi *informed consent* sebagai bukti persetujuan bahwa darah yang diambil akan dijadikan sampel penelitian.

3.5 Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Daniel, 2009):

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

Keterangan:

n = besar sampel tiap kelompok

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

σ = standar deviasi sampel

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

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

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

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

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

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

Dari hasil penghitungan di atas, maka jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 sampel untuk tiap kelompok.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

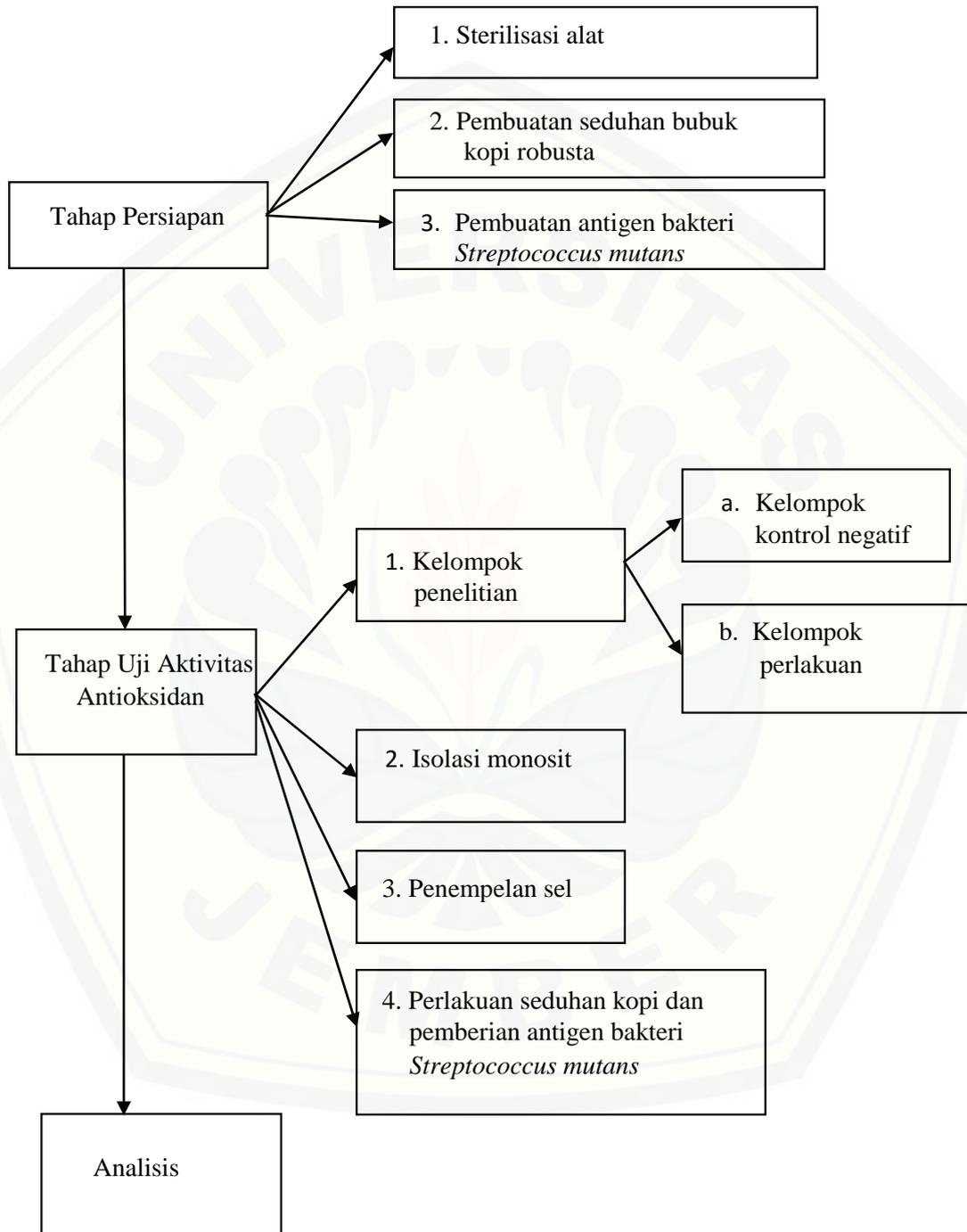
- a. *Autoclave (Ependorf)*
- b. *Centrifuge (Ependorf)*
- c. *Coverslip poli L-lysine (Duran)*
- d. Gelas ukur
- e. *Incubator Shaker (Labtech)*
- f. *Laminar Flow Cabinet (Dwyer)*
- g. Lampu spirtus
- h. *Microplate cell (Costas 3524)*
- i. *Mikroskop inverted (Olympus)*
- j. *Object glass*
- k. Oven (*Binder*)
- l. Pipet mikro (*Humapette*)
- m. Rak Tabung
- n. *Syringe 5 ml (Terumo Syringe)*
- o. Tabung *ependorf*
- p. Tabung *Falcon (Biologix)*
- q. Tabung heparin (*BD Vacutainer*)
- r. Timbangan (*Boeco*)
- s. *Vortex*

3.5.2 Bahan

- a. Darah vena kapiler
- b. *Lymphoprep*
- c. Seduhan bubuk kopi
- d. HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*)
- e. RPMI (*Rosewel Park Memorial Institute Media*)
- f. Medium complex

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan seduhan bubuk kopi robusta, Uji NBT dan Uji aktivitas antioksidan pada monosit



Gambar 3.1 Prosedur penelitian uji aktivitas antioksidan seduhan bubuk kopi robusta

a. 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.

b. Pembuatan Seduhan Bubuk Kopi Robusta

Proses penyeduhan pada minuman kopi dapat dilihat dari perbedaan suhu dan waktu penyeduhan. Proses pembuatan minuman kopi biasanya pada suhu sekitar 90-100°C dengan waktu ± 3 menit. Prinsip proses penyeduhan adalah menuangkan air mendidih ke bubuk kopi dan merendem bubuk kopi didalam air panas. Kopi harus ditunggu beberapa saat hingga ampas kopi mengendap seluruhnya, sebelum kopi tersebut diminum. Seduhan kopi juga dapat dibuat dengan cara memanaskan air beserta bubuk kopi hingga mendidih. Cara ini sering digunakan untuk menimbulkan warna serta rasa kopi panas yang sesuai selera konsumen (Gardjito dan Rahadian, 2011).

Cara Pembuatan Seduhan :

1) Kelompok perlakuan 1

- a. Dengan menggunakan komposisi perbandingan antara 6 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquadest.
- b. Dilakukan pengadukan dengan menggunakan *hotplate stirrer* dengan kecepatan 60 rpm dalam waktu 1 menit.
- c. Diletakkan pada waterbath dengan suhu 99,9°C, selama 10 menit setelah mendidih.
- d. Diamkan dalam suhu ruangan selama 3-4 menit.
- e. Pindahkan ke *falcon* dan dilakukan centrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit.

2) Kelompok perlakuan 2

- a. Dengan menggunakan komposisi perbandingan antara 3 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquadest.
- b. Dilakukan pengadukan dengan menggunakan *sheaker* dengan kecepatan 100 rpm dalam waktu 1 menit.
- c. Diletakkan pada waterbath dengansuhu 99,9⁰C, selama 10 menit setelah mendidih.
- d. Diamkan dalam suhu ruangan selama 3-4 menit.
- e. Pindahkan ke *falcon* dan dilakukan centrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit.

c. Pembuatan RPMI dan Medium Complex.

Pembuatan RPMI dari sediaan bubuk ke cair (dalam 200 ml *aquadest* steril)

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

Pembuatan Medium Complek M199 dari sediaan bubuk ke cair (dalam 200 ml *aquadest* steril)

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

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

BHI-B sebanyak 3,7gr dimasukkan dalam *erlenmayer* dan ditambah 100 ml *aquadest* steril. Dipanaskan diatas kompor listrik sampai mendidih. Kemudian ditutup kapas dan di sterilkan dalam autoclave dengan suhu 121⁰C selama 15 menit. Untuk memastikan bahwa media BHI-B dalam keadaan steril, maka media tersebut dimasukkan dalam *incubator* dengan suhu 37⁰C selama 24 jam.

e. Prosedur pembuatan antigen

1) Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*

- a) Ambil 2 ml BHIB, kemudian tambahkan 3 ose koloni bakteri.

- b) Campurkan, lalu inkubasi pada suhu 37°C pada 2 x 24 jam.
- c) Amati
- d) Lakukan pengecatan gram

2) Tahap Filter

Pada tahap filter ini digunakan untuk memisahkan antara bakteri dengan medianya. Pemisahan dilakukan menggunakan *filter syringe*.

3.6.2 Uji Aktivitas Antioksidan Seduhan Biji Kopi Robusta pada monosit

a. Uji Aktivitas Antioksidan seduhan biji kopi robusta pada Monosit

Kelompok penelitian dibagi menjadi 3 yaitu:

- 1) Kelompok kontrol negatif: Isolat monosit + NBT (*Nitroblue tetrazolium*) + antigen bakteri *Streptococcus mutans*
- 2) Kelompok Kopi 1:
Isolat monosit + seduhan bubuk kopi robusta (6 gr bubuk kopi robusta + 200 ml aquadest) + NBT + antigen bakteri *Streptococcus mutans*
- 3) Kelompok Kopi 2:
Isolat monosit + seduhan bubuk kopi robusta (3 gr bubuk kopi robusta + 200 ml aquadest) + NBT + antigen bakteri *Streptococcus mutans*

Uji aktivitas antioksidan pada seduhan biji kopi robusta monosit dilakukan dengan metode NBT (*Nitroblue Tetrazolium*). Pertama, dilakukan isolasi monosit dengan metode *Single Filter (Lymphoprep)*. Selanjutnya sel diinkubasi dengan antigen bakteri *Streptococcus mutans* dan diaplikasikan NBT untuk mengetahui produksi radikal superoksida. Aktivitas antioksidan diketahui dengan berkurangnya produksi radikal superoksida dibandingkan kontrol.

b. Prosedur Isolasi Monosit Metode Single Filter (*Lymphoprep*)

- 1) Ambil 6 ml darah vena masukkan pada dua tabung heparin campur sampai merata.
- 2) Buat darah diluent dengan darah di encerkan menggunakan larutan fisiologi (RPMI) dengan perbandingan 1 : 1, campur sampai homogen.
- 3) Masukkan diluent darah tersebut pada tabung yang sudah diisi 3 ml larutan *Lymphoprep* dengan perbandingan *lymphoprep* dengan diluent darah adalah 1 : 2. Masukkan melalui dinding tabung secara perlahan, larutan *Lymphoprep* jangan sampai pecah.
- 4) Centrifuge pada kecepatan 800 g selama 20 menit pada suhu 20⁰C
- 5) Terbentuk 4 lapisan (Plasma, Mononuclear, *Lymphoprep*, Polymorfonuclear eritrosit).
- 6) Pipet Lapisan ke 2 Mononuclear (cincin kabut) secara hati-hati, masukkan pada tabung steril.
- 7) Encerkan sampel Mononuclear menggunakan RPMI (1 : 1) homogenkan.
- 8) Centrifugasi dengan kecepatan 900 g selama 3 menit dengan suhu 20⁰C, lakukan sebanyak 3 kali pengulangan.
- 9) Tambahkan 1 ml RPMI pH 7.4 pada supernatant yang didapat, homogenkan.
- 10) Tambahkan 5 µl fungizone dan 20 µl Pinicilin strepthomicin.

c. Prosedur Penempelan Sel

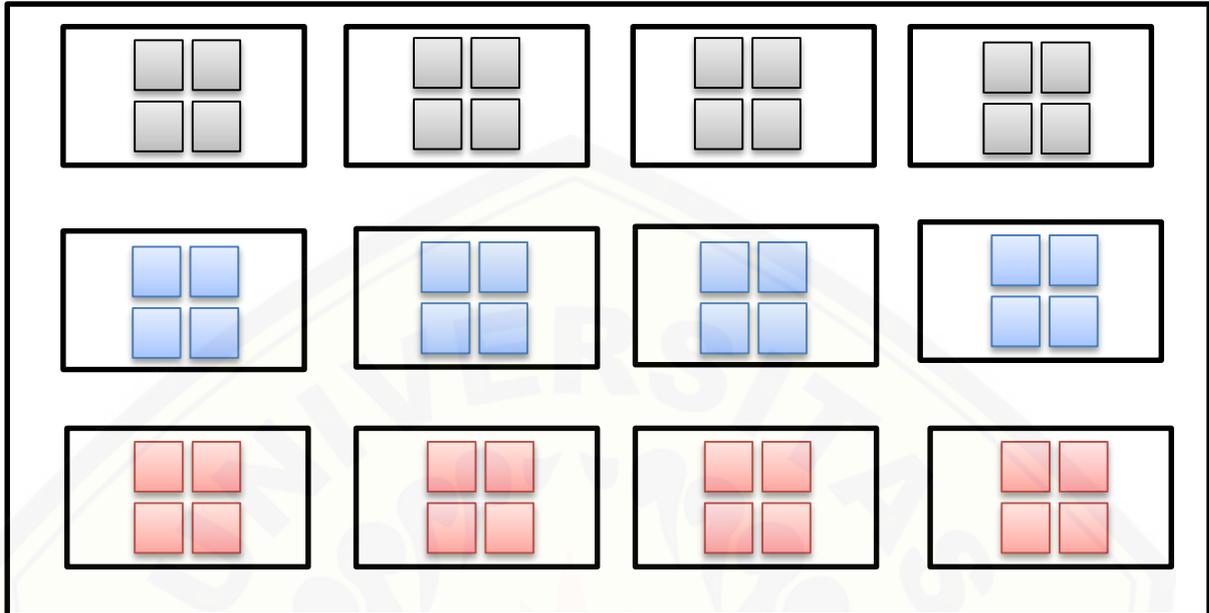
Pertama siapkan well plate culture. Kemudian masukkan *cover slip* pada masing-masing *well plate*. Kemudian masukkan suspensi sel sebanyak 100 µl pada *cover slip*. Kemudian diinkubasi dalam inkubator 37⁰C untuk penempelan sel selama 10 menit. Kemudian tambahkan 1 ml media kultur (RPMI), inkubasi 20-30 menit pada suhu 37⁰C. Amati dibawah mikroskop inferted, dengan cara menggoyang secara perlahan untuk melihat penempelan selnya. Cuci menggunakan RPMI sebanyak tiga kali, untuk melepaskan kontaminasi sel. Amati dibawah mikroskop inverted. Ganti media kultur menggunakan M 199. Sel yang siap diberi perlakuan ditambahkan RPMI 500 µl.

d. Perlakuan Seduhan kopi (*Coffea canephora*) dan BHI-B

Setelah monosit pada semua kelompok menempel pada well plate culture. Diamkan monosit selama 15 menit supaya monosit dalam keadaan resting. Kemudian ditambahkan 100 µl seduhan kopi robusta dengan perbandingan 3 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquadest dan 6 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquadest terhadap radikal superoksida yang telah di sterilisasi dengan filter syringe. Dilanjutkan dengan melakukan inkubasi selama 30 menit. Kemudian lakukan pemaparan dengan antigen bakteri *Streptococcus mutans* sebanyak 100 µl dan pemaparan 250 µl NBT pada seluruh kelompok. Kemudian inkubasi seluruh kelompok dalam incubator shaker pada suhu 37°C selama 30 menit.

e. Penghitungan radikal superoksida monosit intra seluler

Setelah medium diambil, monosit pada *cover glass* dibilas dengan RPMI, kemudian difiksasi dengan methanol, lalu diangin-anginkan. Pewarnaan *counter stain* dilakukan dengan safranin. Kemudian presentase sel yang mengandung partikel formazan berwarna kebiruan pada intrasel monosit dievaluasi dengan mikroskop binokuler perbesaran 1000x dengan bantuan optilab dan *image raster*. 100 monosit secara acak didapatkan dari 4 lapang pandang pada tiap kelompok (Gambar 3.2). Presentase monosit yang memproduksi radikal superoksida intrasel dihitung oleh tiga orang pengamat, kemudian hasilnya dirata-rata. Aktivitas antioksidan dapat diketahui dengan tidak ada formazan biru-ungu pada sekitar membran monosit (Yagisawa *et al.*, 1996; Sim *et al.*, 2006).



Gambar 3.2 Penghitungan monosit sesuai dengan pengelompokkan. Dalam satu preparat tersebut dapat dibagi menjadi 4 slide untuk mempermudah dalam proses penghitungan sel.

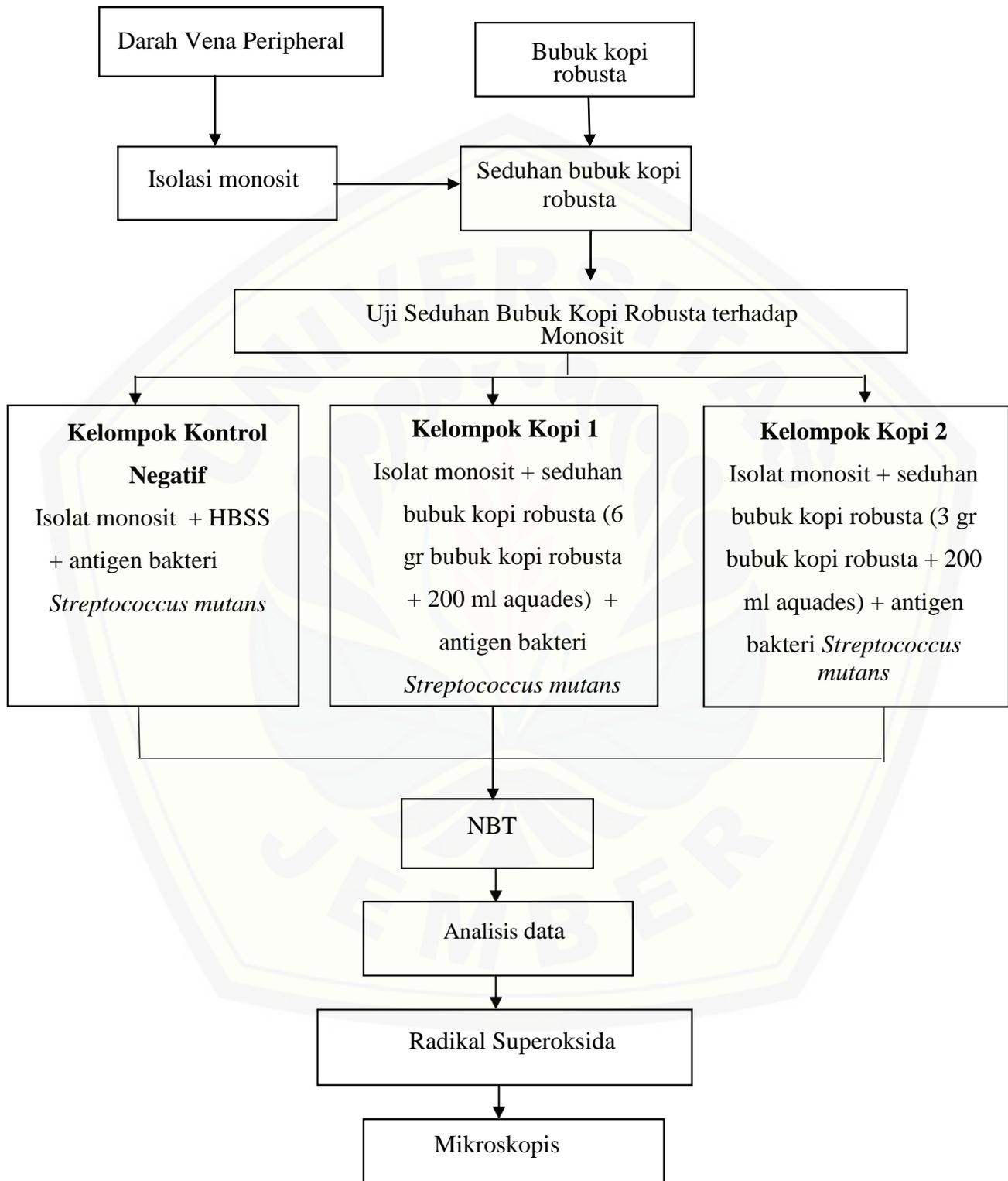
Keterangan :

-  : Kelompok kopi 1 (sel monosit-antigen yang dipapar dengan seduhan 6gr/200ml) dan di Uji NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*)
-  : Kelompok kopi 2 (sel monosit-antigen yang dipapar dengan seduhan 3gr/200ml) dan di Uji NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*)
-  : Kelompok tanpa kopi sel monosit-antigen dan di Uji NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*)

3.7 Analisis Data

Pada penelitian ini data yang didapatkan yaitu hasil rata-rata presentase monosit yang memproduksi radikal superoksida tiap 100 sel diuji normalitas dan homogenitas. *Kolmogrov Smirnov* untuk uji normalitas dan uji *Levene* untuk uji homogenitas. Data yang dihasilkan terdistribusi normal dan homogen, dilakukan uji statistik parametrik, yaitu *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji LSD. Semua uji menggunakan tingkat kemaknaan 95% ($\alpha = 0,05$) (Notoatmodjo, 2005).

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa terdapat

1. Kopi mempunyai efek antioksidan yang dapat menghambat produksi radikal superoksida. Pada penelitian ini seduhan kopi yang mempunyai efek antioksidan lebih tinggi adalah dosis 3gr/200ml.

5.2 Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis dan toksisitas seduhan yang tepat untuk dikonsumsi setiap harinya.
2. Perlu penelitian lebih lanjut untuk dilakukan penelitian dengan metode *in vivo*.
3. Perlu penelitian lebih lanjut untuk membandingkan dengan jenis kopi yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- AAK. 1988. *Budidaya Tanaman Kopi*. Yogyakarta: Kanisius.
- Ahmad, S. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Karunika Jakarta Universitas Terbuka.
- Alfadda, A. A. dan R. M. Sallam. Reactive Oxygen Species in Health and Disease.. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012(14).
- Antonio, A.G., N.L.Iorio, V.S.Pierro, M.S.Candrea, A.Farah, K.R.D.Santos dan L.C.Maia. 2011. Inhibitory properties of coffea canephora extract against oral bacterial and its effect on demineralization of deciduous teeth. *Arch Oral Biology*. 55(6).
- Arvin, A. M., B. Robert ., dan Kliegman. 2000. *Ilmu Kesehatan Anak Nelson*. Volume 3 Edisi 15. Jakarta: EGC.
- Astuti S. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13(2).
- Baratawidjaja, K.G. 2004. *Imunologi Dasar*. Edisi 6. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Behr, G. A., J. C. F. Moreira, dan B.N. Frey. Preclinical and Clinical Evidence of Antioxidant Effects of Antidepressants: Implications for the Pathophysiology of Major Depressive Disorder.. *Hindawi Publishing Corporation*. 2012(13).
- Black, C., Penninx, BWJH., Bot, M., Odegaard, AO., Gross, MD. Matthew, KA. 2016. Oxidative stress, anti-oxidants and the cross-sectional and longitudinal association with depressive symptoms: results from the CARDIA study. *Open access www.nature. Com*. [23 februari 2018].
- Corwin, E.J. 2009, *Buku Saku Patofisiologi*. Edisi 3. Jakarta: EGC.
- Chusnia, Wilda. 2014. Struktur Membran Sel. [on line]. Available Open access from: <http://id.shvo-ong.com/exact>. [23 Februari 2018].
- Daniel, W. W. 2009. *Biostatistic a Foundation for Analisis in The Health Science*. 9th Edition. Georgia: Willey.
- Dias, R. C. E. dan M. de T. Benassi. 2015 *Discrimination between Arabica and Robusta Coffees Using Hydrosoluble Compounds: Is the Efficiency of the Parameters Dependent on the Roast Degree?*. Beverages. ISSN 2306- 5710.

- Dong, C., Y, Soon Kim., , A. Wha., Y. Na Lee1., S. Min Kim., C. Heum Kim., S. Ha Lee1., D. Choi1., and J. Min Lee1. 2011. Possible Health Effects of Caffeinated Coffee Consumption on Alzheimer's Disease and Cardiovascular Disease. *Open access www.toxmut.or.kr*. [25 Februari 2018]
- Erdiansyah, N. P., U. Sumirat, dan Priyono. 2014. Keragaman Potensi Daya Hasil Populasi Bastar Kopi Robusta (*Coffea canephora*). *Pelita Perkebunan*. 30(2): 92-99.
- Farhaty, N. dan Muchtaridi. Tinjauan Kimia Dan Aspek Farmakologi Senyawa Asam Klorogenat Pada Biji Kopi : *Review*. *Farmaka*. 4(3): suplemen 1.
- Farmakologi UI. 2002. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Jakarta: Gaya Baru.
- Fritz, H. dan M. F. *Atlas Hematologi*. Alih bahasa : Septelia Inawati Wanandi. EGC. Jakarta, 1999 : 9-13.
- Gandjar, Ibnu Gholib dan Abdul Rohman. 2008. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gardjito, M. dan D. R. A. 2011. *Kopi*. Yogyakarta: Kanisius.
- Hanani, E., A. Mun'im, dan R. Sekarin. 2005. Identifikasi senyawa antioksidan Dalam spons *callyspongia* sp Dari kepulauan seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2(3): 127-133.
- Harborne, J. B.1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Bandung: ITB.
- Hariyati, Y. 2014. Pengembangan produk olahan kopi di desa sidomulyo kecamatan silo kabupaten jember. *Agriekonomika*. 3(1):
- Held, P. 2015. *An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells*. BioTek Instruments, Inc. Winooski, Vermon USA.
- Karina, A., Supriyadi., Sonny S. 2014. Jumlah Sel pada Isolat Monosit Setelah Paparan Tunggal Radiasi Sinar X dari Radiografi Periapikal (The Total of Cells on The Isolated Monocytes After Single Exposure of X-Ray Radiation from Periapical Radiography). *e-Jurnal Pustaka Kesehatan*. 2(3): 563-569.
- Kumar, V., C. R. S, dan R. S. L. 2007. *Buku Ajar Patologi*. Edisi 7. Jakarta: EGC.
- Lestari, Fatma. 2009. *Bahaya Kimia : Sampling dan Pengukuran Kontaminasi Kimia di Udara*. Jakarta: EGC.
- Lingga, L. 2012. *The Healing Power of Antioxidant*. Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Marcelinda, A., A. Ridhay, dan Prismawiryanti. 2016. *Aktivitas Antioksidan Ekstrak*

Limbah Kulit Ari Biji Kopi (*Coffea sp*) Berdasarkan Tingkat Kepolaran Pelarut. *Online Jurnal of Natural Science*. 5(1): 21- 30.

Marks, D., A. Marks, dan C. Smith. 2000. *Basic mdical Biochemistry : A Clinical Approach*. Biokimia kekteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis. Suyono, Joko et al. Jakarta: EGC.

Mehta, A. dan V. Hoffbrand. 2006. *Haematology at a Glance*. diterjemahkan oleh dr. Hunawarti Hartanto. Jakarta: Penerbit Erlangga.

Miyajima, S., K. Naruse., Y. Kobayashi., N. Nakamura., T. Nishikawa., K. Adachi.,Y. Suzuki., T. Kikuchi1, A. Mitani., M. Mizutani., N. Ohno, T. Noguchi danT. Matsubara. 2014. Periodontitis-activated monocytes/ macrophages cause aortic inflammation. *Open access www.nature.com/scientificreports*. [08 Desember 2017].

Murray, R. K., D. K. Granner, dan V. W. 2009. *Rodwell Biokimia harper (27 ed.)*. Jakarta: EGC.

Mustanir dan Rosnani.2008. Isolasi Senyawa Bioaktif Penolak (Repellent) Nyamuk Dari Ekstrak Aseton Batang Tumbuhan Legundi (*Vitex trifolia*). 19(2): 174 – 180.

Nimse, S. B., dan D. Pal. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Open access www.rsc.org/advances*. [09 Desember 2017]

Nonthakaew, A., N. Matan., T. Aewsiri., dan N. Matan. 2015. Caffeine in foods and its antimicrobial activity. *International Food Research Journal*. 22(1): 9- 14.

Notoatmodjo, S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT. Rineka Cipta.

Panggabean, Edy. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: Agro media Pustaka.

Prastowo, Bambang.,dkk. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Jakarta.

Pusat Studi Biofarmaka LPPM IPB (2014) *Sehat Alami dengan Herbal, 250 Tanaman Herbal Berkhasiat Obat*. Jakarta:GramediaPustakaUtama.

Rahardjo, P. 2012. *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Rizky,T. A., C. Saleh, dan Alimuddin. 2015. Analisis Kafein Dalam Kopi Robusta (Toraja) Dan Kopi Arabika (Jawa) Dengan Variasi Siklus Pada Sokletasi. *Jurnal kimia mulawarman*. 13(1): 1693-5616.

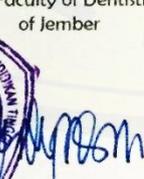
Rohmah, M. 2009. Kajian Sifat Kimia, Fisik, dan Organoleptik Kopi Robusta(*Coffea canephora*),Kayu Manis (*Cinnamon unburmanii*), dan Campurannya. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 4(2): 75 – 8.

- Sourav, M., Bibhabasu, H., Rhitajit, S., Santanu, B., Nripendranath, M. 2011. Assessment of the Antioxidant and Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Methanolic Extract of *Caesalpinia acrista* leaf. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 11(11).
- Tanaka, J.C.A. C.C. da Silva, A.J.B. de Oliveira, C.V. Nakamura and B.P. Dias Filho. 2006. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Antimicrobial activity of A. ramiflorum Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39: 387-391
- Tao, L. dan K. Kendall. 2013. *Hematologi Dan Onkologi*. Padang: Kharisma Publishing Group.
- Winarsih, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Yagisawa, M., A. Yuo., M. Yonemaru., S. Imajoh-Ohmi., S. Kanegasaki., Y. Yazaki, dan F. Takaku. 1996. Superoxide Release And NADPH Oxidase Components In Mature Human Phagocytes: Correlation Between Functional Capacity And Amount Of Functional Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 228(2): 510-516.
- Yahmadi, M. 2007. *Rangkaian Perkembangan dan Permasalahan Budidaya & Pengolahan Kopi di Indonesia*. Surabaya: AEKI.
- Yashin, A., Y. Yakov., J. Y. Wang, dan B. Nemzer. 2013. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Open access www. mdpi.com/journal/antioxidants* [16 November 2017]

LAMPIRAN

A. Surat Keterangan

A.1. Ethical Clearance

	<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER <i>(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH DENTAL FACULTY UNIVERSITY OF JEMBER)</i></p>
<p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL <u>No. 001/UN25.8/KEPK/DL/2018</u></p>	
Title of research protocol	: "Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta (<i>Coffea Canephora</i>) Terhadap Produksi Radical Superoksida Monosit In Vitro"
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Prisca Vanda Sukma
Member of research	: -
Responsible Physician	: Prisca Vanda Sukma
Date of approval	: February 5 th , 2018
Place of research	: 1. Bioscience Laboratory RSGM University of Jember
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry University of Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p>	
<p>Jember, February 10th, 2018</p>	
<p>Dean for Research, Community Service and Collaboration Faculty of Dentistry University of Jember</p>  <p>(Dr. P. Mahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)</p>	<p>Chairman of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry University of Jember</p>  <p>(Dr. I Dewa Ayu Susilawati, drg. M. Kes.)</p>

A.2. Surat Ijin Penelitian

	KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS JEMBER FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991	
Nomor	: 4060/UN25.8.TL/2017	25 OCT 2017
Perihal	: Ijin Penelitian	
<p>Kepada Yth Direktur RSGM Universitas Jember Di Jember</p>		
<p>Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :</p>		
1	Nama	: Prisca Vianda Sukma
2	NIM	: 141610101019
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl.Mastrip 2 No. 36 Jember
6	Judul Penelitian	: Aktivitas Antioksidan Seduhan Biji Kopi Robusta (Coffea Robusta) Terhadap Radikal Superoksida Monosit In Vitro
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: Sentrifuse vertical, incubator shaker, mikroskop
9	Waktu	: Oktober 2017
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Mengetahui Uji Efektivitas Seduhan Biji Kopi Robusta Sebagai Antioksida Superoksida Sel Monosit In Vitro
11	Dosen Pembimbing	: 1. Prof. Dr.drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, MS 2. Dr.drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes
<p>Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih</p>		
<p>an Dekan Wakil Dekan I,</p>  <p>Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes NIP.196109031986022001</p>		

A.3. Informed Consent

SURAT PERSETUJUAN
INFORMED CONSENT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama :

Umur :

Jenis Kelamin :

Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari :

Nama : Prisca Vianda Sukma

NIM : 141610101019

Fakultas : Kedokteran Gigi

Alamat : Jl. Mastrip 2 No.36

Dengan judul penelitian **AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SEDUHAN BUBUK KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP PRODUKSI RADIKAL SUPEROKSIDA MONOSIT 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, 7 Februari 2018

Yang menyatakan

()

Lembar Penjelasan

Saya Prisca Vianda Sukma adalah mahasiswi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, yang sedang melakukan penelitian dengan judul AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SEDUHAN BUBUK KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP PRODUKSI RADIKAL SUPEROKSIDA MONOSIT IN VITRO.

Penelitian ini dilaksanakan sebagai rangkaian dalam menyelesaikan tugas akhir. Tujuan dari penelitian ini adalah Mengkaji aktivitas antioksidan seduhan bubuk kopi robusta terhadap radikal superoksida monosit yang distimuli antigen bakterial. Manfaat dari penelitian ini adalah meningkatkan pemahaman tentang aktivitas antioksidan dari seduhan bubuk kopi.

Penelitian ini melalui beberapa tahapan penelitian yaitu terdiri dari tahap persiapan (isolat monosit), tahap uji aktivitas antioksidan, dan tahap analisis. Bila subyek sudah memutuskan untuk ikut, subyek bebas untuk mengundurkan diri/berubah pikiran tanpa dikenai denda atau sanksi.

Saya mengharap ketersediaan saudara untuk berpartisipasi dalam penelitian ini. Saya menjamin kerahasiaan identitas dan informasi yang didapat hanya akan digunakan untuk kepentingan penelitian.

Demikian lembar penjelasan ini saya buat, atas partisipasinya saya ucapkan teimakasih.

Jember, 7 Februari 2018

(Prisca Vianda Sukma)

A.4. Surat Keterangan Identifikasi



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

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

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

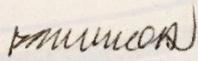
Nama/NIM : 1. Kholisa/141610101054
2. Arina Nur Rahmah/141610101032
3. Prisca Vianda Sukma/141610101019
4. Azizah Safaatin/141610101033

Jurusan/Fak/PT : Kedokteran Gigi/Universitas Jember

Maka dapat disampaikan hasilnya bahwa bakteri tersebut adalah:
Streptococcus mutans

Demikian, mudah-mudahan bermanfaat.

Jember, 7 Februari 2018
Kalab. Mikrobiologi



Drs. Rudju Winarsa, M. Kes
196008161989021001

B. Analisis Data**B.1 Penghitungan Kelompok kopi 1**

Nama Kelompok	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
MA1	36%	40%	37%	38%
MA2	40%	43%	43%	42%
MA3	37%	38%	34%	36%
MA4	40%	45%	41%	42%
Rata-rata				40%

B.2. Penghitungan Kelompok kopi 2

Nama Kelompok	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
MB1	41%	44%	38%	41%
MB2	46%	50%	47%	48%
MB3	43%	39%	27%	37%
MB4	31%	34%	29%	31%
Rata-rata				39%

B.3 Penghitungan Kelompok tanpa kopi

Nama Kelompok	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
MC1	50%	49%	53%	51%
MC2	56%	51%	50%	53%
MC3	49%	51%	48%	49%
MC4	53%	52%	51%	52%
Rata-rata				51%

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kelompok	Formazan
N		12	12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	2,00	43,33
	Std. Deviation	,853	7,165
Most Extreme Differences	Absolute	,213	,159
	Positive	,213	,157
	Negative	-,213	-,159
Test Statistic		,213	,159
Asymp. Sig. (2-tailed)		,139 ^c	,200 ^{c,d}

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.
- d. This is a lower bound of the true significance.

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,207	2	9	,089

B.5 Hasil Uji levene

Test of Homogeneity of Variances

Formazan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,207	2	9	,089

B.6 Hasil Uji One Way Anova

ANOVA

Formazan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	376,167	2	188,083	8,980	,007
Within Groups	188,500	9	20,944		
Total	564,667	11			

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation
Formazan	4	39,50	3,000
Valid N (listwise)	4		

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation
Formazan	4	39,25	7,136
Valid N (listwise)	4		

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation
Formazan	4	51,25	1,708
Valid N (listwise)	4		

B. 7 Hasil Uji LSD

Multiple Comparisons

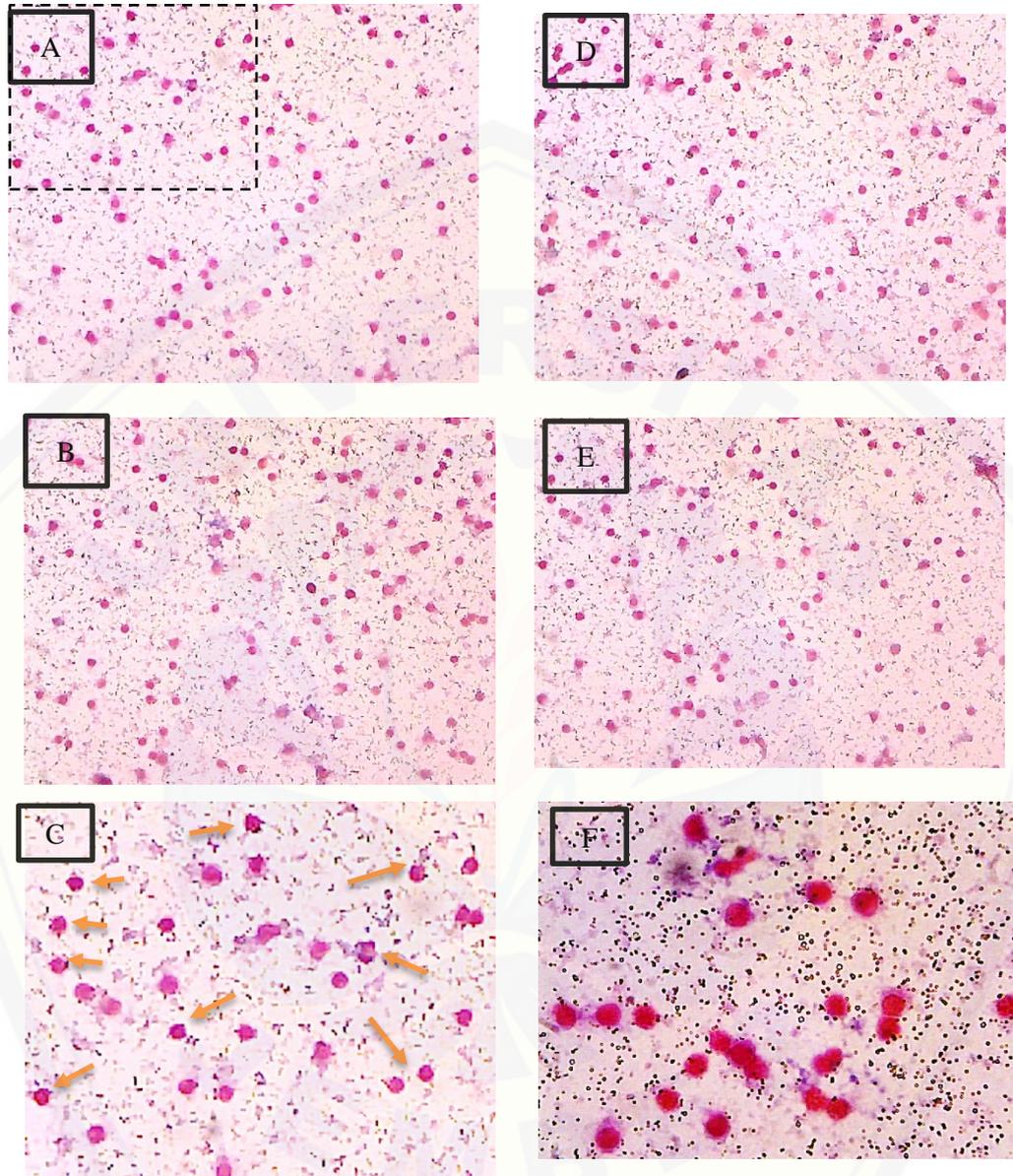
Dependent Variable: Formazan

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)			95% Confidence Interval	
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
kelompok kopi 1	kelompok kopi 2	,250	3,236	,940	-7,07	7,57
	kelompok k(-)	-11,750*	3,236	,005	-19,07	-4,43
kelompok kopi 2	kelompok kopi 1	-,250	3,236	,940	-7,57	7,07
	kelompok k(-)	-12,000*	3,236	,005	-19,32	-4,68
kelompok k(-)	kelompok kopi 1	11,750*	3,236	,005	4,43	19,07
	kelompok kopi 2	12,000*	3,236	,005	4,68	19,32

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

C.1 Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida pada kelompok kopi 1 (monosit-antigen dengan dipapar seduhan kopi 6gr/200ml)

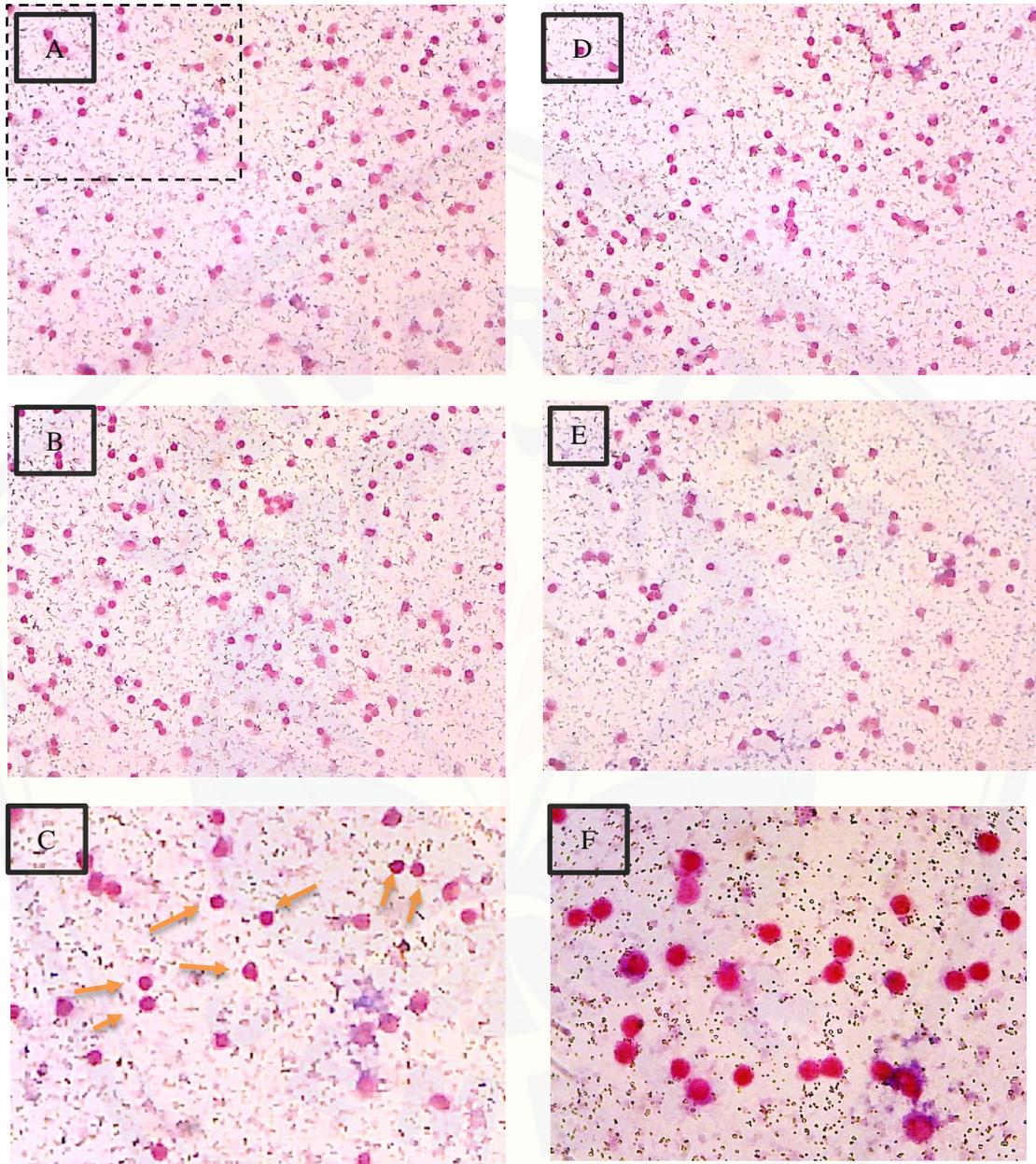


Gambar C. 1 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri dan seduhan kopi 6gr/200ml. (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- Silde 1 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- Slide 2 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- Slide 3 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- Slide 4 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- Perbesaran 1000x

C.2 Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida pada kelompok kopi 1 (monosit-antigen dengan dipapar seduhan kopi 6gr/200ml)

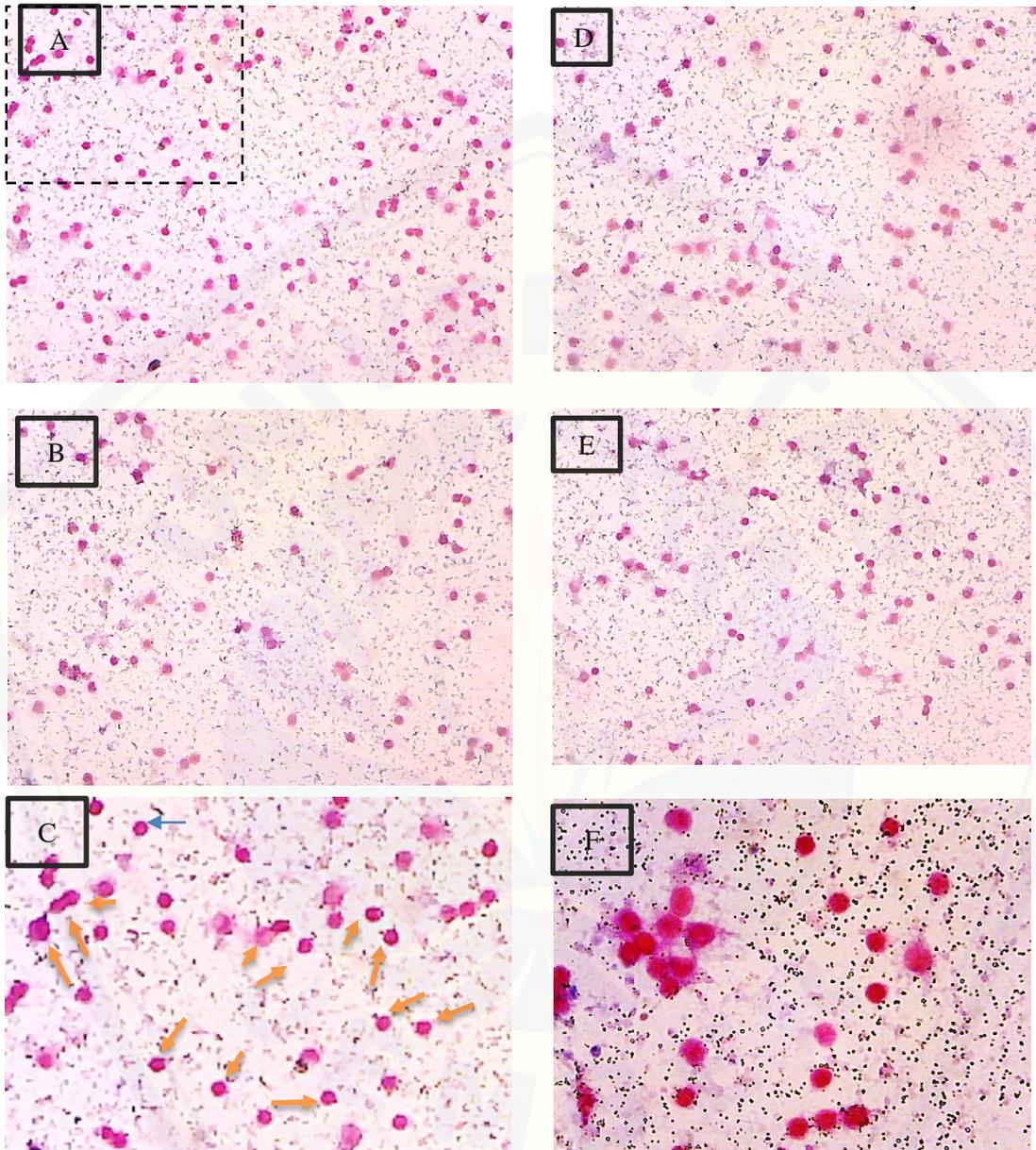


Gambar C. 2 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri dan seduhan kopi 6gr/200ml. (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- a. Slide 1 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- b. Slide 2 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- c. Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- d. Slide 3 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- e. Slide 4 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- f. Perbesaran 1000x

C.3. Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida pada kelompok kopi 1 (monosit-antigen dengan dipapar seduhan kopi 6gr/200ml)

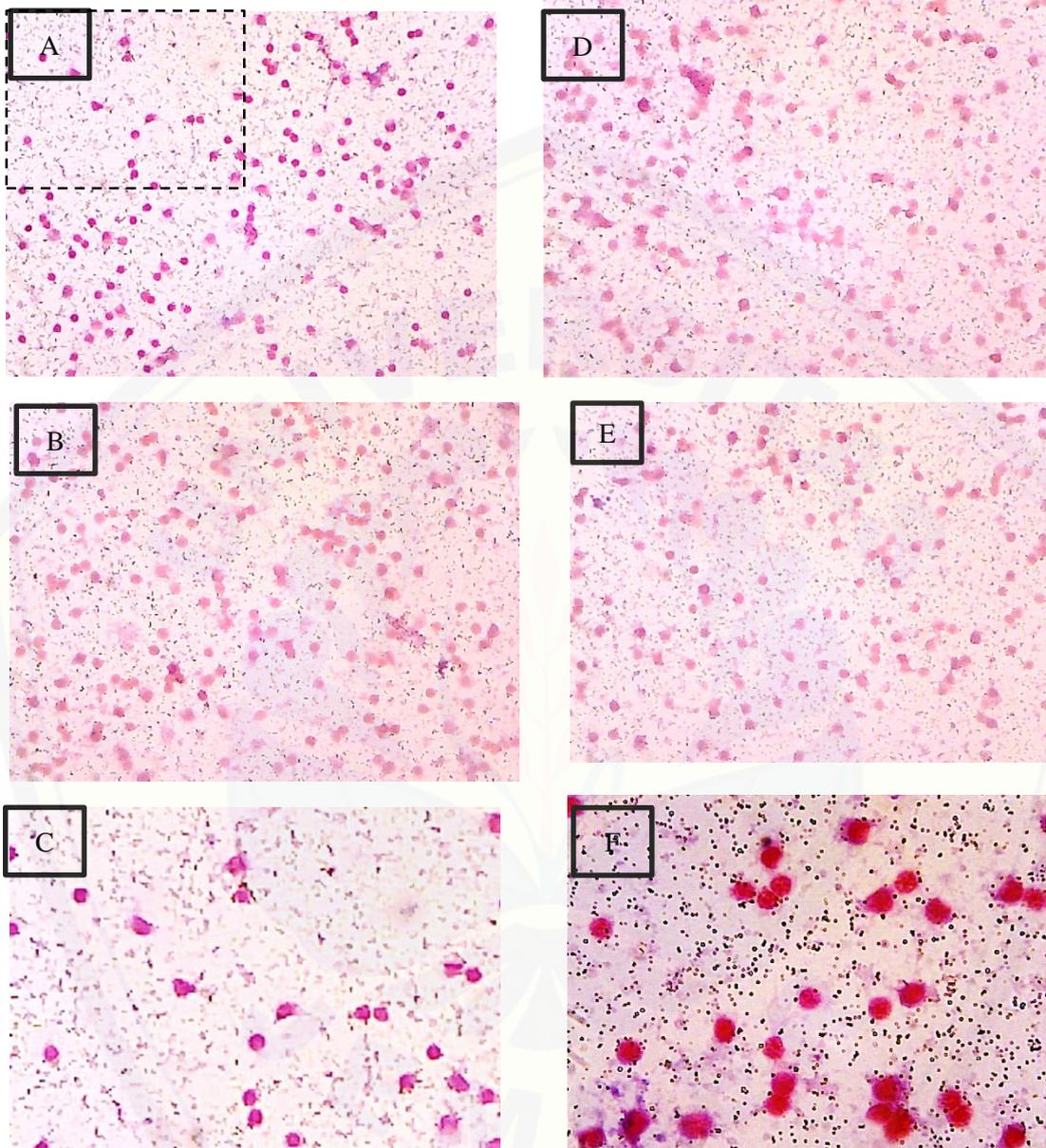


Gambar C. 3 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri dan seduhan kopi 6gr/200ml. (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- a. Slide 1 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- b. Slide 2 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- c. Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- d. Slide 3 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- e. Slide 4 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- f. Perbesaran 1000x

C.4. Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida pada kelompok kopi 1 (monosit-antigen dengan dipapar seduhan kopi 6gr/200ml)

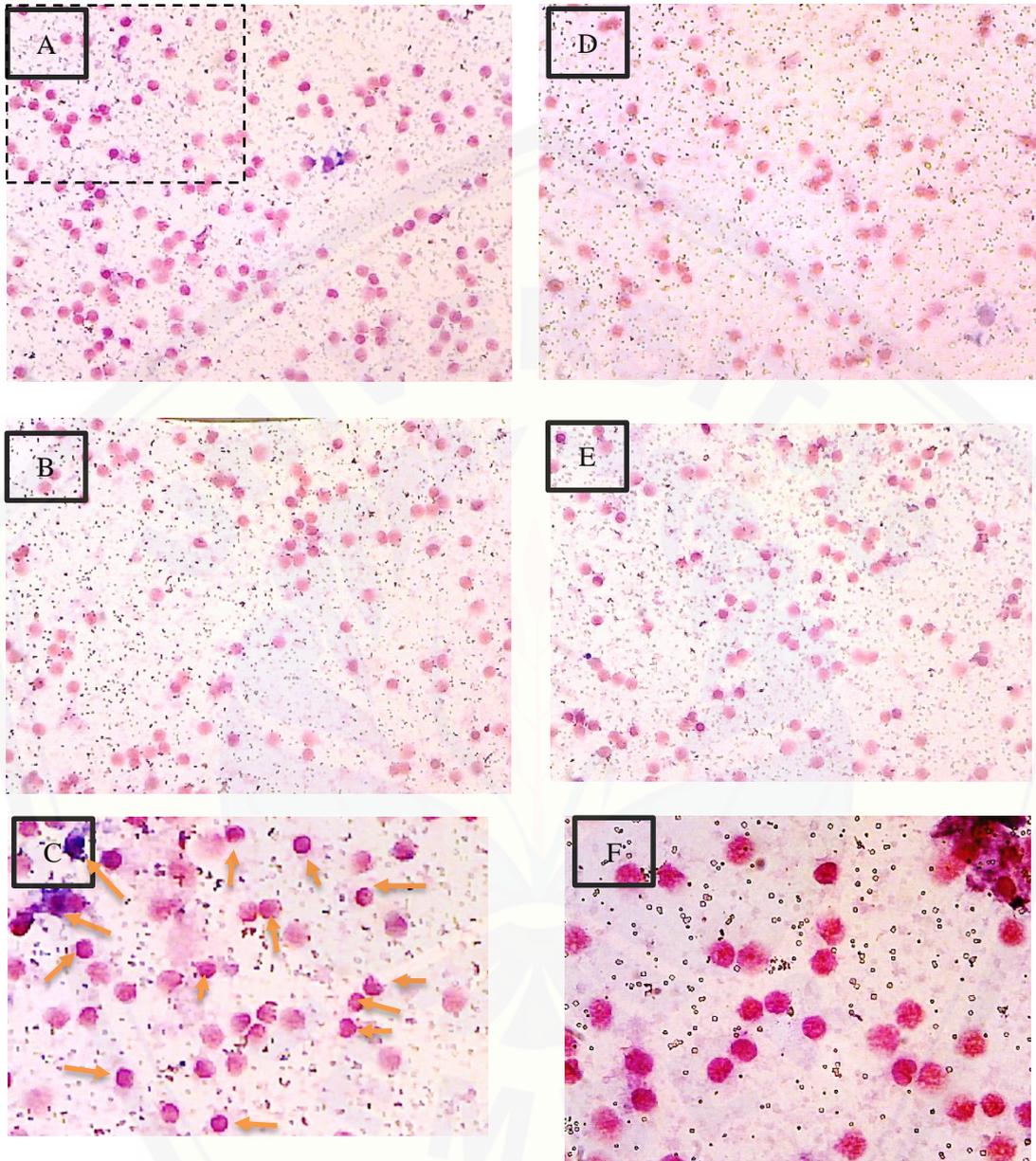


Gambar C. 4 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri dan seduhan kopi 6gr/200ml. (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- a. Silde 1 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- b. Slide 2 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- c. Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- d. Slide 3 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- e. Slide 4 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- f. Perbesaran 1000x

D. Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida pada kelompok kopi 1 (monosit-antigen dengan dipapar seduhan kopi 3gr/200ml)

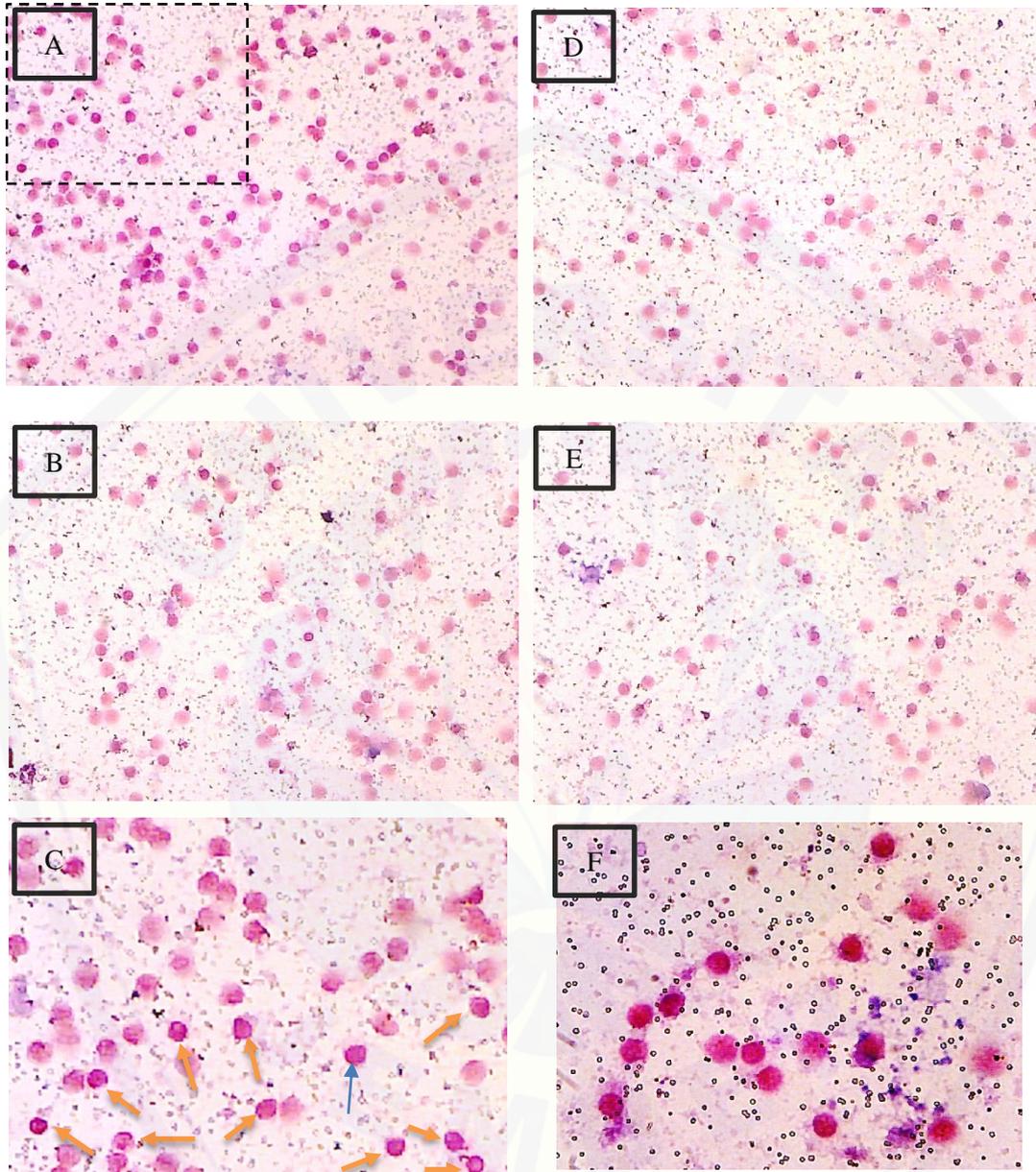


Gambar D.1 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri dan seduhan kopi 3gr/200ml. (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- a. Slide 1 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- b. Slide 2 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- c. Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- d. Slide 3 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- e. Slide 4 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- f. Perbesaran 1000x

D.2 Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida pada kelompok kopi 2 (monosit-antigen dengan dipapar seduhan kopi 3gr/200ml)

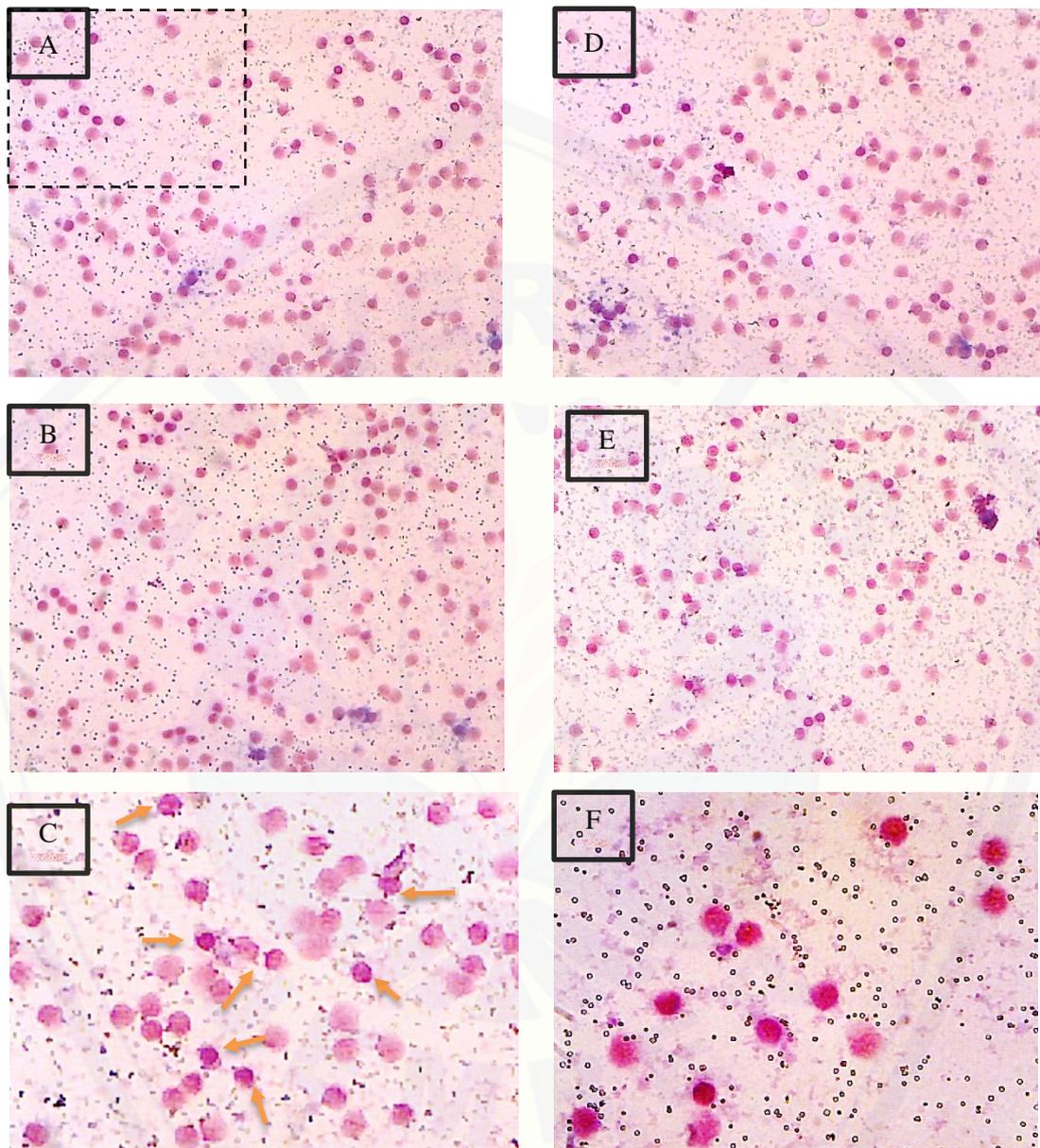


Gambar D.2 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri dan seduhan kopi 3gr/200ml. (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- Slide 1 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- Slide 2 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- Slide 3 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- Slide 4 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- Perbesaran 1000x

D.3 Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida pada kelompok kopi 1 (monosit-antigen dengan dipapar seduhan kopi 3gr/200ml)

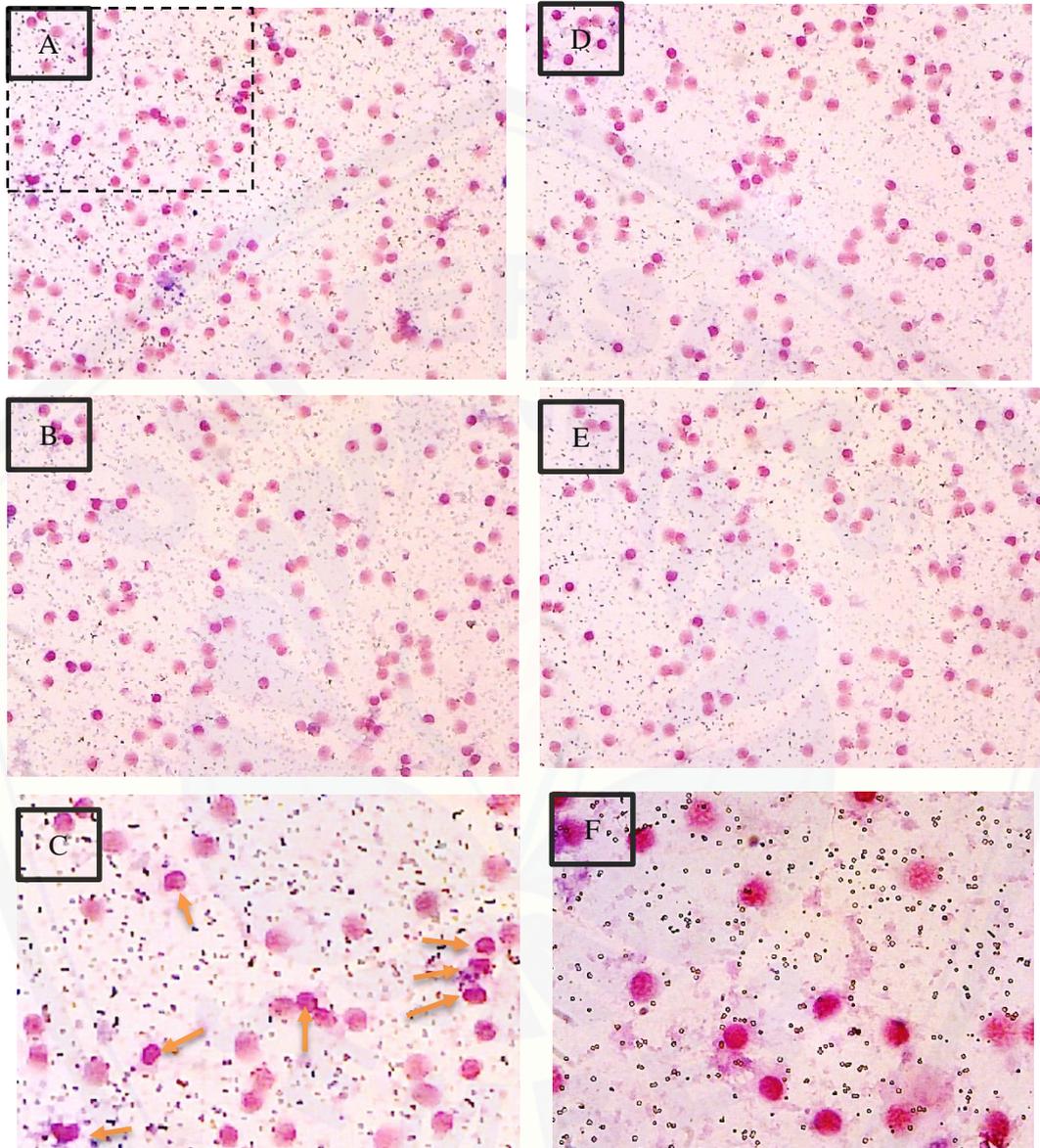


Gambar D.3 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri dan seduhan kopi 3gr/200ml. (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- a. Slide 1 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- b. Slide 2 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- c. Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- d. Slide 3 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- e. Slide 4 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- f. Perbesaran 1000x

D.4 Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida pada kelompok kopi 1 (monosit-antigen dengan dipapar seduhan kopi 3gr/200ml)

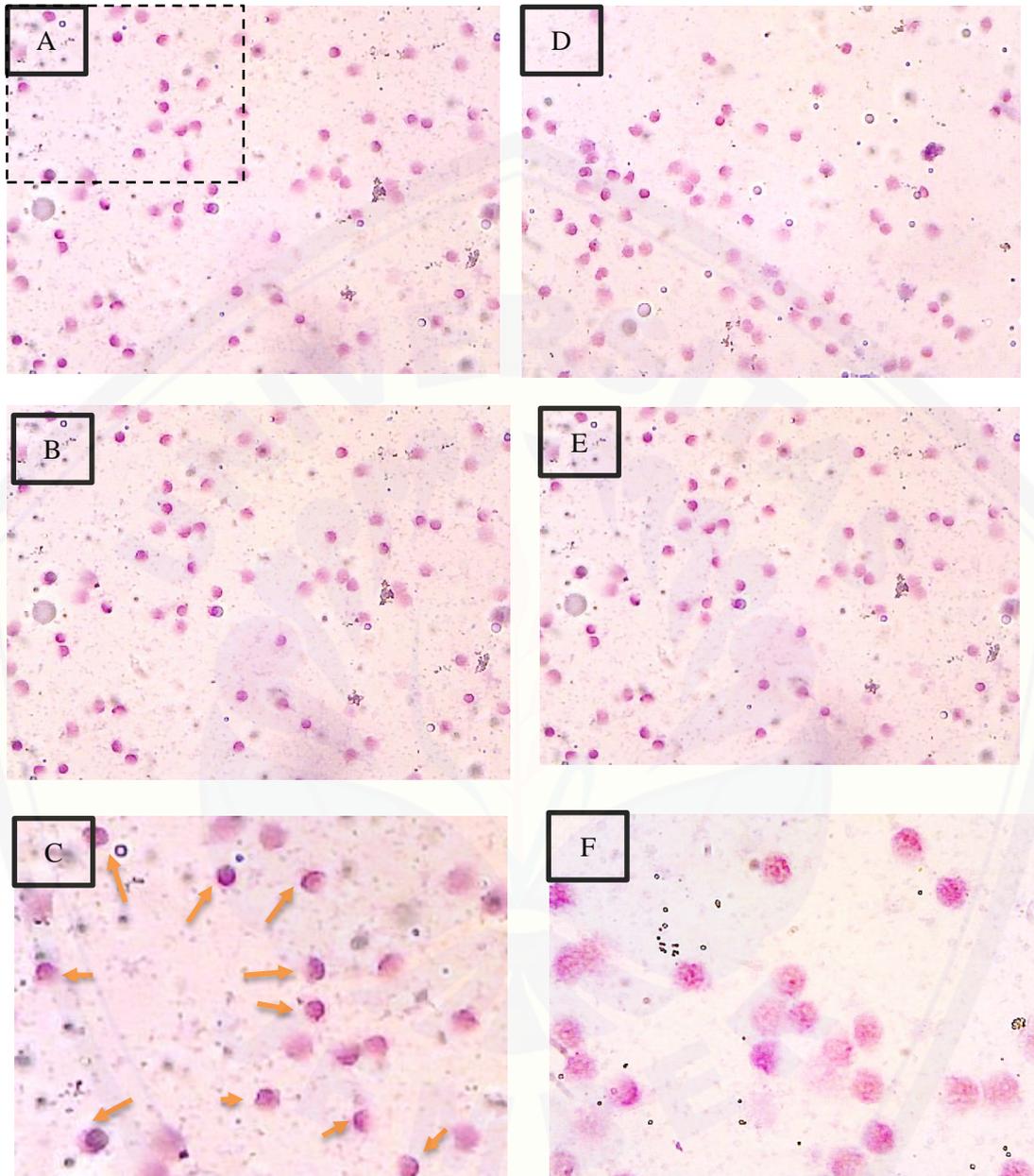


Gambar D.4 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri dan seduhan kopi 3gr/200ml. (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- a. Silde 1 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- b. Slide 2 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- c. Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- d. Slide 3 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- e. Slide 4 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- f. Perbesaran 1000x

E.1 Gambaran mikroskopis (monosit-antigen yang memproduksi radikal superoksida tanpa dipapar seduhan kopi)

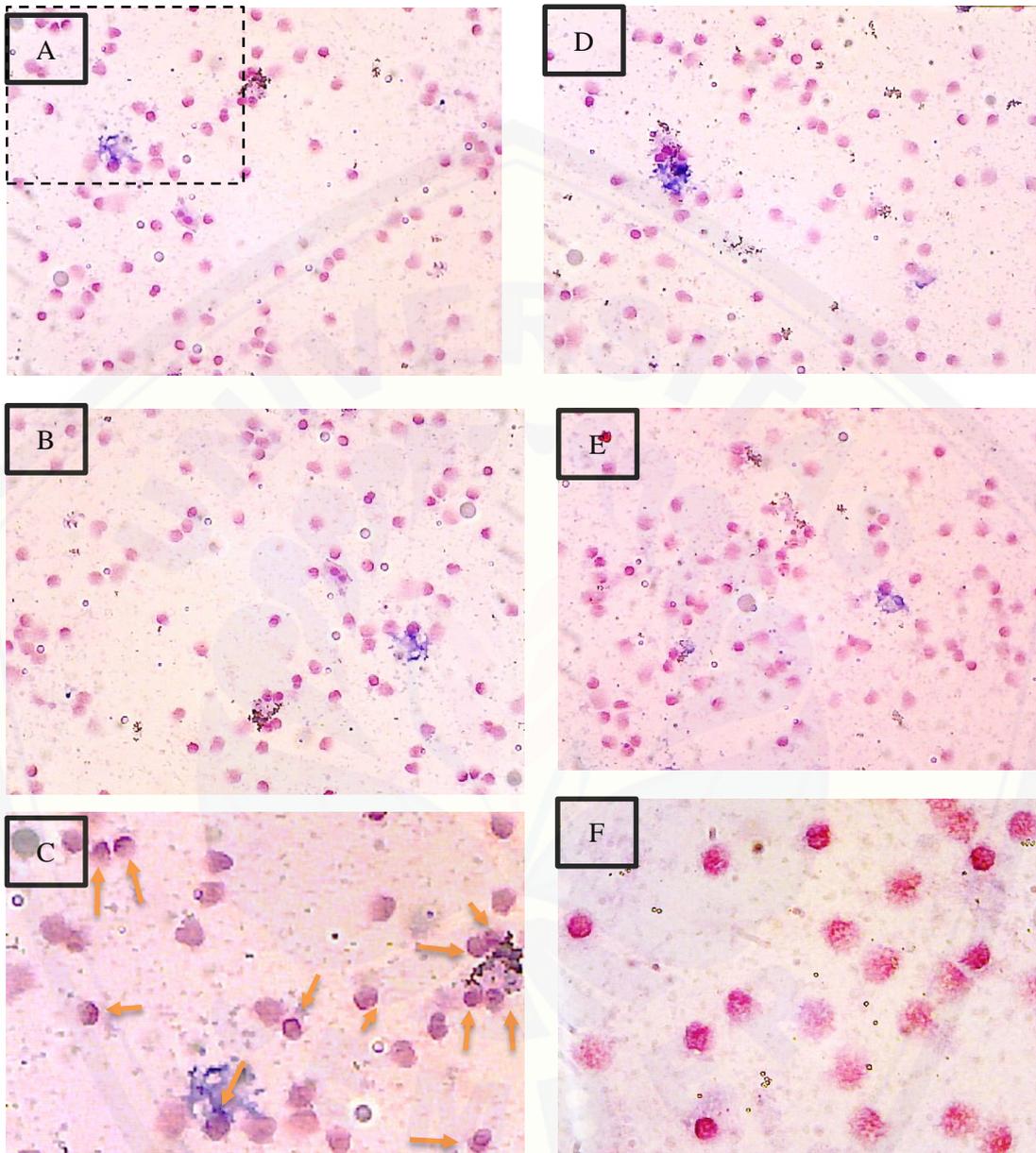


Gambar E.1 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri tanpa di papar seduhan kopi dan dilakukan (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- a. Silde 1 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- b. Slide 2 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- c. Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- d. Slide 3 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- e. Slide 4 pada preparat 1 dengan perbesaran 400x
- f. Perbesaran 1000x

E.2 Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida pada kelompok tanpa kopi (monosit-antigen dengan tanpa dipapar seduhan kopi)

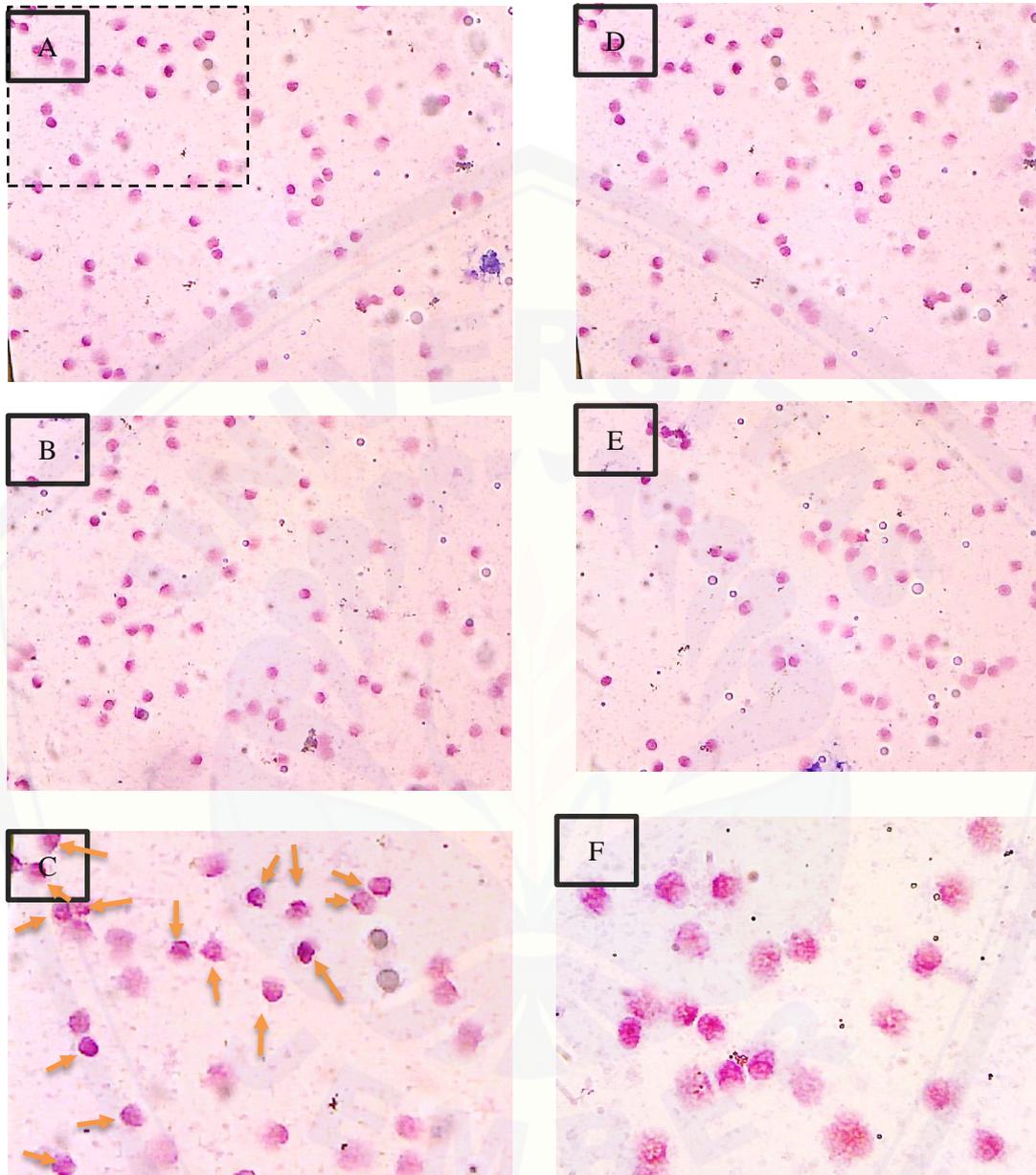


Gambar E.2 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri tanpa dipapar kopi dan dilakukan (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- a. Slide 1 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- b. Slide 2 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- c. Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- d. Slide 3 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- e. Slide 4 pada preparat 2 dengan perbesaran 400x
- f. Perbesaran 1000x

E.3 Gambaran mikroskopis (monosit-antigen yang memproduksi radikal superoksida tanpa dipapar seduhan kopi)

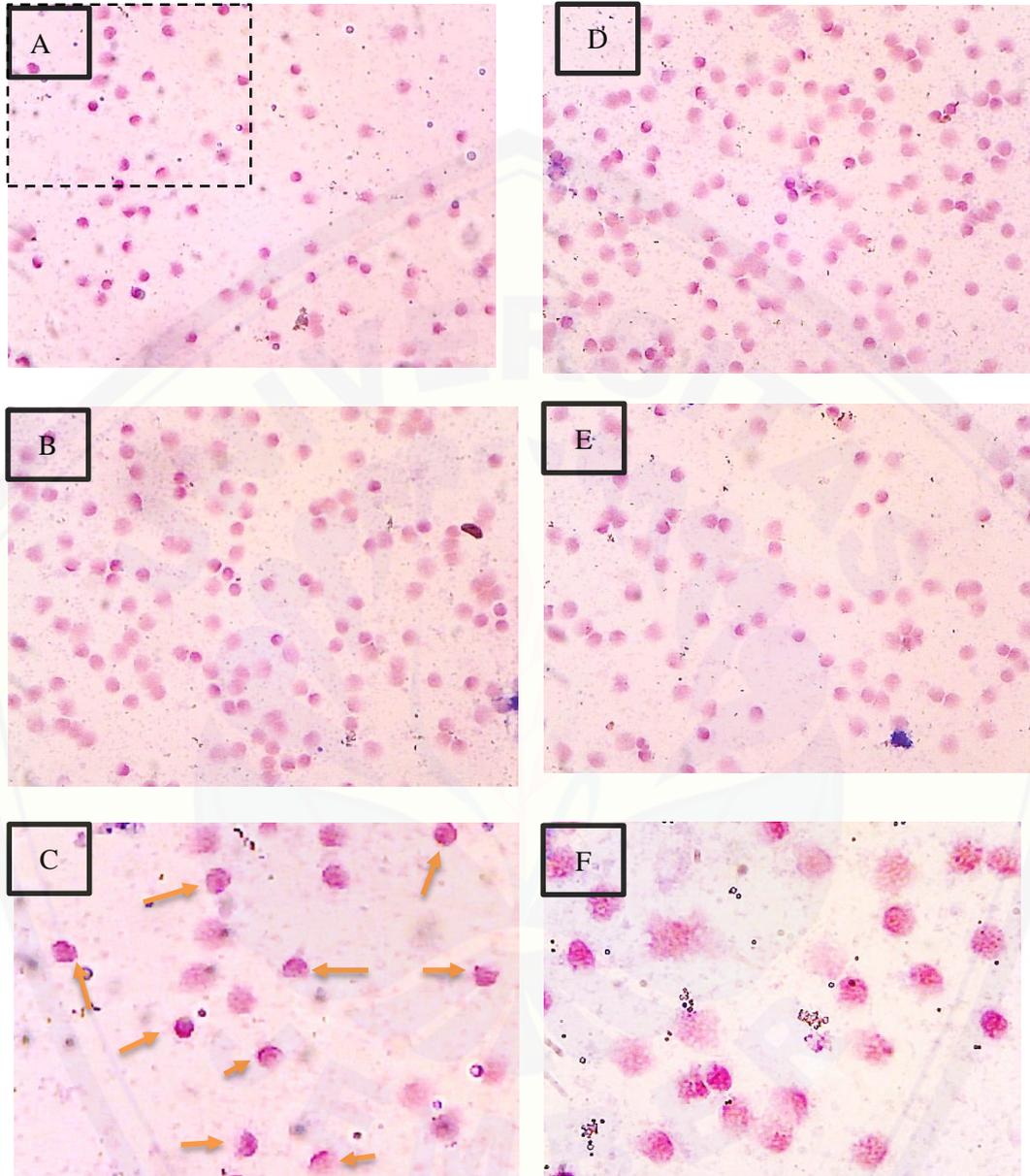


Gambar E.3 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri tanpa dipapar seduhan kopi dan dilakukan (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- a. Slide 1 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- b. Slide 2 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- c. Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- d. Slide 3 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- e. Slide 4 pada preparat 3 dengan perbesaran 400x
- f. Perbesaran 1000x

E. Gambaran mikroskopis (monosit-antigen yang memproduksi radikal superoksida tanpa dipapar seduhan kopi)



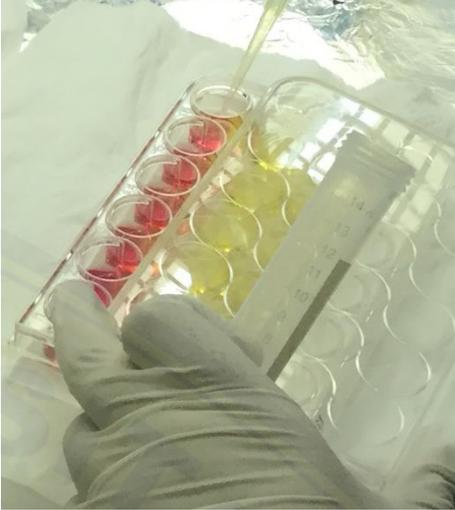
Gambar E.4 Gambar mikroskopis monosit yang dipapar antigen bakteri tanpa dipapar seduhan kopi dan dilakukan (Uji Nitro Blue Tetrazolium, NBT) tampak jelas menghasilkan radikal superoksida ditunjukkan oleh terbentuknya formazan (bercak ungu di sekeliling sel).

Keterangan :

- Silde 1 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- Slide 2 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- Potongan perbesaran 400x dari gambar A
- Slide 3 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- Slide 4 pada preparat 4 dengan perbesaran 400x
- Perbesaran 1000x

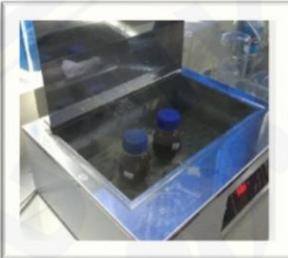
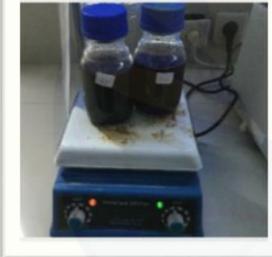
F. Alat dan bahan

<p>A.</p> 	<p>D.</p> 
<p>B.</p> 	<p>E.</p> 
<p>C.</p> 	<p>Keterangan :</p> <ul style="list-style-type: none"> A. Autoclave B. Centrifuge C. Incubator Shaker D. Hotplate Strirrer E. Mikroskop Inverted

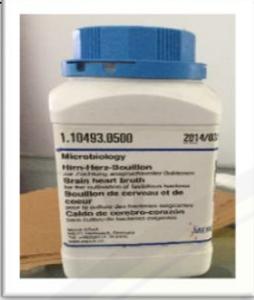
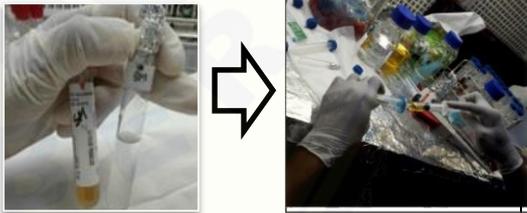
<p>F.</p> 	<p>I.</p> 
<p>G.</p> 	<p>J.</p> 
<p>H.</p> 	<p>Keterangan :</p> <p>F.Tabung Falcon</p> <p>G.Tabung heparin</p> <p>H. <i>Syringe</i></p> <p>I. <i>Microplate cell</i></p> <p>J. <i>Blue tip dan Yellow tip</i></p>

<p>K.</p> 	<p>O.</p> 
<p>L.</p> 	<p>P.</p> 
<p>M.</p> 	<p>Q.</p> 
<p>N.</p> 	<p>Keterangan :</p> <p>K. <i>Lymphoprep</i></p> <p>L. BHIB dan Bakteri <i>s.mutans</i></p> <p>M. Safranin dan Giemsa</p> <p>O. RPMI dan HBSS</p> <p>P. Spektrofotometer</p> <p>Q. <i>Filter syringe</i></p>

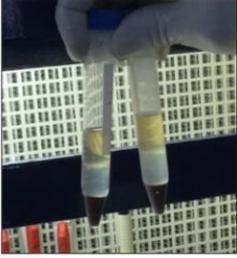
G. Prosedur pembuatan seduhan kopi

	Perbandingan antara 3 gr dan 6 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquadest
	Panaskan dalam waterbath
	<i>Hotplate stirrer</i> dengan kecepatan 60 rpm selama 1 menit
	Diamkan pada suhu ruang selama 3-4 menit

H. Prosedur pembuatan antigen *streptococcus mutans*

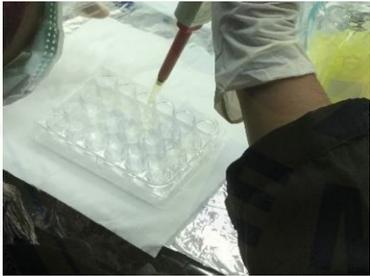
<p>A.</p>  <p>BHI-B sebanyak 3,7gr + aquades 100 ml dimasukkan dalam <i>erlenmayer</i></p>	<p>D.</p> 
<p>B.</p>  <p>Media dipanaskan dalam <i>waterbath</i></p>	<p>E.</p>  <p>tambahkan 3-5 ose koloni bakteri</p>
<p>C.</p>  <p>Ambil 2 ml BHIB</p>	<p>F.</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Suspensi bakteri setelah disesuaikan dengan standart 0,5 Mc. Farland • Filter syringe

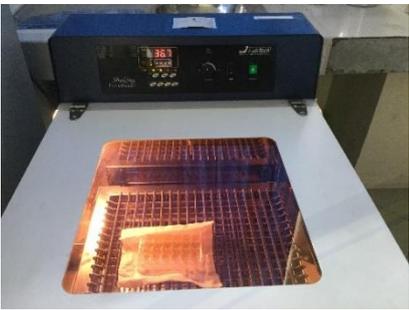
I. Prosedur Isolasi monosit

<p>a.</p>  <p>6 ml darah vena masukkan pada dua tabung heparin</p>	<p>e.</p>  <p>Terbentuk 4 lapisan (Plasma, Mononuclear, <i>Lymphoprep</i>, Polymorfonuclear eritrosit)</p>
<p>b.</p>  <p>Tambahkan RPMI dengan perbandingan 1 : 1</p>	<p>f.</p>  <p>Ambil lapisan kedua (mononuclear) dan pindahkan pada tabung yg berisi RPMI</p>
<p>c.</p>  <p>3 ml larutan <i>Lymphoprep</i> + diluent darah</p>	<p>g.</p>  <p>Centrifuge dengan kecepatan 900 g selama 3 menit</p>

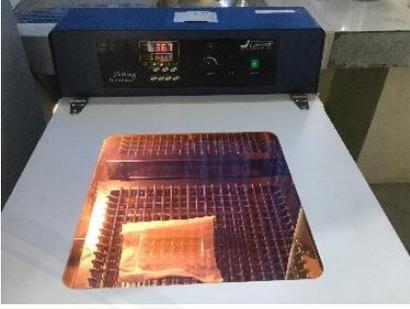
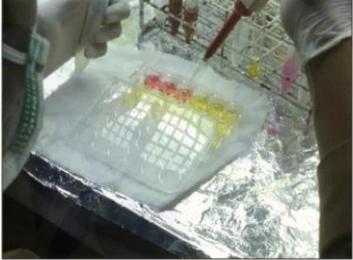
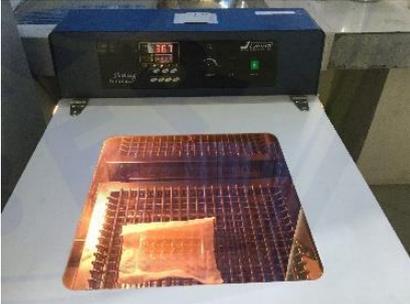
<p>d.</p>  <p>Centrifuge dengan kecepatan 800g selama 20 menit</p>	<p>h.</p>  <p>Tambahkan 1 ml RPMI dan homogenkan</p>
---	--

J. Prosedur penempelan sel

<p>a.</p>  <p>Masukkan cover slip pada masing-masing well plate</p>	<p>c.</p>  <p>Inkubasi dalam inkubator 37⁰C selama 10 menit</p>
<p>b.</p>  <p>Masukkan suspensi sel sebanyak 100 μl</p>	<p>d.</p>  <p>Tambahkan 1 ml RPMI</p>

<p>e.</p>  <p>Inkubasi 20-30 menit pada suhu 37⁰C</p>	<p>g.</p>  <p>Sel yang siap diberi perlakuan ditambahkan RPMI</p>
<p>f.</p>  <p>Cuci menggunakan RPMI sebanyak</p>	<p>h.</p>  <p>Ganti media kultur menggunakan M 199</p>

J. Prosedur Perlakuan

<p>a.</p>  <p>Diamkan monosit selama 15 menit supaya monosit dalam keadaan <i>resting</i></p>	<p>d.</p>  <p>Inkubasi dalam <i>incubator shaker</i> pada suhu 37°C</p>
<p>b.</p>  <p>Kemudian ditambahkan 100 µl seduhan kelompok kopi 1</p>	<p>e.</p>  <p>Lakukan pemaparan dengan antigen bakteri <i>Streptococcus mutans</i> sebanyak 100 µl dan pemaparan 250 µl NBT</p>
<p>c.</p>  <p>Kemudian ditambahkan 100 µl seduhan kelompok kopi 2</p>	<p>f.</p>  <p>Inkubasi dalam <i>incubator shaker</i> pada suhu 37°C</p>