



**POTENSI SEDUHAN KOPI ROBUSTA DENGAN ADITIF
TERHADAP VIABILITAS SEL MONOSIT
YANG DIPAPAR *Bacillus cereus***

SKRIPSI

Oleh :

Yulintan Maulidar

NIM 142210101109

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**POTENSI SEDUHAN KOPI ROBUSTA DENGAN ADITIF
TERHADAP VIABILITAS SEL MONOSIT
YANG DIPAPAR *Bacillus cereus***

SKRIPSI

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

Oleh :

Yulintan Maulidar

NIM 142210101109

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT yang selalu memberikan petunjuk, rahmat, hidayah, tuntunan, dan kemudahan;
2. Orang tua penulis yang terkasih, Mama Anita Trikenyo Wulan Juni dan Papa Abu Bakar Sidik yang senantiasa memberikan doa, dukungan moril dan jerih payah yang telah dilakukan demi kebahagiaan penulis;
3. Kakak penulis Kardita Puspa Monitasari dan Adik penulis Ismail Madhani, yang selalu member dukungan dan doa kepada penulis
4. Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt dan Ibu drg. Tantin Ermawati, M.Kes yang telah berkenan membimbing penulis dan memberi masukan teramat penting hingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik
5. Bapak dan Ibu Guru sejak mengenyam di bangku TK Dhoho Kediri, SDN Banjaran IV Kediri, SMPN 1 Kediri hingga di bangku SMAN 2 Kediri serta seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah begitu berjasa member ilmu
6. Teman-teman angkatan 2014 PHARMAGEN yang telah memberikan semangat, pengalaman, dan bantuan selama masa perkuliahan
7. Almamater tercinta, Fakultas Farmasi Universitas Jember

MOTTO

“Karena sebaik-baiknya ilmu adalah yang diamankan,
sebaik-baiknya harta adalah yang disedekahkan, dan sebaik-baiknya manusia
adalah yang menebar manfaat bagi sesama”

(HR. Bukhori dan Muslim)

“...Sesungguhnya jika kamu bersyukur,
nicaya Aku akan menambah (nikmat) kepadamu,
tetapi jika kamu mengingkari (nikmat-Ku), maka azab-Ku sangat berat”

(Q.S Ibrahim;7) ¹

¹ Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. Syaamil Al-Quran Terjemahan Per-Kata. Bandung. CV Haekal Media Centre.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yulintan Maulidar

NIM : 142210101109

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Potensi Seduhan Kopi Robusta dengan Aditif Terhadap Viabilitas Sel Monosit yang Dipapar *Bacillus cereus*” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karja jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 20 Juli 2018

Yang menyatakan,



Yulintan Maulidar

NIM. 142210101109

SKRIPSI

POTENSI SEDUHAN KOPI ROBUSTA DENGAN ADITIF

TERHADAP VIABILITAS SEL MONOSIT

YANG DIPAPAR *Bacillus cereus*

Oleh :

Yulintan Maulidar

NIM. 142210101109

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi Seduhan Kopi Robusta dengan Aditif Terhadap Viabilitas Sel Monosit yang Dipapar *Bacillus cereus*” karya Yulintan Maulidar telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Jumat, 20 Juli 2018

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,



Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt.
NIP. 198304282008122004



drg. Tantin Ermawati, M.Kes.
NIP. 198003222008122003

Tim Penguji

Dosen Penguji 1,

Dosen Penguji 2,



Fransiska Maria C, S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP. 198404062009122008



Diana Holidah, S.F., M.Farm., Apt.
NIP. 197812212005012002

Mengesahkan

Dekan, Fakultas Farmasi Universitas Jember,



Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt.

NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

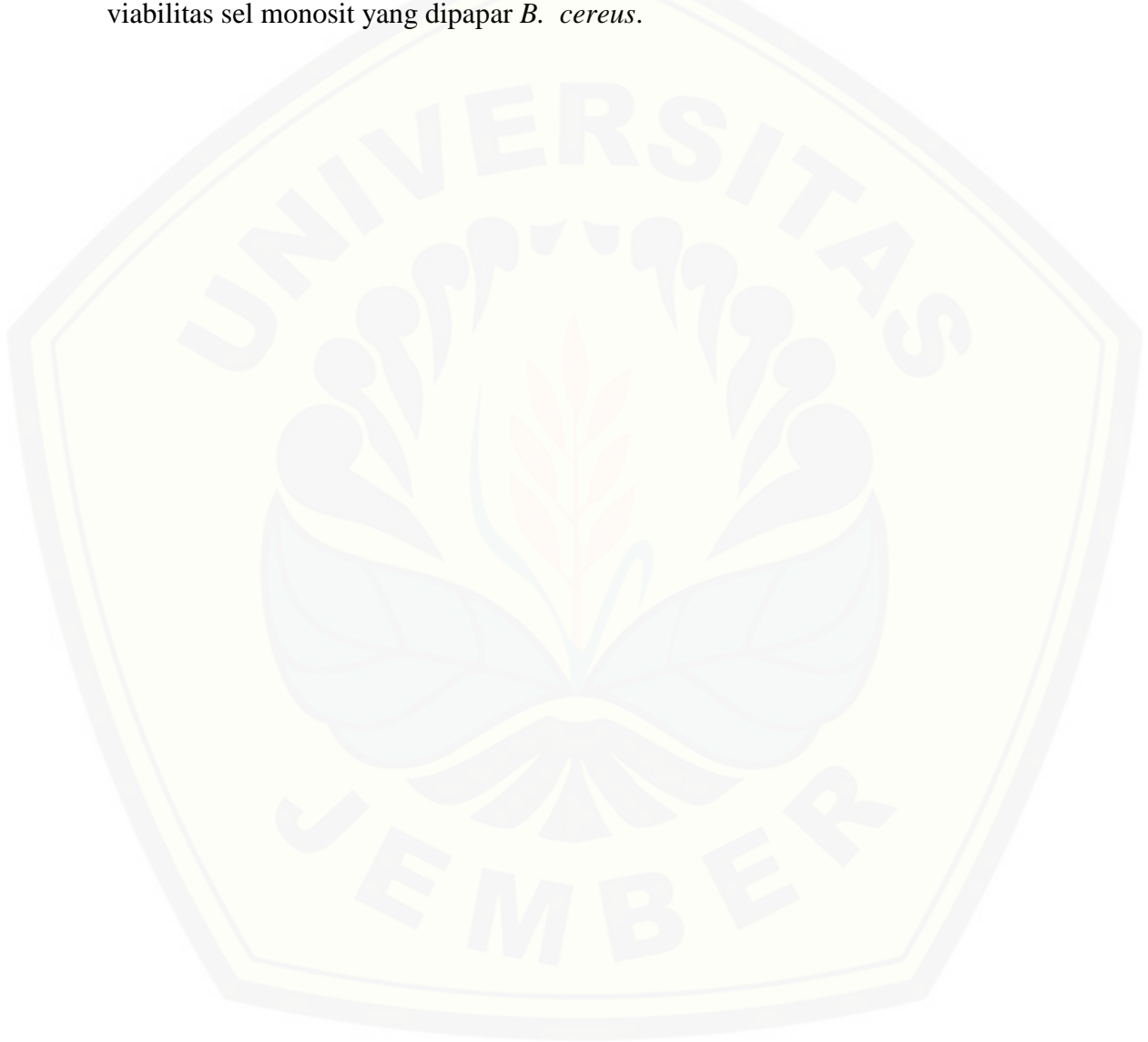
Potensi Seduhan Kopi Robusta dengan Aditif Terhadap Viabilitas Sel Monosit yang Dipapar *Bacillus cereus*; Yulintan Maulidar, 142210101109; 2018; 85 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Viabilitas sel adalah kemampuan untuk mempertahankan hidup dari paparan zat asing atau mikroorganisme patogen agar sel tersebut mampu menjalankan fungsinya dengan baik. Semakin lama sel terpapar oleh zat asing atau mikroorganisme patogen, maka akan menyebabkan penurunan integritas membran sel dan mengakibatkan sel monosit kehilangan fungsinya bahkan hingga terjadi lisis. Menurunnya viabilitas sel dapat dirusak akibat adanya paparan dari zat asing atau mikroorganisme patogen seperti bakteri yang merusak lipid membran hingga menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel. *Bacillus cereus* merupakan bakteri yang dikenal dengan sebutan organisme penyebab kejadian kasus keracunan pada makanan. Faktor dari *Bacillus cereus* yang diketahui mampu memicu lisis pada sel adalah *haemolysins II*.

Minuman kopi memiliki sumber kandungan polifenol terbesar dibandingkan dengan sumber dari minuman lain yang sering dikonsumsi sehari-hari seperti minuman teh dan coklat. Kandungan polifenol yang terdapat pada 200 ml cangkir seduhan kopi robusta mengandung 70-350 mg asam klorogenat. Asam klorogenat melindungi membran sel dengan berikatan pada gugus polar membran fosfolipid. Sehingga membran sel memiliki struktur yang lebih rapat (*rigid*) dan mampu mempertahankan integritas membran sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi seduhan kopi robusta dengan aditif terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus*.

Isolasi sel monosit dilakukan dengan metode konvensional *gradient density centrifugation* menggunakan media pemisah (*Monocyte Separation Medium*) seperti *Lympophrep*TM. Selanjutnya isolat sel monosit diinkubasi dengan bahan uji yaitu kopi robusta, gula; kopi robusta, gula, krimer dan kopi robusta, gula, susu. Inkubasi *B. cereus* dilakukan selama 2 jam dan dilakukan uji viabilitas. Uji viabilitas dilakukan dengan pewarnaan menggunakan *trypan blue* kemudian perhitungan sel dilakukan secara manual dibawah mikroskop *inverted*. Sel hidup tampak tak berwarna sedangkan sel mati akan tampak berwarna biru akibat *trypan blue* yang mampu melewati celah sel yang rusak. Perhitungan % viabilitas sel adalah dengan membagi antara sel yang tidak terwarnai dengan total sel seluruhnya dan dikalikan 100. Data yang didapatkan kemudian diolah menggunakan program SPSS dengan melakukan uji normalitas (*Saphiro Wilk*) dan uji homogenitas (*Levene*). Data yang diperoleh normal dan homogen, sehingga dilanjutkan uji statistik parametrik *one way anova* dan uji LSD.

Nilai rata-rata % viabilitas sel monosit pada seduhan kopi robusta, gula; seduhan kopi robusta,gula,krimer dan seduhan kopi robusta,gula,susu berturut-turut adalah 66,65%; 37,74%; 25,92%. Analisis statistik parametrik *one way anova* dan uji LSD menunjukkan nilai signifikansi $< 0,05$, sehingga data antar kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan. Keseluruhan hasil menunjukkan bahwa seduhan kopi robusta dengan aditif memiliki potensi dalam meningkatkan nilai viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus*.



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Seduhan Kopi Robusta dengan Aditif Terhadap Viabilitas Sel Monosit yang Dipapar *Bacillus cereus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember .

Penyusunan dan penyelesaian skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan ucapan terima kasih kepada :

1. Allah SWT yang telah selalu memberikan karunia dan keajaiban-Nya sehingga kami dapat menyusun dan menyelesaikan tulisan ini.
2. Mama Anita Trikenyo Wulan Juni dan Papa Abu Bakar Sidik yang senantiasa memberikan doa, dukungan moril dan jerih payah yang telah dilakukan demi kebahagiaan penulis.
3. Kakak penulis Kardita Puspa Monitasari dan Adik penulis Ismail Madhani, yang selalu member dukungan dan doa kepada penulis.
4. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember.
5. Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt dan Ibu drg. Tantin Ermawati, M.Kes yang telah berkenan membimbing penulis dan memberi masukan serta waktu, pikiran dan perhatian kepada penulis selama proses penyusunan skripsi ini hingga akhir.
6. Ibu Fransiska Maria C, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji I dan Diana Holiday, SF., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun untuk kemajuan skripsi ini.
7. Bapak Dian Agung P, S.Farm., M.Farm., Apt dan Ibu Lidya Ameliana, S.Si., M.Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan

arahan, bimbingan, dan dukungan kepada penulis selama menempuh perkuliahan.

8. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi dan berbagai ilmu serta pengalaman selama perkuliahan, juga staf dan karyawan atas segala bantuan yang telah diberikan selama saya menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember.
9. Mas Erwan, Mbak Ning, Mbak Azizah, Mbak Dinik, Mbak Indri, Mbak Parka dan Bu Widi yang telah membantu penulis saat melakukan penelitian di laboratorium.
10. Rekan kerja seperjuangan Sel Monosit di berbagai laboratorium, Catur Nindita yang telah bekerja keras bersama dalam penelitian ini dan menjadi tim terbaik, terima kasih atas pengalaman, kebahagiaan, semangat, dan dukungan yang selalu diberikan.
11. Rekan diskusi seperjuangan skripsi, Sarah Faradillah dan Ratih Dhiyah yang selalu meluangkan waktunya untuk berdiskusi, berbagi cerita dan memberikan dukungan.
12. Sahabat IAI Kota Kediri (Ratih, Ary, Rafli) yang selalu menjadi penyemangat dan tempat berbagi cerita dan bantuan.
13. Sahabat GETEWE (Sarah, Poppy, Ratih, Yashinta, Hesti, Idofia) yang selalu memberikan semangat dan dukungan.
14. Sahabat GENGOWES (Ninis, Dhifa, Ratri, Ayub, Haris) yang selalu member semangat dan dukungan kepada penulis.
15. Sahabat perjuangan perantauan (Dea, Rara, Lusi, Dita) yang telah bersama-sama merantau dari kota Kediri ke Jember dan memberi bantuan selama ini.
16. Sahabatku Ratih, Alfita, Laili, Lisa, Tata, Sheila, Mace, Sarah, Disti, Vivi, Putu, Usi, Ket, Mia, atas semangat dan doa yang diberikan kepada penulis serta seluruh keceriaan selama perkuliahan
17. Keluarga PHARMAGEN, terimakasih atas semangat, kebersamaan, dan pengalaman dalam bekerja sama yang dilakukan selama perkuliahan

18. Keluarga YUDYA RESIDENCE, Farda, Rini, Fara, Cani, Okta, Azha, Amel, Tiara, Finola, Leilani, Nia, Nanda, Mbak Siska, Ibu Kantin kos, Mbak Ima yang telah memberikan keluarga baru selama penulis berada di Jember.
19. Keluarga besar UKM KARISMA, UKM Fassenden, dan FORISMA yang telah memberikan pengalaman non akademis, bekerja sama sebagai tim dan kebersamaan selama menjalankan program kerja di masa perkuliahan
20. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu

Hanya ucapan terima kasih dan doa yang dapat penulis sampaikan atas segala kebaikan tiada henti dan dukungan yang telah diberikan. Semoga segala kebaikan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan baik dari Allah dan semoga skripsi ini bermanfaat bagi pembaca dan dapat digunakan untuk menyempurnakan karya-karya selanjutnya.

Jember, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
1.1 Monosit dan Viabilitas	6
1.1.1 Deskripsi Sel Monosit	6
1.1.2 Struktur dan Fungsi Membran Sel	6
1.1.3 Fungsi Sel Monosit	8
1.1.4 Viabilitas Sel Monosit.....	10

1.2 Tinjauan Umum Kopi Robusta dan Aditif	10
1.2.1 Deskripsi Kopi Robusta	10
1.2.2 Klasifikasi Kopi Robusta	11
1.2.3 Morfologi Tanaman Kopi Robusta	12
1.2.4 Fitokimia	12
1.2.5 Aditif pada Seduhan Kopi	14
1.3 <i>Bacillus cereus</i>	18
1.3.1 Deskripsi <i>B.cereus</i>	18
1.3.2 Taksonomi <i>B.cereus</i>	19
1.3.3 Patogenesis <i>B.cereus</i>	19
1.4 Uji Viabilitas Sel Monosit.....	21
1.4.1 Isolasi Sel Monosit.....	21
1.4.2 Perhitungan Viabilitas Sel Monosit	24
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Jenis Penelitian	26
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	26
3.3 Variabel Penelitian.....	26
3.3.1 Variabel bebas	26
3.3.2 Variabel terikat.....	26
3.3.3 Variabel terkendali	26
3.4 Definisi Operasional.....	27
3.5 Sampel Penelitian	27
3.5.1 Kriteria sampel	27
3.5.2 Kelompok sampel.....	27
3.6 Skema Prosedur Penelitian	28

3.7 Alat dan Bahan.....	29
3.8 Prosedur Penelitian.....	29
3.8.1 Sterilisasi alat.....	29
3.8.2 Pembuatan seduhan kopi robusta dengan aditif.....	29
3.8.3 Pengambilan sampel darah.....	30
3.8.4 Pembuatan Bakteri <i>B.cereus</i>	30
3.8.5 Pembuatan RPMI dan Medium Complex	31
3.8.6 Isolasi sel monosit (<i>Single Filter</i> /dengan <i>Lymphoprep</i> TM)	31
3.8.7 Inkubasi sel monosit dengan bahan uji	32
3.8.8 Perlakuan Sampel dengan paparan <i>B.cereus</i>	32
3.8.9 Pengecatan <i>Trypan Blue</i> dan Perhitungan Viabilitas Sel Monosit ..	33
3.9 Analisis Data.....	33
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Bahan Uji.....	36
4.2 Isolasi Sel Monosit.....	36
4.3 Uji Viabilitas.....	37
4.4 Analisis Data.....	42
BAB 5. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	54

DAFTAR TABEL

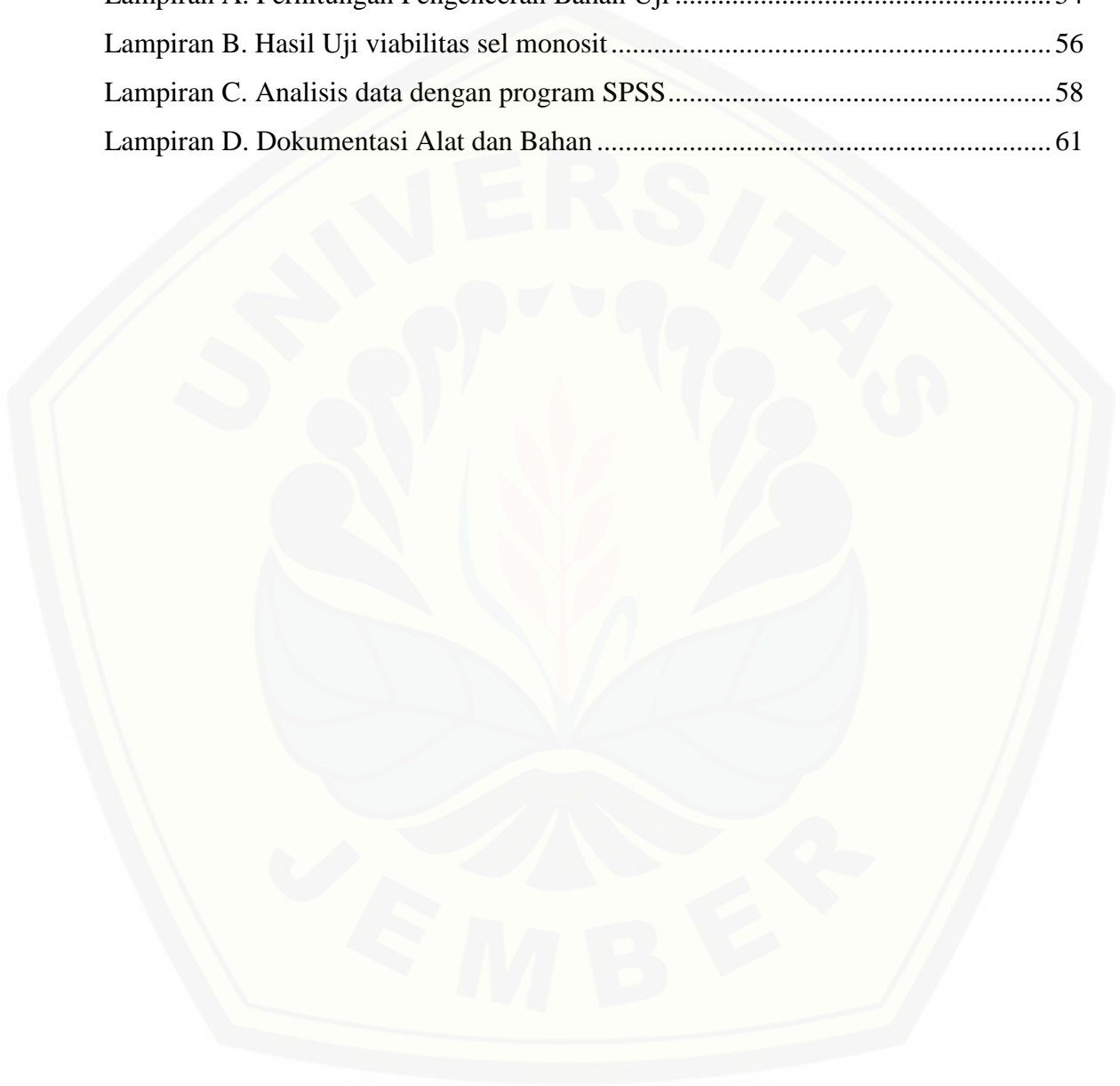
	Halaman
Tabel 2.1 Sentra Produksi Kopi Robusta di Jawa Timur	11
Tabel 2.2 Komposisi kimia pada biji kopi arabika dan robusta sebelum dan sesudah di sangrai (% bobot kering).....	13
Tabel 2.3 Karakteristik dua tipe penyakit yang disebabkan oleh <i>Bacillus cereus</i>	20
Tabel 2.4 Rentang berat jenis dan berat jenis media dari sel darah manusia dan elemen darah lainnya.....	23

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1 Sel Monosit	6
Gambar 1.2 Komponen Penyusun Fosfolipid	7
Gambar 1.3 Struktur Kimia Fosfolipid	8
Gambar 1.4 Bubuk Kopi Robusta	12
Gambar 1.5 Spora <i>Bacillus</i> spp (perbesaran x1000).....	19
Gambar 1.6 Prinsip dari elutriasi sentrifugasi.....	22
Gambar 1.7 Skema pemisahan sel mononuklear dengan <i>media density gradient</i>	22
Gambar 1.8 Sel yang dipapar toksin <i>haemolysins II</i> dari <i>B.cereus</i> ;	25
Gambar 2.1 Skema Prosedur Penelitian.....	28
Gambar 4.1 Sel monosit sebelum diberi perlakuan dengan pewarnaan <i>trypan blue</i> ..	36
Gambar 4.2 Morfologi sel monosit dari hasil isolasi dengan pewarnaan Giemsa	36
Gambar 4.3 Viabilitas sel monosit yang diinkubasi masing-masing kelompok perlakuan dan dipapar <i>B. cereus</i> dengan pewarnaan <i>trypan blue</i>	38
Gambar 4.4 Histogram nilai persen viabilitas sel monosit pada tiap kelompok perlakuan	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Perhitungan Pengenceran Bahan Uji	54
Lampiran B. Hasil Uji viabilitas sel monosit	56
Lampiran C. Analisis data dengan program SPSS	58
Lampiran D. Dokumentasi Alat dan Bahan	61



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sel monosit di dalam darah terlibat proses pertahanan tubuh terhadap adanya antigen asing, baik dengan melakukan fagositosis atau mempertahankan integritas sel. Sel monosit merupakan jenis sel darah putih yang memiliki banyak sitoplasma, bentuk intinya bulat sampai berlekuk atau berbentuk tapal kuda, dan sedikit basofilik (Geo *et al.*, 2007). Sel monosit biasa disebut dengan sel fagosit mononuklear yang memiliki peran penting dalam menjaga sistem kekebalan tubuh, yaitu dengan menelan dan menghancurkan mikroorganisme patogen (Dale *et al.*, 2016). Sel monosit dapat memberikan pertahanan fagositik lebih baik jika dibandingkan dengan sel fagosit lain karena memiliki umur yang lebih panjang (Price, 2007). Selain bertindak sebagai sel fagosit, sel monosit juga memiliki kemampuan viabilitas sel (Geo *et al.*, 2007).

Viabilitas sel adalah kemampuan untuk mempertahankan hidup dari paparan zat asing atau mikroorganisme patogen agar sel tersebut mampu menjalankan fungsinya dengan baik (Gyls, 2009). Viabilitas sel sangat erat hubungannya dengan integritas membran sel. Semakin lama sel terpapar oleh zat asing atau mikroorganisme patogen, maka akan menyebabkan penurunan integritas membran sel tersebut dan mengakibatkan sel monosit kehilangan fungsinya bahkan hingga terjadi lisis. Sel monosit yang lisis tidak dapat meningkatkan respon imun tubuh terhadap zat asing, melainkan dapat menyebabkan kerusakan jaringan jika tidak segera ditangani (Preedy, 2015). Menurunnya viabilitas sel dapat dipengaruhi oleh adanya jumlah radikal bebas yang berlebih dan menyebabkan stress oksidatif serta memicu terjadinya lipid peroksidase, sehingga sel akan kehilangan fungsinya. Selain itu viabilitas sel juga dapat dirusak akibat adanya paparan dari zat asing atau

mikroorganisme patogen seperti bakteri yang merusak lipid membran hingga menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel (Dhaouadi *et al.*, 2011). Dampak negatif tersebut mampu diminimalisir dengan pemberian senyawa yang dapat mempertahankan integritas membran sel monosit. Senyawa dengan aktivitas seperti antioksidan diketahui mampu untuk memberikan efek terhadap viabilitas sel (Kucekova *et al.*, 2013). Selain itu viabilitas sel juga dapat ditingkatkan dengan pemberian senyawa yang dapat secara langsung membantu melindungi membran sel. Senyawa tersebut bekerja dengan melintasi membran sel dan memberi perlindungan langsung karena memiliki struktur yang sama. Dengan adanya hal tersebut, maka membran sel akan memiliki perlindungan tambahan untuk dapat mencegah serangan dari mikroorganisme asing yang akan merusak sel (Budirahardjo, 2009; Delita, 2012).

Pemberian agen yang mengandung beberapa senyawa untuk meningkatkan viabilitas sel monosit mampu dijadikan upaya preventif dalam mencegah timbulnya penyakit hingga kerusakan pada sel (Patay *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2009). Upaya preventif ini sesuai dengan visi, misi serta nawacita dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia untuk meningkatkan kualitas hidup masyarakat di Indonesia dari sudut pandang kesehatan (KEMENKES RI, 2014). Sehingga sebelum melakukan pengobatan terhadap beberapa penyakit yang timbul, masyarakat mampu untuk mencegah beberapa penyakit melalui pendekatan langsung pada kebiasaan masyarakat di Indonesia. Kebiasaan dalam mengkonsumsi kopi sudah ada sejak jaman nenek moyang dan meluas hingga seluruh dunia termasuk Indonesia (Pertanian, 2016a). Saat ini, kebiasaan tersebut semakin meluas karena adanya peningkatan perilaku konsumtif masyarakat Indonesia dengan menambahkan beberapa aditif didalamnya. Hal itu dapat diketahui dengan sudah banyak beredarnya produk-produk kopi instan berisi aditif seperti gula dan susu dalam komposisinya.

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa pada biji kopi memiliki kandungan senyawa fenolik seperti polifenol dan asam klorogenat yang tinggi serta kandungan alkaloid cukup banyak seperti kafein (Yashin *et al.*, 2013; Patay & Bencsik, 2016).

Penelitian lain menyebutkan bahwa minuman kopi robusta murni maupun minuman kopi robusta dengan penambahan aditif diketahui memiliki nilai kadar polifenol yang bermakna (Putri, 2017). Senyawa polifenol dan turunannya pada seduhan kopi robusta tersebut memiliki fungsi potensial yang bermanfaat bagi tubuh, seperti aktivitas antioksidan (Nikolina M, 2005; Putri, 2017). Senyawa polifenol pada kopi akan melindungi membran sel dengan menghambat terjadinya reaksi oksidasi pada lipid membran yang dapat memicu terjadinya lipid peroksidase. Selanjutnya membran sel akan dapat mempertahankan integritasnya serta mencegah percepatan kerusakan pada sel (Oteiza *et al.*, 2005). Selain itu, menurut Pruchnik *et al.*, (2014), asam klorogenat mampu melindungi membran sel dengan berikatan pada gugus polar membran fosfolipid. Sehingga membran sel memiliki struktur yang lebih rapat (*rigid*) dan mampu mempertahankan integritas membran sel. Hal tersebut yang menyebabkan sel monosit akan dapat menjalankan fungsi imunitasnya dengan baik karena memiliki integritas membran yang baik dan mampu untuk menjaga viabilitas sel ketika ada serangan dari mikroorganisme asing.

Berdasarkan penjelasan di atas penulis tertarik untuk meneliti viabilitas sel monosit setelah diberi seduhan kopi robusta dengan aditif dan dipapar *Bacillus cereus* yang bertindak sebagai zat asing untuk memicu kerusakan sel. *B.cereus* dipilih sebagai zat asing untuk memicu kerusakan sel karena kemampuannya dalam mengeluarkan toksin pemicu kerusakan hingga kematian sel, yaitu *haemolysins II*. Aditif yang ditambahkan pada kopi robusta dalam penelitian kali ini didasarkan pada penelitian sebelumnya oleh Putri (2017), yaitu gula, krim, dan susu.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah potensi pemberian seduhan kopi robusta dengan aditif dapat meningkatkan viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus*?
2. Bagaimana viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus* dengan pemberian seduhan kopi robusta dengan aditif?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui potensi seduhan kopi robusta dengan aditif terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus*
2. Mengetahui efektifitas perbandingan potensi seduhan kopi robusta dengan aditif terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus*

1.4 Manfaat Penelitian

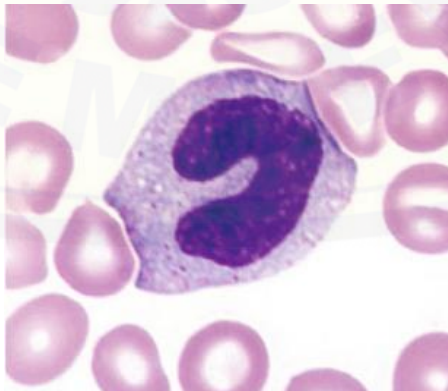
1. Memberikan informasi kepada masyarakat bahwa seduhan kopi robusta dengan aditif bermanfaat dalam proses pertahanan tubuh terhadap mikroorganisme patogen.
2. Sebagai pertimbangan dalam bidang kefarmasian mengenai upaya pencegahan terhadap penyakit menggunakan seduhan kopi robusta yang memiliki efek viabilitas sel untuk pertahanan tubuh terhadap mikroorganisme patogen.
3. Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai pertimbangan bagi penelitian selanjutnya yang berkaitan dengan sistem pertahanan tubuh atau potensi immunomodulator pada manusia, yaitu kemampuan sel untuk dapat bertahan terhadap serangan dari mikroorganisme patogen.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Monosit dan Viabilitas

1.1.1 Deskripsi Sel Monosit

Sel monosit merupakan sel darah putih yang diproduksi oleh sumsum tulang belakang dan beredar dalam darah keseluruh tubuh. Jumlah sel monosit berkisar antara 2-8% dari total leukosit normal dalam darah. Sel monosit memiliki ukuran yang bermacam-macam dengan diameter sel 9-10 μm dan pada sel monosit yang telah dewasa mampu mencapai ukuran 12-18 μm . Sel monosit biasanya mudah dikenali dalam darah karena ukurannya yang relatif besar. Sel monosit memiliki bentuk yang berbeda dari granulosit karena susunan morfologi inti dan sifat sitoplasmanya yang relatif agranular. Inti monosit terletak eksentris dalam sel dan memiliki lekukan yang berbentuk seperti tapal kuda serta sedikit basofilik. Inti sel berbentuk oval atau berlekuk dengan kromatin bergerombol di tengah. Sitoplasma sel monosit berlimpah dengan warna biru pucat dan terdapat banyak vakuola halus. Sitoplasma tampak seperti jala-jala yang mengandung sejumlah granula azurofil. Sel monosit akan beredar dalam darah selama 10-20 jam dengan menembus dinding kapiler sebelum akhirnya akan masuk ke jaringan (Turgeon, 2005; Dale, Boxer, & Liles, 2016).



Gambar 1.1 Sel Monosit (Rodak & Carr, 2013)

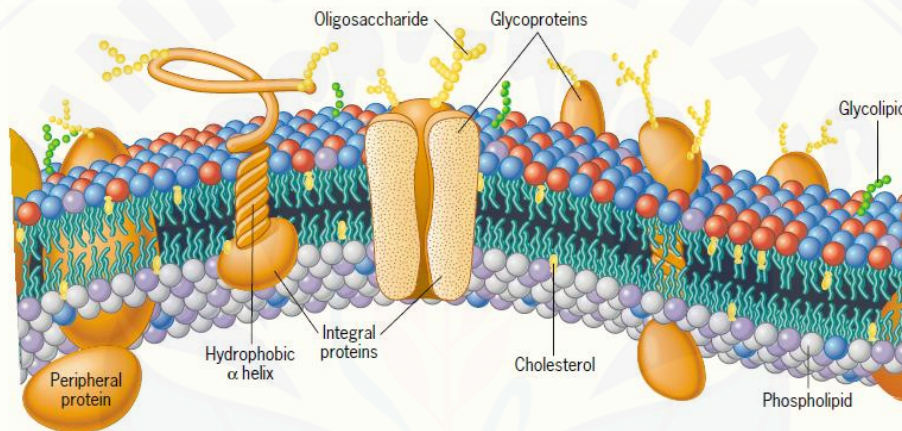
Dalam menjalankan fungsinya, sel monosit akan berpindah dari peredaran darah menuju ke jaringan. Sel monosit yang telah berada didalam jaringan akan membengkak dan ukurannya membesar untuk menjadi sel makrofag (Bain, 2017).

1.1.2 Struktur dan Fungsi Membran Sel

Membran sel atau membran plasma merupakan bagian terluar sel yang bekerja untuk melindungi inti sel dari lingkungan luar yang bersifat mengganggu fungsi sel hingga merusak sel. Sel dipisahkan dari lingkungan luar oleh struktur yang tipis dan rapuh dengan lebar sekitar 5-10 nm, namun cukup mampu untuk menjaga sel dari gangguan kecil yang berasal dari luar sel dengan gerakannya yang fleksibel. Selain sebagai pelindung dan pembatas terluar dari sel, membran sel juga berfungsi untuk mendukung aktivitas biokimia yang terjadi dengan sifat selektif permeabel yang dimiliki membran sel. Selektif permeabel berarti sel mampu memilih zat atau komponen kimia yang dapat memasuki atau keluar sel selama hal tersebut tidak bersifat berbahaya dan merusak. Fungsi lain membran sel adalah memberi respon terhadap rangsangan seperti transduksi sinyal, reseptor, ligan untuk dapat saling berkomunikasi dan memperantai interaksi antar sel dalam organisme multiseluler. Membran plasma berisi cairan yang berfungsi seperti mesin untuk mengangkut atau memindahkan zat berupa fisik dari satu membran ke membran lainnya. Hal tersebut dilakukan untuk memicu metabolisme dan membangun makromolekulnya. Membran plasma juga mampu mengangkut ion tertentu, sehingga membentuk gradien ionik di atasnya. Fungsi lain dari membran plasma adalah terlibat dalam proses perubahan energi ke bentuk yang lain (transduksi energi). Transduksi energi ini merupakan proses paling mendasar dalam transfer energi kimia dari karbohidrat dan lemak menjadi ATP (Gerald, 2009)

Berdasarkan strukturnya, membran sel merupakan struktur yang kompleks dan tersusun atas lipid, protein, dan karbohidrat. Dalam membran plasma terdapat lebih dari 100 protein yang berbeda seperti enzim, protein transpor, protein struktural,

antigen, dan reseptor. Protein pada membran sel berfungsi membantu pengangkutan molekul-molekul yang melewati membran sel. Pada bagian sisi eksternal protein membran terdapat cincin oligosakarida (karbohidrat) yang menempel pada bagian tersebut. Komponen terbesar dari lipid membran adalah fosfolipid, glikosfingolipid, dan kolesterol. Glikosfingolipid terdapat didalam membran plasma yang termasuk serebrosida dan gangliosida. Sedangkan kolesterol juga terdapat pada membran sel dan berperan dalam penentuan tingkat fluiditas membran (Wolf & Murray, 1981; Gerald, 2009)

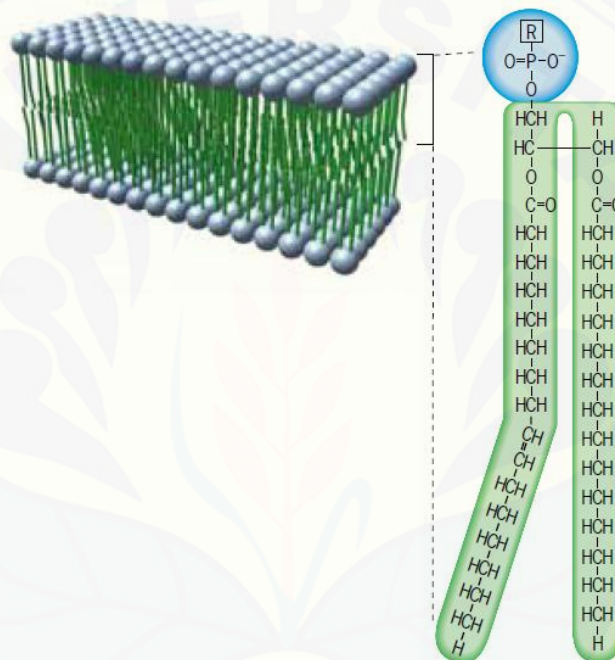


Gambar 1.2 Komponen Penyusun Fosfolipid (Gerald, 2009)

Fosfolipid merupakan molekul amfifatik yang terdiri dari 2 rantai yang berbeda, yaitu asam lemak hidrofobik (non polar) berada pada gugus bagian ekor dan gugus bagian kepala hidrofilik (polar) mengandung fosfat. Lipid membran termasuk bilayer kontinu, yang mana bagian hidrofobik dari fosfolipid terlindungi dari lingkungan bersifat polar sedangkan bagian hidrofilik dari fosfolipid akan berhadapan langsung dengan lingkungan bersifat polar. Fosfolipid ini jumlahnya yang paling melimpah dalam struktur membran sel, karena fosfolipid merupakan batas terluar membran sel yang berbatasan langsung dengan lingkungan luar sel (Gerald, 2009; Watson & De Meester, 2016).

Sebagian besar fosfolipid terdiri dari asam lemak yang terikat pada bagian polar membran sel. Berdasarkan ikatan antar atom karbon yang bersifat kovalen, asam lemak terbagi atas rantai karbon tunggal (asam lemak jenuh) dan rantai karbon

ganda (asam lemak tak jenuh). Jumlah ikatan asam lemak tak jenuh dalam satu molekul dapat berkisar antara satu hingga enam ikatan ganda. Sehingga dalam pengelompokannya, asam lemak tak jenuh terbagi menjadi asam lemak tak jenuh dengan hanya satu ikatan ganda (*Monounsaturated Fatty Acid/MUFA*) dan asam lemak tak jenuh dengan ikatan ganda lebih dari satu (*Polyunsaturated Fatty Acid/PUFA*) (Gerald, 2009; Watson & De Meester, 2016).



Gambar 1.3 Struktur Kimia Fosfolipid (Gerald, 2009)

Selain itu, pada membran sel terdapat pula protein membran yang menempel pada lipid bilayer. Protein membran memiliki bentuk yang beragam dengan sifat yang berbeda-beda, seperti contoh adalah struktur α -helix. Struktur tersebut memiliki permukaan yang bersifat hidrofobik dan memiliki banyak asam amino. Protein membran memiliki fungsi sebagai tranpor ion dan senyawa kimia yang melewati membran, selain itu juga sebagai stabilitator membran sel (Gerald, 2009).

1.1.3 Fungsi Sel Monosit

Mekanisme imunitas non spesifik memiliki sifat yang selalu siap dan respon yang cepat jika terdapat zat asing atau mikroorganisme patogen pada individu sehat.

Sistem imun ini bertindak sebagai lini pertama ketika ada invasi dari mikroorganisme patogen tanpa harus ada pemejanaan sebelumnya. Sistem imun ini bersifat non spesifik artinya tidak perlu pengenalan terhadap patogen atau mikroba tertentu karena telah ada dan berfungsi sejak lahir. Salah satu contoh sistem imun non spesifik adalah sel monosit (Broderick, 2015).

Monosit merupakan sel fagosit mononuklear yang berperan penting dalam sistem pertahanan tubuh. Fagosit mononuklear memiliki 3 fungsi penting, yaitu sebagai *antigen presenting cell*, immunomodulasi dan proses fagositosis. Fagositosis merupakan mekanisme pertahanan tubuh yang melibatkan sel-sel fagosit dengan mencerna hingga menghancurkan mikroorganisme patogen (Dale *et al.*, 2016). Untuk mencerna dan menghancurkan mikroorganisme patogen, sel fagosit memperluas bagian membran plasma kemudian membungkus membran di sekeliling partikel hingga terbungkus. Selanjutnya ketika berada dalam sel, patogen yang menginvasi disimpan didalam endosom dan bersatu dengan lisosom. Lisosom tersebut kemudian akan membunuh dan mencerna partikel dengan berbagai enzim dan asam yang terlibat dalam proses fagositosis (Gordon, 2016). Sel fagosit terdiri dari 2 macam, yaitu sel fagosit polimorfonuklear (neutrofil, eosinofil, dan sel mast) dan sel fagosit mononuklear. Contoh sel fagosit mononuklear adalah sel monosit yang berada dalam darah dan jika sel monosit bermigrasi ke jaringan akan menjadi makrofag. Proses fagositosis oleh fagosit mononuklear yang mencerna beberapa material memiliki tujuan untuk mengeliminasi kotoran dan membunuh mikroorganisme patogen yang menyerang. Monosit mampu membuang sel darah merah yang tidak berfungsi atau tua serta membuang inklusi sel darah merah di limpa. Selain itu, monosit dapat membersihkan sisa-sisa komponen di tempat infeksi atau jaringan yang rusak. (Flannagan *et al.*, 2012).

1.1.4 Viabilitas Sel Monosit

Viabilitas sel berasal dari kata *viable* yang artinya hidup dan sel yang berarti kumpulan materi sederhana penyusun semua makhluk hidup. Viabilitas menurut Kamus Kedokteran berarti kemampuan untuk dapat bertahan hidup. Sedangkan menurut Kamus Besar Bahasa Indonesia, viabilitas artinya kemungkinan untuk dapat hidup. Dalam literatur lain disebutkan, viabilitas sel adalah kemampuan untuk mempertahankan hidup dari paparan zat asing atau mikroorganisme patogen lalu memulihkan kondisinya kembali untuk keberlangsungan hidup sel tersebut (Gyls, 2009).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh (Delita, 2012), viabilitas sel monosit mampu diketahui dengan menggunakan pewarnaan spesifik. Pewarnaan dengan *trypan blue* dapat memberikan warna tertentu oleh sel yang tidak utuh. Sehingga dapat diketahui bahwa viabilitas sel bergantung pada keutuhan sel tersebut. Sel-sel yang masih memiliki integritas atau keutuhan membran yang baik maka akan terlihat jernih bagian sitoplasmanya, sedangkan sitoplasma pada sel yang tidak utuh akan tampak berwarna karena menyerap pewarnaan dengan *trypan blue*. Pada penelitian lain juga disebutkan jika viabilitas sel monosit berhubungan dengan integritas atau keutuhan sel, hal tersebut dapat diketahui melalui pewarnaan spesifik menggunakan *trypan blue* (Budirahardjo, 2009; Alburuda, 2013).

1.2 Tinjauan Umum Kopi Robusta dan Aditif

1.2.1 Deskripsi Kopi Robusta

Di Indonesia, kopi dibudidayakan sebagian besar oleh perkebunan rakyat dimana jenis kopi yang banyak dibudidayakan adalah jenis kopi robusta. Indonesia hingga pada tahun 2015 tercatat sebagai Negara eksportir kopi terbesar kedua di kawasan ASEAN. Sentra produksi kopi robusta di Indonesia terdapat di Provinsi Sumatera Selatan, Lampung, Bengkulu, Sumatera Barat, dan Jawa Timur. Menurut data dari Dinas Pertanian (2014), diketahui sentra di Provinsi Jawa Timur berada di

kabupaten Banyuwangi dengan kontribusi sebesar 13,58% (3.724 ton), kabupaten Bondowoso berkontribusi 10,88% (2.985 ton), dan Kabupaten Jember sebesar 9,23% (2.532 ton). Hal tersebut semakin mendorong masyarakat untuk lebih proaktif dalam mengkonsumsi kopi dengan berbagai kreativitas campuran pada kopi (Pertanian, 2016; Perdagangan, 2013). Tabel persebaran sentra produksi kopi Robusta di Jawa Timur tersaji dalam Tabel 2.1.

Tabel 1.1 Sentra Produksi Kopi Robusta di Jawa Timur, Tahun 2014

No	Kab/Kota	Produksi (ton)	Share (%)	Share Kumulatif (%)
1	Kab. Malang	8.292	30,60	30,60
2	Kab. Banyuwangi	3.724	13,58	44,18
3	Kab. Bondowoso	2.985	10,88	55,06
4	Kab. Lumajang	2.605	9,50	64,56
5	Kab. Jember	2.532	9,23	73,79
	Lainnya	7.188	26,21	100,00
	Jawa Timur	27.427	100,00	

Sumber : Direktorat Jenderal Perkebunan, diolah Pusdatin (Pertanian, 2016)

1.2.2 Klasifikasi Kopi Robusta

Klasifikasi tanaman kopi robusta menurut *Intregated Taxonomic Information System* (ITIS) (2011) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Gentinales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: Coffea L.
Spesies	: <i>Coffea canephora</i> (Kopi Robusta)

1.2.3 Morfologi Tanaman Kopi Robusta

Tanaman kopi sangat berpengaruh terhadap kondisi lingkungan tumbuh, tinggi tempat tumbuh, dan tipe curah hujan. Tanaman kopi termasuk kedalam jenis tanaman perdu atau semak belukar dengan ketinggian 2-4 meter. Tanaman kopi memiliki jenis akar tunggang dengan beberapa akar-akar kecil yang tumbuh kesamping dan akar primer yang mampu tumbuh hingga kedalaman mencapai sekitar 50 cm. Pada akar primer tumbuh akar lateral yang mampu tumbuh ke permukaan hingga mencapai sekitar 3 m. Ukuran daun pada tanaman kopi termasuk ukuran besar dengan lebar daun sempit ujung meruncing, ukuran buah besar bentuk oval, diskus besar menonjol, ruas cabang sedang, dan buah lebat. Pada umumnya, satu buah kopi terdiri dari dua biji kopi yang berbentuk elips atau bulat telur. Biji kopi yang telah dipanen dapat disangrai atau digiling hingga menyerupai serbuk halus yang biasa disebut bubuk kopi (Pertanian, 2016; Panggabean, 2011).



Gambar 1.4 Bubuk Kopi Robusta (Putri, 2017)

1.2.4 Fitokimia

Pada biji kopi robusta terdapat banyak kandungan kimia, diantaranya adalah karbohidrat, senyawa nitrogen (asam amino bebas, kafein, trigonelin), asam lemak bebas, lemak (minyak kopi dan diterpen), mineral, senyawa fenolik dan turunannya (fenol, polifenol, asam klorogenat, asam p-kumarat) (Farah & Donangelo, 2006; Sherma & Waksmundzka-Hajnos, 2011). Masing-masing dari komponen senyawa kimia dalam biji kopi memiliki manfaat dan aktivitas biologi tertentu dalam tubuh. Senyawa kafein pada kopi memiliki rasa pahit yang khas dan merupakan komponen

penghasil aroma khas pada kopi. Kafein pada kopi robusta banyak ditemui pada bagian biji, yaitu sekitar >4%. Senyawa asam klorogenat, trigonelin dan diterpen juga merupakan penghasil aroma yang khas pada kopi. Karbohidrat pada kopi merupakan produk hasil fotosintesis. Ketika muncul buah pada tanaman kopi, karbohidrat diproduksi dalam daun, pericarp, serta akan terakumulasi dalam bentuk sukrosa dalam biji kopi. Lipid pada kopi berfungsi sebagai pembawa rasa kopi. Bagian lipid dalam kopi adalah berupa ester dari asam lemak. Asam lemak pada kopi meliputi asam palmitat, asam linoleat, asam oleat, dan asam stearat dengan jumlah masing-masing senyawa tersebut yang berkisar antara 10-50% (Farah & Donangelo, 2006; Nikolina M, 2005). Senyawa biji kopi robusta dan arabika sesudah disangrai memiliki nilai yang berbeda seperti pada Tabel 2.2.

Tabel 1.2 Komposisi kimia biji kopi arabika dan kopi robusta yang sudah disangrai (% bobot kering)

Komponen	Arabika	Robusta
Kafein	1,3	2,4
Trigonelin	0,3	0,3
Karbohidrat	38	42
Asam klorogenat	2,5	3,8
Lemak	17,0	11,0
Asam amino	7,5	7,5
Asam organik	2,4	2,6
Melanoidin	25,4	25,9
Aroma volatil	0,1	0,1
Ash (mineral)	4,5	4,7

Sumber : (Oestreich-Janzen, 2013)

Polifenol merupakan metabolit sekunder tanaman yang umumnya terlibat dalam proses pertahanan tubuh terhadap radiasi ultraviolet dan agregasi oleh patogen seperti bakteri. Polifenol tersebut memiliki berbagai macam aktivitas biologis yang bermanfaat dalam meningkatkan kemampuan proteksi tubuh terhadap zat asing, seperti aktivitas antioksidan dan antibakteri (Kucekova *et al.*, 2013; Dhaouadi *et al.*, 2011). Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Fukushima *et al.*, (2014), diketahui jika minuman kopi memiliki sumber kandungan polifenol terbesar dibandingkan dengan

sumber dari minuman lain yang sering dikonsumsi sehari-hari seperti minuman teh dan coklat. Kandungan polifenol yang terdapat pada 200 ml cangkir seduhan kopi robusta mengandung 70-350 mg asam klorogenat (Clifford, 1999). Senyawa polifenol pada kopi akan melindungi membran sel dengan menghambat terjadinya reaksi oksidasi pada lipid membran yang dapat memicu terjadinya lipid peroksidase. Selanjutnya membran sel akan dapat mempertahankan integritasnya serta mencegah percepatan kerusakan pada sel (Oteiza *et al.*, 2005). Selain itu, menurut Pruchnik *et al.*, (2014), asam klorogenat mampu melindungi membran sel dengan berikatan pada gugus polar membran fosfolipid. Sehingga membran sel memiliki struktur yang lebih rapat (*rigid*) dan mampu mempertahankan integritas membran sel. Selain itu kandungan asam p-kumarat diketahui memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri gram positif maupun gram negatif.

Pada kopi robusta terdapat kandungan senyawa asam lemak seperti asam linoleat, asam palmitat, asam stearat dan asam oleat. Berdasarkan jurnal oleh Pablos & Gonza, (2001) diketahui pada kopi robusta jumlah asam oleat lebih banyak sekitar 12,3% dibandingkan kopi arabika. Sedangkan asam linoleat pada kopi robusta lebih sedikit sekitar 0,9% dibandingkan pada kopi arabika. Asam lemak diketahui memiliki efek imunologik dan berperan penting dalam transport dan metabolisme lemak (Ramirez *et al.*, 2006).

1.2.5 Aditif pada Seduhan Kopi

Aditif menurut KBBI adalah zat yang ditambahkan pada suatu produk, misalnya sebagai penambah warna, penyedap rasa, pengawet pada makanan. Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia (PERMENKES RI) Nomor 033 Tahun 2012, aditif atau Bahan Tambahan Pangan (BTP) adalah bahan yang ditambahkan ke dalam pangan untuk mempengaruhi sifat atau bentuk pangan. Penggolongan BTP atau aditif dalam PERMENKES RI terbagi atas beberapa golongan seperti pemanis (*sweetener*), perasa (*flavouring*), pengemulsi (*Emulsifier*), dll. Pengkonsumsian seduhan kopi dengan tambahan gula, susu, dan krimer sudah

sangat sering ditemui di masa sekarang. Hal tersebut dapat diketahui dari banyak beredarnya produk kopi instan yang telah terdapat aditif seperti gula, susu, maupun krimer dalam komposisinya. Contoh produk kopi instan yang telah berisi aditif didalamnya adalah Nescafé Original 3in1® (berisi kopi, gula, dan krimer), Nescafé Original® (berisi kopi, gula, susu), Indocafé Coffeemix 3in1® (berisi kopi, gula, dan krimer), Torabika susu® (berisi kopi, gula, susu), dll. Semakin banyaknya produk-produk inovatif oleh produsen kopi tersebut, maka dapat memicu perilaku konsumtif masyarakat pada umumnya untuk dapat sering menikmati seduhan kopi dengan cita rasa yang berbeda. Hasil penelitian oleh Lestari *et al* (2009), disebutkan jika masyarakat di Kabupaten Jember khususnya di wilayah Patrang, Sumpalsari, dan Kaliwates dengan kelompok umur ≤ 25 tahun banyak mengkonsumsi kopi jenis kopi campuran (berisi tambahan gula, susu, atau krimer), sedangkan pada kelompok umur > 25 tahun banyak mengkonsumsi jenis kopi bubuk.

a. Tinjauan Umum Gula

Gula merupakan komoditas strategis masyarakat Indonesia sebagai penggerak perekonomian di sektor pertanian khususnya di sub sektor perkebunan. Penggerak perekonomian masyarakat di Indonesia tersebut meliputi keikutsertaan peran gula dalam industri makanan, industri minuman, industri gula rafinasi, industri farmasi, kertas, dan *bio-energy*. Hal tersebut tentunya tidak lepas dari manfaat dari gula bagi masyarakat sebagai sumber kalori. Fakta ini membawa konsekuensi bagi pemerintah untuk menjamin ketersediaan gula dalam kebutuhan bermasyarakat. Selain itu, gula memiliki manfaat sebagai pemanis yang aman dan tidak membahayakan kesehatan. Munculnya pemanis buatan belum mampu memberikan persaingan yang berarti dengan keberadaan gula alami. Hal tersebut terjadi karena menimbang kekurangan dari pemanis buatan yang meninggalkan *aftertaste* seperti rasa pahit (Togi *et al.*, 2011; Sugiyanto, 2007). Menurut Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (2015), jenis-jenis gula terbagi atas beberapa macam yaitu gula pasir, gula putih lunak, gula merah lunak, dan gula aren.

Gula kristal putih atau gula pasir adalah gula sukrosa kristal yang diproduksi dari bahan baku tebu atau bit melalui tahapan proses yang meliputi penggilingan, penguapan, kristalisasi, fugalisasi, pengeringan, dan pengemasan. Gula pasir merupakan jenis gula yang paling umum digunakan masyarakat sebagai pemanis minuman, makanan, dan bahan pembuatan kue. Menurut Badan Pusat Statistik (BPS), tercatat per tanggal 4 April 2018 diketahui gula pasir memiliki nilai rata-rata konsumsi bahan makanan per kapita tertinggi ketiga setelah telur ayam dan beras. Hal tersebut terbilang tinggi jika dibandingkan dengan nilai gula merah yang hanya menempati posisi kesebelas. Perbandingan nilai rata-rata konsumsi antar gula tersebut menandakan bahwa gula pasir saat ini masih menjadi pilihan utama masyarakat dalam kegunaannya sebagai bahan pemanis. Selain itu menurut Satriana (2014), terdapat pengaruh positif antara meningkatnya produksi gula pasir dengan naiknya harga kopi di Indonesia. Hal tersebut dapat terjadi karena semakin berkembangnya industri kopi di Indonesia yang ditandai dengan banyak beredarnya berbagai jenis dan merk kopi sehingga berdampak pada produksi gula pasir. Data-data tersebut menunjukkan jika peminatan terhadap gula pasir saat ini masih digemari baik oleh masyarakat umum maupun pelaku industri.

b. Tinjauan Umum Susu

Susu merupakan komoditas penting dari sektor pertanian khususnya di sub sektor peternakan. Susu tergolong emulsi lemak dalam air yang mengandung beberapa senyawa terlarut penting bagi tubuh. Kandungan terbesar susu adalah air dan lemak. Porsi lemak susu mengandung vitamin yang hanya larut dalam lemak, seperti vitamin A, D, E, dan K (Pertanian, 2016). Air susu mengandung beberapa tipe protein, yaitu kasein dan laktoglobulin. Laktosa pada susu terdiri dari 2 macam gula sederhana, yaitu glukosa dan galaktosa. Kebiasaan dalam mengkonsumsi susu berdampak baik bagi tubuh khususnya pada tulang karena mengandung kalsium (Triratnawati, 2017). Kandungan zat gizi makro dan mikro pada susu bermanfaat dalam peningkatan komposisi mineral tulang, mengecilkan resiko karies gigi, meningkatkan kekebalan tubuh, kekurangan energi protein, serta rakhitis (Anggraini, 2012). Menurut Peraturan

Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (2015), jenis-jenis susu terbagi atas beberapa macam yaitu susu skim bubuk, susu bubuk berlemak (*full cream*), susu kental, susu bubuk rendah lemak dan susu bubuk kurang lemak.

Susu skim bubuk merupakan produk susu berbentuk bubuk yang diperoleh melalui proses pengeringan susu skim pasteurisasi (BPOM, 2015). Susu skim bubuk adalah susu yang bagian lemak (krim) diambil sebagian atau seluruhnya pada waktu didiamkan atau dipisahkan dengan alat *centrifugal separator*. Proses pengeringan bagian lemak dari susu ini akan menghasilkan produk olahan susu yang kandungan kalornya lebih rendah dari jenis susu lain sehingga cocok dikonsumsi bagi orang yang sedang diet rendah kalori (Aritonang, 2010). Pemilihan susu dalam bentuk bubuk karena keunggulannya dalam hal sulit terkontaminasi oleh mikroorganisme dibandingkan dengan susu kental dan susu cair, selain itu susu bubuk memiliki masa simpan yang lebih lama dan lebih praktis dibandingkan dengan susu dalam bentuk lain (Dewi *et al*, 2007).

c. Tinjauan Umum Krimer

Krimer atau krimer nabati (*non dairy creamer*) merupakan produk berupa emulsi lemak dalam air dan biasa digunakan sebagai pengganti susu atau krim pada penambahan minuman kopi, teh, dan minuman lainnya. Krimer tidak mengandung laktosa melainkan turunan dari protein susu yaitu kasein. Sehingga produk krimer ini sangat cocok dan aman bagi konsumen dengan gangguan *lactose intolerance*. Selain itu, bahan baku pembuatan krimer ini lebih murah, umur simpan produk lebih panjang, kemudahan dalam penyimpanan, distribusi dan penanganan (Listianing, Putri, & Hidayati, 2016). Krimer pada umumnya mengandung lemak 20-40%, protein 10 % (kasein natrium/*sodium caseinate*), dan karbohidrat. Namun rentang nilai kandungan tersebut dapat berubah sesuai dengan total berat krimer nabati tersebut.

Krimer mengandung bahan yang biasanya diformulasikan sebagai emulsi yang kemudian dikeringkan, disemprot kering dan dijual dalam bentuk bubuk. Umumnya krimer digunakan untuk menambah cita rasa makanan atau minuman dan kesesuaian masing-masing selera penikmat krimer. Pengguna krimer pada produk

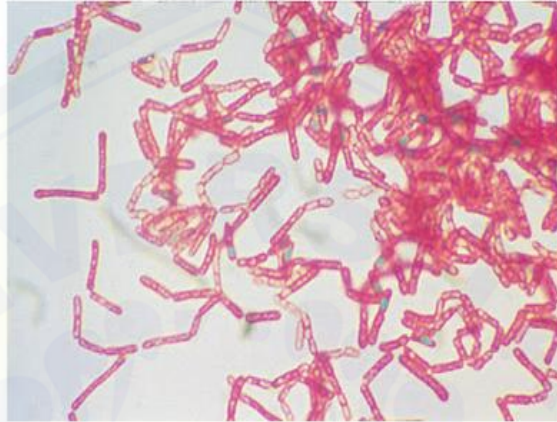
kopi instan dengan penambahan gula (*3 in 1 coffee*) menimbulkan lapisan pada proses penyeduhan setelah didiamkan lebih dari 10 menit, yang mana merupakan kategori *creaming* (Safitri & Purwantiningrum, 2013). Menurut Yulisa *et al*, (2013) menyebutkan jika keberadaan krimer masuk kedalam faktor yang dapat mempengaruhi konsumen dalam membeli kopi bubuk instan siap saji. Krimer dalam penelitian tersebut termasuk kedalam komponen utama I (faktor internal) yang mampu menjadi pertimbangan pada konsumen di provinsi Lampung dalam membeli kopi bubuk instan, selain itu faktor lain yang berada dalam komponen tersebut adalah aroma, pilihan rasa dan kekentalan pada kopi instan tersebut. Hal tersebut mengindikasikan jika saat ini keberadaan krimer dalam kopi telah dapat diterima oleh sebagian masyarakat.

1.3 *Bacillus cereus*

1.3.1 Deskripsi *B.cereus*

Bacillus cereus merupakan bakteri gram positif yang berbentuk basil (batang). Nama genus dari *Bacillus* termasuk turunan dari kata Latin yaitu *Bacillum*, yang mana berarti batang yang berjalan. Nama spesies yaitu *cereus* memiliki arti lilin dalam bahasa Latin. Sel vegetatif bakteri tersebut berbentuk batang lurus dengan ujung batangnya berbentuk bundar atau persegi. Ukuran bakteri ini berkisar antara lebar 0,5-1,2 μm dengan panjang 2,5-10,0 μm . Sebagian besar spesies ini bergerak dengan menggunakan flagella (*peritrichous flagella*). Endospora berbentuk oval atau terkadang bulat dan tahan dalam kondisi buruk. Spora elipsoidal, sentral atau prasental dan spora jarang keluar dari sporangia. Spora bakteri *Bacillus* resisten terhadap panas dan harus memperhatikan suhu pemanasan agar spora dapat hilang. Bakteri tipe ini biasanya muncul berbentuk rantai panjang yang berkisar ke beberapa sel. Bentuk koloni bakteri ini menunjukkan koloni yang besar dan datar pada media non-selektif. Aktivitas hemolitik *Bacillus* adalah hemolitik beta. Habitat bakteri ini sebagai saprotrof di tanah dan air, juga ditemukan pada bahan hewani dan sayuran

yang membusuk (Murray *et al.*, 2015; Mahon *et al.*, 2014). Menurut FDA (2012), *B.cereus* dapat hidup pada beberapa media pertumbuhan seperti *nitrate broth*, *tyrosin agar*, *nutrient agar*, dll.



Gambar 1.5 Spora *Bacillus* spp (perbesaran x1000) (Mahon *et al.*, 2014)

1.3.2 Taksonomi *B.cereus*

Klasifikasi taksonomi *Bacillus cereus* menurut *Intregated Taxonomic Information System* (ITIS) (2012) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Tracheophyta
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: Bacillus
Spesies	: <i>Bacillus cereus</i>

1.3.3 Patogenesis *B.cereus*

Bacillus cereus dikenal dengan sebutan organisme penyebab kejadian kasus keracunan pada makanan. *B. cereus* dapat menyebabkan 2 tipe kejadian kasus

keracunan makanan, yaitu sindrom emetik yang ditandai dengan mual serta muntah akibat adanya toksin cereulide pada bakteri tersebut dan diare akibat adanya enterotoksin yang melekat pada epitel *intestine host* (Tham & Danielsson-Tham, 2013; Doyle & Beuchat, 2007). Tipe enterotoksin beserta karakteristiknya tersedia pada Tabel 2.4.

Tabel 1.3 Karakteristik dua tipe penyakit yang disebabkan oleh *Bacillus cereus*

Karakteristik	Tipe Enterotoksin	
	Diare	Emetik
Periode Inkubasi	8-16 jam	1-5 jam
Diare	Sangat umum	Cukup umum
Muntah	Kadang-kadang	Sangat umum
Durasi Penyakit	12-24 jam	6-24 jam
Implikasi Makanan	Produk daging, sayur-sayuran, sup, pudding, saus	Nasi yang direbus maupun digoreng

Sumber : Doyle & Beuchat, 2007 dalam Tham & Danielsson-Tham, 2013

Patogen asing termasuk bakteri dapat menyerang sel dengan memicu terjadinya proses apoptosis. Apoptosis adalah tahapan yang telah terprogram untuk jalur kematian pada sel. Apoptosis dapat terjadi sebagai pertahanan akhir ketika sel dirusak oleh agen eksternal. Secara patogenesisnya, *Bacillus cereus* melepaskan beberapa jenis toksin diantaranya adalah 4 jenis *haemolysins* (*Haemolysins* I-IV), 3 fosfolipid yang berbeda, emesis *incuced-toxin*, dan 3 enterotoksin *pore-forming* (*Haemolysins* BL- HBL, *nonhaemolysins enterotoxin*- NHE, *cytotoxin* K). Faktor dari *Bacillus cereus* yang diketahui mampu memicu apoptosis adalah *haemolysins* II. Secara *in vivo*, terjadinya apoptosis oleh *Bacillus cereus* akan dapat menyebabkan timbulnya kerusakan jaringan hingga menurunnya respon imun, sehingga peningkatan penyebaran bakteri dalam tubuh akan memicu terjadinya tanda dan gejala suatu penyakit (Tran & Ramarao, 2013).

Toksin diare dilepaskan dari sel bakteri vegetatif yang hidup dalam keadaan menginfeksi dengan toksin sebagai perantaranya. Toksin yang dilepaskan oleh bakteri akan dicerna dalam usus halus, termasuk dalam memicu timbulnya diare. Diare

ditandai dengan adanya rasa nyeri dan tinja akan berubah menjadi cair hingga menyebabkan individu terinfeksi menjadi lemas dan dehidrasi akibat kehilangan banyak cairan. Disamping itu, toksin emetik diproduksi oleh bakteri ketika tumbuh dan berada dalam makanan. Toksin ini mampu menyebabkan keracunan yang parah ketika jumlah toksin yang terdapat pada makanan tersebut dalam dosis yang sangat tinggi. Gejala yang ditimbulkan meliputi mual, muntah, malaise dan juga termasuk diare. Tingkat keparahan *B.cereus* untuk menginfeksi dapat dalam kategori infeksi klinis berat dan fatal lainnya bahkan dapat menyebabkan kematian (Murray *et al.*, 2015; Wolf-Hall & Nganje, 2017).

1.4 Uji Viabilitas Sel Monosit

1.4.1 Isolasi Sel Monosit

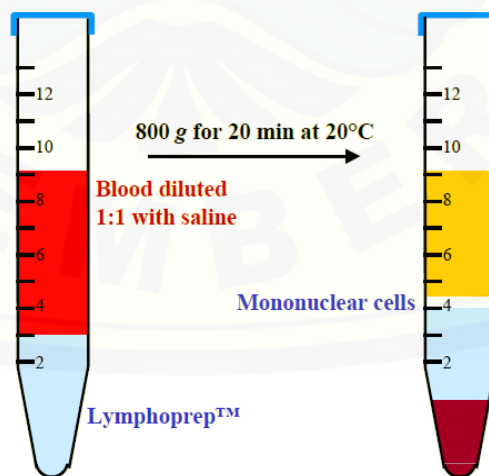
Teknik isolasi sel adalah suatu teknik yang dilakukan untuk mengambil suatu partikel sel yang bercampur dengan sel lain dari tempat sel tersebut berasal. Sedangkan isolasi sel mononuklear merupakan teknik untuk mengambil sel-sel mononuklear yang berada pada darah manusia melalui beberapa proses (Berthold, 1981). Isolasi sel dapat dilakukan dengan menggunakan teknik elutriasi sentrifugasi (*centrifugation elutriation*) yang dilengkapi rotor berputar dan memanfaatkan aliran cairan dengan kecepatan tertentu. Prinsip pemisahan sel dari alat tersebut adalah dengan memanfaatkan laju sedimentasi yang berbeda dari masing-masing sel, kemudian cairan yang mengandung sel tersebut akan dibuat bergerak melawan medan gravitasi dan akan mengalir menuju pusat rotasi yang terdapat ruang berbentuk kerucut didalamnya. Sel akan terpisah berdasarkan tingkat sedimentasi dan ukuran partikelnya, sehingga sel dengan ukuran yang lebih kecil akan menumpuk pada pusat rotasi, sedangkan sel yang lebih besar akan berada lebih jauh dari pusat rotasi seperti pada Gambar 2.6. Keuntungan dari teknik tersebut adalah waktu pengerjaan lebih cepat dan konsentrasi sel yang didapat lebih banyak dibandingkan dengan teknik yang lebih sederhana, sedangkan kekurangannya adalah membutuhkan keahlian

husus untuk dapat mengoperasikan alat tersebut, harga tidak ekonomis, dan tidak dapat memisahkan sel dengan tingkat sedimentasi yang sama (Burdon *et al*, 1988).



Gambar 1.6 Prinsip dari elutriasi sentrifugasi (Burdon *et al*, 1988)

Teknik lebih sederhana yang dapat digunakan untuk mengisolasi sel monosit adalah dengan pemisahan sel menggunakan *media density gradient*, kemudian sel dilekatkan pada media berbahan plastik atau gelas. Prinsip pemisahan teknik ini adalah menggunakan media pemisah (*Monocyte Separation Medium*) seperti *Lymphoprep™*, *Ficoll-paque™*, dll. Media pemisah tersebut berisi *iodinated density gradient medium* (seperti sodium diatrizoate) yang telah secara luas dipakai untuk memisahkan monosit dari darah manusia (Axis-Shield, 2016). Media pemisah tersebut kemudian ditempatkan ke dalam suatu tabung dan melapiskan *diluents* darah diatas media pemisah, selanjutnya tabung tersebut disentrifugasi dengan kecepatan dan tekanan tertentu sehingga akan terbentuk beberapa lapisan seperti pada Gambar 2.7.



Gambar 1.7 Skema pemisahan sel mononuklear dengan *media density gradient* (Axis-Shield, 2016)

Lapisan yang terbentuk setelah disentrifugasi terjadi akibat adanya perbedaan berat jenis dari masing-masing sel dalam darah. *Lymphoprep*TM sebagai media pemisah memiliki berat jenis yang spesifik untuk dapat memisahkan sel mononuklear dari darah manusia yaitu sebesar $1,077 \pm 0,001$ g/ml. Sel yang memiliki berat jenis lebih besar dari media pemisah akan berada dibawah lapisan media pemisah, namun sel yang memiliki berat jenis lebih kecil dari media pemisah akan berada diatas lapisan media pemisah (Seeligmüller N, 2016). Tahapan lain yang menunjang terbentuknya lapisan adalah proses sentrifugasi. Sentrifus (*Centrifuge*) merupakan alat yang digunakan untuk memisahkan partikel dari larutan berdasarkan ukuran, bentuk, viskositas dan berat jenisnya. Prinsip sentrifugasi adalah partikel yang memiliki berat jenis lebih besar daripada pelarut, maka akan mengendap dan partikel yang lebih ringan akan berada mengapung diatas. Semakin besar perbedaan berat jenisnya, maka akan semakin cepat partikel terpisah dari pelarut, namun jika tidak ada perbedaan nilai berat jenis antar partikel, maka partikel akan berada tetap pada posisi semula (Rickwood, 2001).

Tabel 1.4 Rentang berat jenis media dan berat jenis sel darah manusia serta elemen darah lainnya

Sel dan elemen darah lain	Rentang berat jenis [g/cm^3] (<i>Density range</i>)	Berat jenis media [g/cm^3] (<i>Medium density</i>)
Plasma/serum	-	1,026
Trombosit	1,040-1,060	1,058
Monosit	1,059-1,068	1,065
Limfosit	1,066-1,077	1,070
Basofil	1,075-1,081	1,079
Neutrofil	1,080-1,099	1,082
Eosinofil	1,088-1,096	1,092
Eritrosit	1,090-1,110	1,100

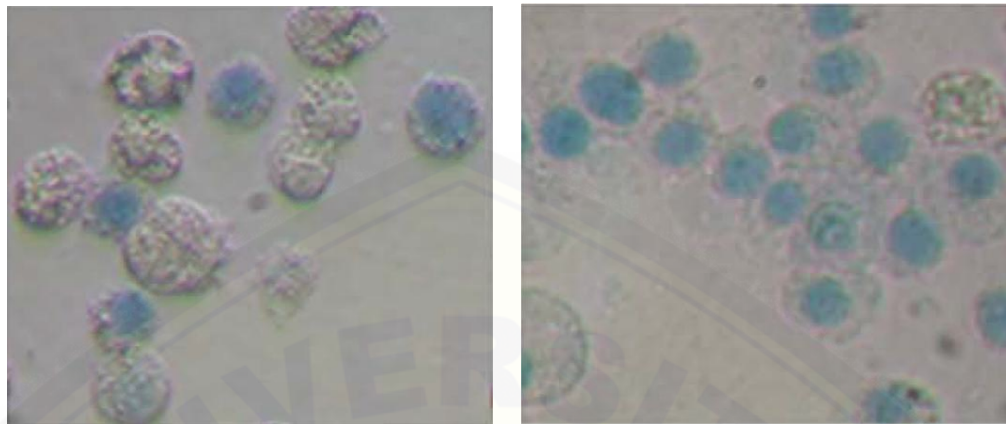
Sumber : (Luttmann *et al*, 2006)

Media pemisah yang sering digunakan dalam teknik sederhana *density gradient centrifugation* adalah *Ficoll-paque*TM dan *Lymphoprep*TM. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Locca *et al.*, (2009) kedua media memiliki efektifitas

yang sama ketika dilakukan pada prosedur yang sama. Dalam penelitian tersebut disebutkan pula jika kedua media yang digunakan untuk isolasi sel mononuklear tidak mempengaruhi komposisi dan hasil kuantitas dari tipe sel yang akan diisolasi (Locca *et al.*, 2009).

1.4.2 Perhitungan Viabilitas Sel Monosit

Metode pewarnaan sel merupakan cara umum yang digunakan untuk menilai viabilitas sel. *Trypan blue* merupakan pewarna diazo yang secara luas telah digunakan untuk pewarnaan spesifik terhadap sel atau jaringan yang telah mati. *Trypan blue* adalah salah satu pewarnaan berupa noda vital yang akan diserap oleh sel yang tidak utuh sehingga akan tampak berwarna biru menyala ketika diamati dibawah mikroskop, sedangkan sel yang utuh akan tampak tidak bernoda. Sel yang tidak berwarna memiliki membran sel yang utuh sehingga noda tidak akan terserap kedalam sel. Hal tersebut akan memudahkan dalam membedakan sel-sel yang utuh dan tidak utuh (Louis & Siegel, 2011). Mekanisme *trypan blue* dalam memberi noda vital adalah berdasarkan muatan negatif pada pewarna tersebut yang mampu melewati celah sel yang rusak, sehingga pewarna tersebut tidak akan memberi warna pada sel yang belum rusak. Menurut Tran *et al* (2011), kerusakan sel oleh *B. cereus* dengan terbentuknya pori (*pore-forming*) akibat toksin *haemolysins II* akan menyebabkan permeabilitas membran sel meningkat sehingga *trypan blue* dapat dengan mudah masuk ke dalam sel seperti pada Gambar 2.8. Pada jurnal penelitian tersebut dilakukan pengujian pewarnaan sel yang dipapar toksin *haemolysins II* dari *B. cereus* dengan rentang konsentrasi berbeda, kemudian diberi pewarnaan *trypan blue*. Gambar (a) menunjukkan jika dengan konsentrasi toksin sebesar 0.2 µg/ml mampu merusak sebagian sel yang ada, hal tersebut dapat terlihat dari hanya ada sebagian sel yang terwarnai, sedangkan pada gambar (b) menunjukkan hal yang sebaliknya, sehingga adanya kerusakan sel atau tidak oleh *B. cereus* dapat diketahui melalui pewarnaan dengan *trypan blue*.



(a)

(b)

Gambar 1.8 (a). Sel dipapar 0.2 µg/ml toksin *haemolysins II* dari *B.cereus*;
(b) Sel dipapar 0.5 µg/ml toksin *haemolysins II* dari *B.cereus*
(Tran *et al*, 2011)

Sel yang rusak tampak berwarna biru oleh *trypan blue* dapat divisualisasikan dan dihitung dibawah mikroskop cahaya. Menurut Ardiny (2014), lapang pandang sebanyak 3 mampu untuk mewakili tiap kelompok sampel. Selanjutnya, perhitungan dan pewarnaan *trypan blue* harus memperhatikan waktu dalam pengamatannya karena sel yang berwarna biru akan hilang setelah waktu baca sekitar 5 menit, bahkan ketika mencapai 30 menit sel akan mati akibat adanya paparan *trypan blue* yang terlalu lama (Cooksey, 2014; Shen & Vandenabeele, 2014). Perhitungan sel menggunakan mikroskop cahaya untuk mendapatkan nilai % viabilitas sel dengan membagi antara sel yang tidak terwarnai dengan total sel seluruhnya dan dikalikan 100 (Crowley *et al*, 2016).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories in-vitro* dengan rancangan penelitian *the post test control group design* karena sampel maupun perlakuan lebih terkendali dan terukur.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember dan Laboratorium *Bioscience*, Rumah Sakit Gigi dan Mulut (RSGM) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Februari 2018.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah seduhan kopi robusta, gula; seduhan kopi robusta, gula, susu dan kopi robusta, gula, krimer.

3.3.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah viabilitas sel monosit

3.3.3 Variabel terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah isolat sel monosit, konsentrasi suspensi bakteri *Bacillus cereus*, dan prosedur penelitian

3.4 Definisi Operasional

1. Seduhan kopi robusta merupakan hasil penyaringan dari bubuk kopi robusta Lanang Malang Sari yang berasal dari Café Rollas PT. Perkebunan Nusantara XII Jember dan diseduh dengan air panas dengan suhu 85°C.
2. Aditif yang ditambahkan kedalam pembuatan seduhan kopi robusta adalah gula pasir, krimer nabati (*non diary*), dan susu skim bubuk
3. Isolat sel monosit didapat dari darah vena perifer manusia (*vena cubiti*) wanita normal tidak memiliki kebiasaan mengkonsumsi kopi dengan teknik *gradient density centrifugation* serta media *Lymphoprep*TM.
4. Bakteri yang digunakan adalah *Bacillus cereus* ATCC (*The American Type Culture Collection*) 11778 diperoleh dari laboratorim Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Kriteria sampel

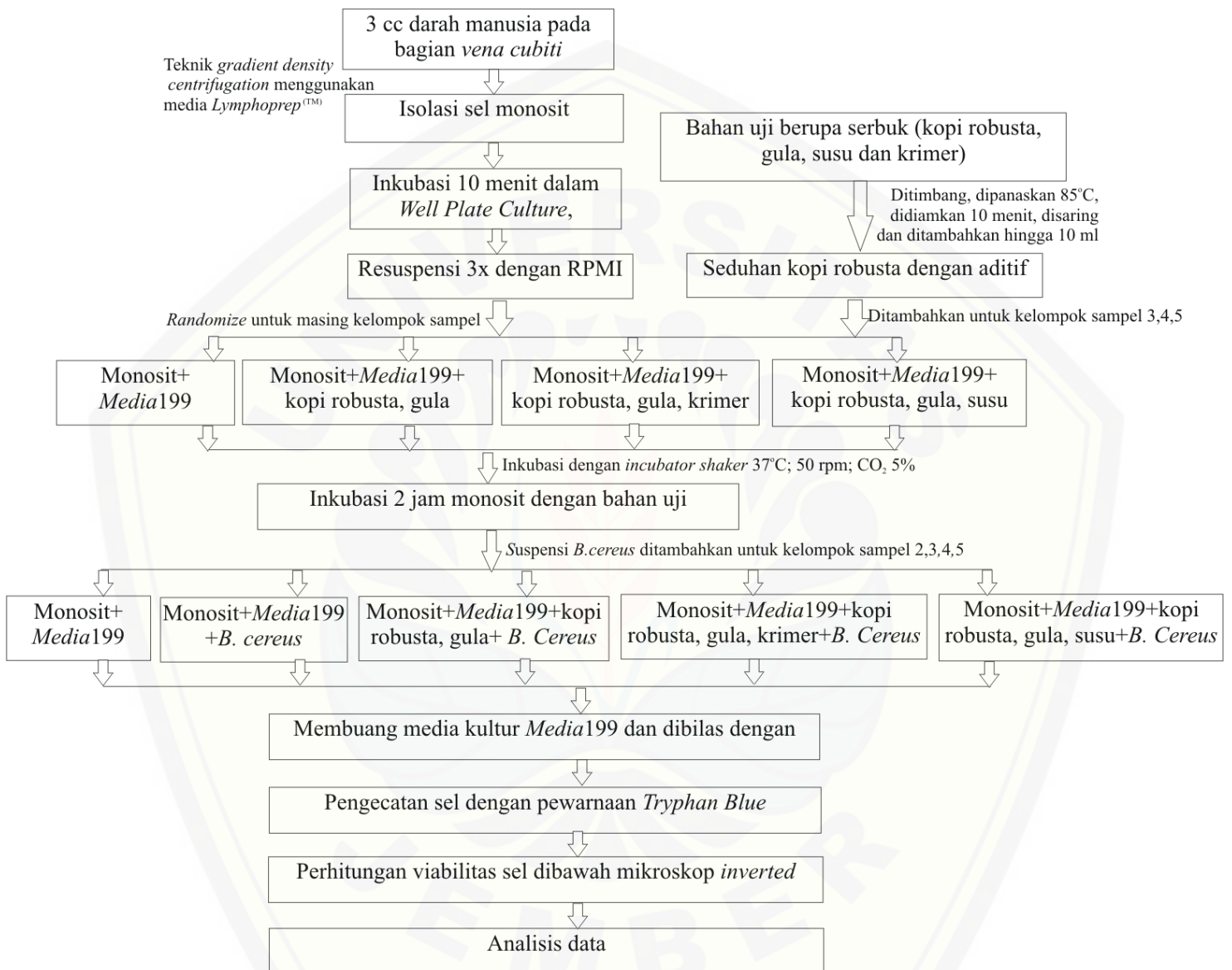
Penelitian ini menggunakan isolat sel monosit yang didapat dari darah vena perifer manusia (*vena cubiti*). Sampel darah ini diperoleh dari wanita sehat (tidak mempunyai penyakit sistemik) dan tidak memiliki kebiasaan mengkonsumsi kopi.

3.5.2 Kelompok sampel

Sampel penelitian terbagi atas 5 kelompok perlakuan, yakni sebagai berikut :

1. Kelompok I : Sel monosit + *Media* 199
2. Kelompok II : Sel monosit + *Media* 199 + *B. cereus*
3. Kelompok III : Sel monosit + *Media* 199 + kopi robusta, gula + *B. cereus*
4. Kelompok IV : Sel monosit + *Media* 199 + kopi robusta, gula, krimer + *B. cereus*
5. Kelompok V : Sel monosit + *Media* 199 + kopi robusta, gula, susu + *B. cereus*

3.6 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 2.1 Skema Prosedur Penelitian

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian kali ini adalah *Syringe* (One Med), *Torniquet*, *Coverslip*, *Vortex* (Labinco), *Incubator Shaker*, *Humaroller* (Human), *Mikroskop inverted* (Olympus), *Mikropipet* (Human), *Laminar flow*, *Tabung falcon* (Nunc), *Tabung heparin*, *Blue tip* dan *yellow tip*, *Filter* (Corning), *Rotating Shaker*, *Autoclave*, *Well* (Costar), *Sentrifugasi 5810 R* (Hermile), *Seperangkat alat gelas* (Pyrex), *Microplate*, *Stopwatch*, *Timbangan Analitik* (Ohaus), *DensiCHEK Plus®*.

3.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian kali ini adalah darah vena perifer (vena cubiti), *Lymphoprep™ Media Gradient Centrifugation* (MP Biomedical), *HBSS-Hank's Balance Salt Solution* (Sigma), *Trypan Blue*, *RPMI Medium* (Roswell Park Memorial Institute), *Aquadest Steril*, *Methanol*, *Penicillin-Streptomycin solution stabilized* (Sigma), *Alkohol 70%*, *Fungizon Amphotericin*, *Media 199* (Gibro), *NA* (*Nutrient Agar*), bubuk kopi robusta yang berasal dari Café Rollas Jember, gula pasir Gulaku®, susu bubuk skim Petit Eric®, krimer Max Creamer®.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Sterilisasi alat

Semua alat penelitian yang terbuat dari logam dicuci bersih kemudian disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C. Sedangkan alat yang terbuat dari plastik disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%.

3.8.2 Pembuatan seduhan kopi robusta dengan aditif

Sebanyak 15 g bubuk kopi diseduh dengan air panas 200 ml dan suhu 85°C sehingga didapatkan sampel seduhan kopi robusta murni. Selanjutnya aditif yang digunakan secara empiris adalah dengan penambahan 10 g gula, 5 g krimer dan 5 g

susu. Pada penelitian kali ini preparasi seduhan kopi robusta dengan aditif menimbang sebanyak 0,75 g kopi robusta, 0,5 g gula; 0,75 g kopi robusta, 0,5 g gula, 0,25 krimer dan 0,75 g kopi robusta, 0,5 g gula, 0,25 g susu kemudian masing-masing dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml. Akuades dipanaskan sampai dengan suhu 85°C lalu ditambahkan pada masing-masing labu ukur 10 ml dan dikocok serta didiamkan 10 menit. Lalu dilakukan penyaringan dengan kertas saring kemudian dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan *syringe filter* 0,22 µm untuk mencegah adanya bakteri bahan uji. Kemudian dilakukan pengenceran pada masing-masing kelompok perlakuan dengan memipet 0,1 ml dan menambahkan *aquadest* steril hingga 1 ml.

3.8.3 Pengambilan sampel darah

Pengambilan sampel darah sebanyak 6 cc dari darah vena perifer manusia (*vena cubiti*) wanita sehat dengan menggunakan *syringe*. Kemudian memasukkan dalam tabung heparin secara perlahan-lahan dengan melewati pada dinding tabung agar tidak berbuih kemudian tabung digoyangkan agar tidak menggumpal. Didapatkan sampel darah yang digunakan untuk tahapan isolasi sel monosit.

3.8.4 Pembuatan Bakteri *B. cereus*

a. Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Peremajaan biakan murni *B.cereus* dilakukan dengan mendekati mulut tabung reaksi berisi media NA pada nyala api saat akan menggoreskan jarum ose yang terdapat *B. cereus*, agar tidak terjadi kontaminasi bakteri lain. Selanjutnya media NA yang telah digoreskan *B.cereus* ditutup dengan kapas dan plastik *wrap*. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator, suhu 37°C.

b. Pembuatan Bakteri *B. cereus*

B.cereus dari kultur peremajaan biakan murni diambil menggunakan jarum ose steril kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi berisi 10 ml *Media* 199

steril secara aseptis dan di vortex. Lalu kekeruhan suspensi bakteri dibandingkan dengan standar *Mc Farland* 0,5 (setara 1×10^8 CFU) dengan cara diperiksa menggunakan *DensiCHEK Plus*. Kemudian didapat suspensi bakteri sebagai biakan aktif dan siap dipaparkan pada isolat sel monosit.

3.8.5 Pembuatan RPMI dan Medium Complex

- a. Pembuatan RPMI dari sediaan bubuk ke cair (dalam 150 ml aquadest steril)

$$\frac{10,4 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 150 \text{ ml} = 1,56 \text{ gram}$$

Sehingga, dalam 150 ml aquadest steril ditambahkan 1,56 gram serbuk RPMI

- b. Pembuatan Medium Complex *Media* 199 (dalam 200 ml aquadest steril)

$$\frac{9,5 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 200 \text{ ml} = 1,9 \text{ gram}$$

Sehingga, dalam 200 ml aquadest steril ditambahkan 1,9 gram serbuk *Media* 199

3.8.6 Isolasi sel monosit (*Single Filter*/dengan *Lymphoprep*TM)

Memasukkan 3 ml darah kedalam tabung heparin dicampur hingga homogen. Kemudian darah diencerkan dengan menggunakan garam fisiologi (HBSS pH 7,4) dengan perbandingan 1:1, dicampur hingga homogen. Diluent darah dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 3 ml larutan *Lymphoprep*TM dengan perbandingan *Lymphoprep*TM dengan diluent darah 1:2. Kemudian dimasukkan melalui dinding tabung secara perlahan, larutan *Lymphoprep*TM jangan sampai pecah. Selanjutnya di sentrifugasi dengan kecepatan 800 g selama 20 menit pada suhu 20 °C sehingga akan terbentuk 4 lapisan yaitu lapisan plasma, mononuklear, *Lymphoprep*TM, dan polimorfonuklear eritrosit. Selanjutnya, lapisan kedua mononuklear (cincin kabut) dipipet secara hati-hati dan dimasukkan pada tabung steril. Sampel mononuklear diencerkan menggunakan HBSS (1:1), campur hingga homogen. Disentrifugasi dengan kecepatan 900 g selama 3 menit pada suhu 20°C, dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Kemudian ditambahkan 1 ml HBSS pH 7,4 pada supernatan yang

didapat, dan dicampur hingga homogen, lalu menambahkan 5 μl *fungizone* dan 20 μl Penicillin-Streptomycin.

Menyiapkan *Well Culture* kemudian memasukkan *coverslip* steril pada masing-masing *well* (d disesuaikan dengan kebutuhan). Kemudian ditetaskan 100 μl supernatan hasil isolasi sel pada *coverslip* yang sudah disiapkan. Selanjutnya diinkubasi selama 20-30 menit pada suhu 37°C. Setelah selesai, ambil dan tambahkan 1 ml media kultur RPMI dan diinkubasi lagi selama 20-30 menit pada suhu 37°C. Kemudian diamati dibawah mikroskop *inverted* dengan menggoyangkan secara perlahan untuk melihat penempelan selnya. Setelah itu dicuci menggunakan media RPMI sebanyak 3 kali secara hati-hati untuk melepaskan kontaminasi selnya. Setelah dicuci kemudian diamati dibawah mikroskop *inverted* untuk melihat kontaminasi selnya. Setelah sel steril dan bebas dari kontaminasi, media kultur diganti menggunakan media kultur *Media 199*, dan sel siap untuk dilakukan perlakuan.

3.8.7 Inkubasi sel monosit dengan bahan uji

Menambahkan masing-masing 100 μl bahan uji (kopi robusta, gula; kopi,gula,krimer; kopi,gula,susu) pada *well culture* sesuai perlakuan dan homogenkan. Lalu dilakukan *pipetting* pada monosit dan bahan uji kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C dan 5% CO₂. Mengamati di bawah mikroskop *inverted*, dengan melihat pengaruh bahan uji terhadap sel monosit.

3.8.8 Perlakuan Sampel dengan paparan *B.cereus*

Menambahkan 100 μl *B.cereus* pada sampel dan dihomogenkan. Setelah homogen, diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37 °C dan CO₂ 5% dan dilakukan uji viabilitas sel pada kontrol negatif.

3.8.9 Pengecatan *Trypan Blue* dan Perhitungan Viabilitas Sel Monosit

Pengecatan sel dimulai dengan membuang media kultur *Media 199* lalu ditambahkan 150 µl HBSS pH 7,4 dan menambahkan 50 µl cat *trypan blue* lalu dihomogenkan. Kemudian diamati dibawah mikroskop *inverted* dengan waktu baca kurang dari 3 menit. Perhitungan jumlah monosit dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Viabilitas sel monosit (\%)} = \frac{\text{Jumlah sel monosit hidup}}{\text{Total sel monosit seluruhnya}} \times 100\% \dots \dots \dots (3.2)$$

(Crowley *et al*, 2016)

3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis dengan uji normalitas Saphiro-wilk dan uji homogenitas Levene. Data antar kelompok dapat dikatakan normal jika terdapat perbedaan bermakna ($p > 0,05$), sedangkan jika nilai uji Levene $> 0,05$ maka dapat dikatakan bahwa variasi data adalah homogen. Selanjutnya, jika data yang dihasilkan homogen dan normal, maka dapat dilakukan uji statistik parametrik, yaitu uji *one way annova* dan apabila terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji LSD.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Seduhan kopi robusta dengan aditif memiliki potensi meningkatkan viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus*. Nilai viabilitas sel monosit pada seduhan kopi robusta, gula sebesar $66,65\% \pm 1,52\%$, seduhan kopi robusta, gula, krimer $37,74\% \pm 2,56\%$, dan seduhan kopi robusta, gula, susu $25,92\% \pm 3,06\%$.
2. Potensi seduhan kopi robusta dengan penambahan krimer terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus* lebih tinggi dibandingkan dengan seduhan kopi robusta dengan penambahan susu. Hasil analisis Anova dan uji LSD menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok.

5.2 Saran

Penelitian mengenai potensi seduhan kopi robusta dengan aditif terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus* perlu dikembangkan dengan beberapa saran sebagai berikut :

1. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai kandungan zat aktif spesifik dari seduhan kopi robusta yang mampu meningkatkan viabilitas sel monosit
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya dengan membuat tingkatan konsentrasi yang bervariasi dari seduhan kopi robusta dengan aditif.
3. Untuk meningkatkan sistem pertahanan tubuh, sebaiknya seduhan kopi robusta diminum hanya dengan penambahan gula tanpa adanya krimer dan susu

DAFTAR PUSTAKA

- Agata N, Ohta M, Mori M, Shibayama K. (1999). Growth Conditions of and Emetic Toxin Production by *Bacillus cereus* Defined Medium with Amino Acids. *Microbiology and Immunology*; 43(1): 15-8
- Alburuda, F. (2013). Viabilitas Monosit yang Dipapar Streptococcus mutans dan Diinkubasi Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*). *Skripsi*. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Anggraini, Y. D. (2012). Konsumsi Susu dan Faktor-faktor yang Mempengaruhinya pada Balita di Wilayah Kelurahan Pekayongan Kecamatan Pasar Rebo Jakarta Timur Tahun 2012. *Skripsi*. Jakarta : Fakultas Kesehatan Masyarakat Program Studi Gizi Universitas Indonesia
- Ardiny, K. (2014). Jumlah Sel Monosit Setelah Paparan Tunggal Radiasi Sinar X dari Radiografi Periapikal. *Skripsi*. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Asti, S. I. P. (2015). Pengaruh Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Monosit. *Skripsi*. Jember : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Bain, B. J. (2017). Structure and function of red and white blood cells. *Elsevier Ltd*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jmpmed.2017.01.011>
- Berthold, F. B. (1981). *Analysis of Hematology* (p. 367). Gießen, Germany: Springer-Verlag.
- Broderick, N. A. (2015). A common origin for immunity and digestion. *Department of Molecular, Cellular, and Development Biology, Yale University, New Haven, CT, USA*, 6:1–4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00072>

- Budirahardjo, R. (2009). Peningkatan Viabilitas Monosit oleh Biji Kopi Robusta terhadap *Streptococcus mutans*. *Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember*
- Cisewski, S. E., L. Zhang, J. Kuo, G. J. Wright, Y. Wu, M. J. Kern, dan H. Yao. 2016. The effects of oxygen level and glucose concentration on the metabolism of porcine tmj disc cells. *HHS Public Access*. 70(12):773–779.
- Cooksey, C. J. (2014). Quirks of dye nomenclature. *59 Swiss Avenue, Watford WD18 7LL England, UK*, 564–568. <https://doi.org/10.3109/10520295.2014.916415>
- Clifford, M. N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 362–372
- Cressey, P., King, N., Soboleva. (2016). Risk profile: *Bacillus cereus* in Dairy Products. *Ministry of Primary Industry*. New Zealand Government
- Dale, D. C., Boxer, L., & Liles, W. C. (2016). The phagocytes : neutrophils and monocytes. *University of Washington, University of Michigan, University of Toronto*, 112(4), 935–946. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-077917>.
- Delita, Y. N. (2012). Viabilitas Monosit yang Dipapar *Streptococcus viridans* dan Diinkubasi dengan Minyak Zaitun (*Oleum oliviae*). *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Dhaouadi, K., Raboudi, F., Estevan, C., Barrajon, E., Vilanova, E., Hamdaoui, M., & Fattouch, S. (2011). Cell Viability Effects and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tunisian Date Syrup (Rub El Tamer) Polyphenolic Extracts. *Food Biochemistry, Tunisia*, 402–406. <https://doi.org/10.1021/jf103388m>
- Doyle, M. P., & Beuchat, L. R. (2007). *Food Microbiology : Fundamental and Frontiers* (3th Edition). Washington, DC: ASM Press.
- Farah, A., & Donangelo, C. M. (2006). *Phenolic compounds in coffee*. *Laboratório de Bioquímica, Rio de Janeiro*, 18(1), 23–36.

- Flannagan, S. R., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). *The Cell Biology of Phagocytosis*, 7. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132445>
- Fukushima, Y., Tashiro, T., Kumagai, A., Ohyanagi, H., Horiuchi, T., Takizawa, K., Sugihara, N., Chie, T., Mariko, T., Kondo, K. (2014). Coffee and beverages are the major contributors to polyphenol consumption from food and beverages in Japanese middle-aged women. *Journal of Nutritional Science, Japan*, 3 : e48. doi : 10.1017/jns.2014.19
- Gardiner, D., Jones, R., Yoncoskie, R. 1977. *Non-Dairy Creamer Composition, United States Patent*. England : United States Patent
- Geo, F. B., Karen C Carroll, Janet S Butel, Stephen A Morse. (2007). *Medical Microbiology*. (E. N. dan R. F. Maulany, Ed.) (24th ed.). Jakarta: EGC.
- Gerald, K. (2009). *Cell and Molecular Biology : Concepts and Experiments* (7th ed.). United State of America: John Wiley & Sons, Inc.
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., Palazon, J. 2013. *Phenolic Acids*. Argentina, Cordoba : Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Gordon, S. (2016). Phagocytosis : An Immunobiologic Process. *Elsevier Inc*, 44(3), 463–475. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>
- Gyls, B. A., Ellen, M. (2009). *Medical Terminology System* (6th ed.). Philadelphia, United States of America: F.A. Davis Company.
- Kucekova, Z., Mlcek, J., Humpolicek, P., & Rop, O. (2013). Edible flowers - antioxidant activity and impact on cell viability. *Central European Journal of Biology*, 8(10), 1023–1031. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0212-y>
- Lestari, Endang. Haryanto, Idha. Mawardi, Surip. 2009. Konsumsi Kopi Masyarakat Perkotaan dan Faktor-Faktor Yang Berpengaruh: Kasus di Kabupaten Jember. *Pelita Perkebunan*. 25(3):216—235.

- Laluce, C., J. O. Tognolli, K. F. De Oliveira, C. S. Souza, dan M. R. Morais. 2009. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83(4):627–637
- Listianing, H., Putri, R., & Hidayati, A. (2016). Pengendalian Kualitas Non Dairy Creamer Pada Kondisi Proses Pengeringan Semprot di PT. Kievit Indonesia, Salatiga. *Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP, Universitas Brawijaya Malang*, 4(1), 443–448.
- Locca, D., Brookman, P., Mathur, A., Yeo, C., Flett, A., Preston, M., & Aqrawal, S. (2009). Ficoll-Paque™ versus Lymphoprep™ : a comparative study of two density gradient media for therapeutic bone marrow mononuclear cell preparations. *Future Medicine Ltd, London, UK*, 4(5) : 689–696. <https://doi.org/10.2217/rme.09.44>
- Louis, K. S., & Siegel, A. C. (2011). Cell Viability Analysis Using Trypan Blue : Manual and Automated Methods. *Mammalian Cell Viability: Method and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 740(1), 7–12. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6>
- Mahon, R. C., C. Lehman, Do., & Manuselis, G. (2014). *Diagnostic Microbiology* (5th Edition, p. 1096). Ohio, China: Elsevier Inc.
- Murray, R. P., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015). *Medical Microbiology* (8th Edition). Canada: Elsevier Inc.
- Nikolina M, G. K. and T. B. (2005). Polyphenols : Food Sources and Health Benefits. *Functional Food, InTech*, 2: 24-41, <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68862>
- Oestreich-Janzen, S. 2013. *Chemistry of Coffee*. Elsevier Inc. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*
- Oteiza, P. I., Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., & Keen, C. L. (2005). Flavonoid-membrane interactions : A protective role of flavonoids at the membrane surface?. *Clinical & Development Immunology, Taylor & Francis Group* 19–25. <https://doi.org/10.1080/10446670410001722168>

- Pablos, F., & Gonza, A. G. (2001). Fatty acid profiles as discriminant parameters for coffee varieties differentiation. *Elsevier Inc*, 54, 291–297. PII:S0039-9140(00)00647-0
- Panggabean, I. E. (2011). *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: Agro Media.
- Patay, B., & Bencsik, T. (2016). Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *Elsevier Inc*, 9(12), 1127–1135. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.11.008>
- Patay, B., Sali, N., Csepregi, R., Bal, L., N, T. S., & Tibor, N. (2016). Antioxidant potential , tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three *Coffea* species. *Elsevier Inc*, 9(4), 366–371. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.014>
- Perdagangan, Kementerian. (2013). Market Brief Kopi (Specialty Growing Region : Indonesia). Jakarta : Kementerian Perdagangan
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology, 2202–2211. <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>
- Pertanian, Kementerian. (2016a). *Outlook Kopi : Komoditas Pertanian Subsektor Perkebunan*. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jendral-Kementerian Pertanian.
- Pertanian, Kementerian. (2016b). *Outlook Susu (Komoditas Pertanian Subsektor Peternakan)*. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jendral-Kementerian Pertanian.
- Preedy, V. R. (2015). *Coffee in Health and Disease Prevention*. London, UK: Academic Press.
- Price, L. (2007). *Pathophysiology Vol 3*. Jakarta: EGC.
- Pruchnik H., Kujawa D. B., Kleszczynska H. 2013. Effect of Chlorogenic Acid on Phase Transition in Phospholipid and Phospholipid/Cholesterol Membranes.

Poland : Springer

Putri, R. R. (2017). Penetapan Kadar Polifenol dan Uji Aktivitas Antioksidan Pada Aneka Sajian Minuman Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Menggunakan Metode DPPH. *Skripsi*. Jember : Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Ramirez, M., Quiles, J., Yaqoob, P. (2006). *Olive Oil and Health*. CABInternational

Rickwood, D. 2001. Centrifugation Techniques. *Article*. United Kingdom, Colchester: University of Essex

Ridwansyah. (2003). *Pengolahan Kopi*. Fakultas Pertanian Jurusan Teknologi Pertanian : Universitas Sumatra Utara.

Rodak, B. F, & Carr J H. (2013). *Clinical Hematology Atlas. Fifth Edition*. China

Satriana, D. E., Tety, Ermi., Rifai, Ahmad. 2014. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Konsumsi Gula Pasir di Indonesia. Jurusan Agribisnis Fakultas Pertanian Universitas Riau.

Safitri, F., & Purwantiningrum, I. (2013). Pengaruh Penambahan Pati Termodifikasi Pada Non Dairy Creamer terhadap Stabilitas Emulsifikasi dan Efisiensi Sodium Caseinate. *Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FTP Universitas Brawijaya Malang, 1(1)*, 1–14.

Seeligmüller, N. 2016. Faster Isolation of PBMC Using Ficoll-Paque® Plus in the Eppendorf® Centrifuge 5920 R. Germany, Hamburg : Eppendorf AG

Shen, H. M., & Vandenabeele, P. (2014). *Necrotic Cell Death*. New York, London: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8229-8>

Sherma, J., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2011). *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. United State of America: CRC Press Taylor & Francis Group.

- Sigma Aldrich. 2006. Giemsa stain (procedure no. gs-10). *Cold Spring Harbor Protocols*. (7)
- Sugiyanto, C. (2007). Permintaan gula di indonesia. *Fakultas Ekonomi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta*, 8(2) : 113-127.
- Supranto, J. (2007). *Teknik Sampling Untuk Survei dan Eksperimen*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Tham, W., & Danielsson-Tham, M.-L. (2013). *Food Associated Pathogens* (p. 354). London, UK: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Togi, Y., Marpaung, F., Hutagaol, P., Limbong, W. H., Kusnadi, N., & Belakang, L. (2011). Perkembangan Industri Gula Indonesia dan Urgensi Swasembada Gula Nasional. *Indonesian Journal of Agricultural Economics (IJAE)*, 2, 1–14.
- Tran S., & Ramarao N. 2013. *Bacillus cereus immune Escape : a Journey Within Macrophage*. *FEMS Microbiology Letters*. France : AgroParisTech
- Triratnawati, A. (2017). Makna susu bagi konsumen mahasiswa di kafe susu di Yogyakarta : antara gizi dan gengsi. Departemen Antropologi, Fakultas Ilmu Budaya Universitas Gadjah Mada, 14(1), 27–35.
- Turgeon, M. L. (2005). *Clinical Hematology (Theory and Procedures)* (4th Edition). United State of America: Lippincott Williams & Wilkins.
- Upadhyay R., & Rao J. M. 2013. *An Outlook on Chlorogenic Acids-Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities*. India : Taylor & Francis Group
- Wang, Yu & Ho, Chi-Tang. 2009. *Polyphenolic Chemistry of Tea and Coffee: A Century of Progress*. *Agricultural and Food Chemistry*. New Jersey, New Brunswick: American Chemical Society
- Watson, R. R., & De Meester, F. (2016). *Handbook of Lipid in Human Function* :

Fatty Acid. United State of America: AOCS Press.

Wolf, S., & Murray, A. K. (1981). *Advance in Medicine and Biology*. New York, London: Plenum Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4112-3>

Wolf-Hall, C., & Nganje, W. (2017). *Microbial Food Safety: A Food Systems Approach*. Boston, USA: CABI.

Yashin, A., Yashin, Y., Wang, J. Y., & Nemzer, B. (2013). *Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee*, 230–245. <https://doi.org/10.3390/antiox2040230>

Yulisa, Lutfi., Indriani, Yaktiworo., Situmorang, Suriaty. 2013. Perilaku Konsumsi Mahasiswa Universitas Lampung Terhadap Kopi Bubuk Instan Siap Saji. *Journal*. Jurusan Agribisnis Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

<http://www.depkes.go.id/article/view/13010100001/profil-visi-dan-misi.html>.

Diakses pada 21 Januari 2018 pukul 00.17 WIB. Dipublikasi pada : Kamis, 12 Juni 2014, 00:00:00 oleh KEMENKES RI

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=506060#null. Taksonomi *Coffea canephora* , *Taxonomic Serial No.:* 506060. Diakses pada 3 Februari 2018 pukul 19.23 WIB.

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=959821#null. Taksonomi *Bacillus cereus*, *Taxonomic Serial No.:* 959821. Diakses pada 3 Februari 2018 pukul 19.50 WIB.

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/32884>. Deskripsi Giemsa. Diakses pada 2 Juli 2018 pukul 22.05 WIB

<http://www.dairyglobalnutrition.org/nutrition/milk-powder>. USDEC. Nutrisi Susu Bubuk Skim. Diakses pada 2 Juli 2018 pukul 21.18 WIB

www.ndb.nal.usda.gov. USDA National Nutrient Data Base 2016

LAMPIRAN

Lampiran A. Perhitungan Pengenceran Bahan Uji

Berat masing-masing bahan uji :

1. Kopi robusta : 0,75 gram
2. Gula : 0,5 gram
3. Krimer : 0,25 gram
4. Susu : 0,25 gram

Pembuatan larutan induk dengan menambahkan bahan uji ke dalam vial hingga 10 ml sesuai dengan kelompok perlakuan, dengan rincian sebagai berikut :

Kelompok III : Kopi 0,75 gram, gula 0,5 gram ad 10 ml

Kelompok IV : Kopi 0,75 gram, gula 0,5 gram, krimer 0,25 gram ad 10 ml

Kelompok V : Kopi 0,75 gram, gula 0,5 gram, susu 0,25 gram ad 10 ml

- a. Seduhan kopi robusta, gula (Kelompok III)

Berat bahan uji total pada kelompok ini adalah 1,25 gram

Konsentrasi larutan induk 100%:

$$\frac{1,25 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 12,5 \times 10^3 \text{ ppm}$$

Konsentrasi yang dibuat yaitu sebesar 10%:

$$\frac{10}{100} \times 12,5 \times 10^3 = 1250 \text{ ppm}$$

Besar volume yang harus dipipet jika dibuat volume 1 ml :

$$\frac{x}{1 \text{ ml}} \times 12,5 \times 10^3 \text{ ppm} = 1250 \text{ ppm}$$

$$x = 0,1 \text{ ml ad 1 ml}$$

- b. Seduhan kopi robusta, gula, krimer (Kelompok IV)

Berat bahan uji total pada kelompok ini adalah 1,50 gram

Konsentrasi larutan induk 100%:

$$\frac{1,50 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 15 \times 10^3 \text{ ppm}$$

Konsentrasi yang dibuat yaitu sebesar 10%:

$$\frac{10}{100} \times 15 \times 10^3 = 1500 \text{ ppm}$$

Besar volume yang harus dipipet jika dibuat volume 1 ml :

$$\frac{x}{1 \text{ ml}} \times 15 \times 10^3 \text{ ppm} = 1500 \text{ ppm}$$

$$x = 0,1 \text{ ml ad } 1 \text{ ml}$$

c. Seduhan kopi robusta, gula, susu (Kelompok V)

Berat bahan uji total pada kelompok ini adalah 1,50 gram

Konsentrasi larutan induk 100%:

$$\frac{1,50 \text{ gram}}{10 \text{ ml}} \times 1000 = 15 \times 10^3 \text{ ppm}$$

Konsentrasi yang dibuat yaitu sebesar 10%:

$$\frac{10}{100} \times 15 \times 10^3 = 1500 \text{ ppm}$$

Besar volume yang harus dipipet jika dibuat volume 1 ml :

$$\frac{x}{1 \text{ ml}} \times 15 \times 10^3 \text{ ppm} = 1500 \text{ ppm}$$

$$x = 0,1 \text{ ml ad } 1 \text{ ml}$$

Lampiran B. Hasil Uji viabilitas sel monosit**B.1. Kelompok I (Monosit+M.199)**

Replikasi	Lapang Pandang	Sel Hidup	Sel Mati	Jumlah Total Sel	Viabilitas Sel (%)	Rata-rata (%)
1	1	113	46	159	71.07	92,04
	2	76	65	141	53.90	
	3	54	81	135	40.00	
	4	47	74	121	38.84	
2	1	112	56	168	66.67	93,99
	2	105	51	156	67.31	
	3	115	52	167	68.86	
	4	88	95	183	48.09	
3	1	63	40	103	61.17	91,66
	2	31	30	61	50.82	
	3	51	43	94	54.26	
	4	70	55	125	56.00	
Rata-rata (%)						92,56
Standar Deviasi						1,25

B.2. Kelompok II (Monosit+M.199+ *B. cereus*)

Replikasi	Lapang Pandang	Sel Hidup	Sel Mati	Jumlah Total Sel	Viabilitas Sel (%)	Rata-rata (%)
1	1	5	90	95	5.26	8,86
	2	2	127	129	1.55	
	3	12	65	77	15.58	
	4	6	40	46	13.04	
2	1	4	40	44	9.09	8,55
	2	7	37	44	15.91	
	3	7	69	76	9.21	
	4	0	89	89	0.00	
3	1	14	118	132	10.61	8,40
	2	6	89	95	6.32	
	3	0	109	109	0.00	
	4	13	65	78	16.67	
Rata-rata (%)						8,60
Standar Deviasi						0,24

B.3. Kelompok III (Monosit+M.199+Kopi, gula+B. cereus)

Replikasi	Lapang Pandang	Sel Hidup	Sel Mati	Jumlah Total Sel	Viabilitas Sel (%)	Rata-rata (%)
1	1	22	49	71	30,99	65,30
	2	66	15	81	81,48	
	3	44	14	58	75,86	
	4	43	16	59	72,88	
2	1	58	12	70	82,86	68,31
	2	61	11	72	84,72	
	3	51	37	88	57,95	
	4	31	34	65	47,69	
3	1	103	56	159	64,78	66,35
	2	31	4	35	88,57	
	3	100	50	150	66,67	
	4	61	74	135	45,19	
Rata-rata (%)						66,65
Standar Deviasi						1,52

B.4. Kelompok IV (Monosit+Media M.199+Kopi,gula,krimer+B. cereus)

Replikasi	Lapang Pandang	Sel Hidup	Sel Mati	Jumlah Total Sel	Viabilitas Sel (%)	Rata-rata (%)
1	1	72	96	168	42.86	34,81
	2	28	34	62	45.16	
	3	14	33	47	29.79	
	4	15	55	70	21.43	
2	1	47	58	105	44.76	38,89
	2	20	59	79	25.32	
	3	23	35	58	39.66	
	4	44	52	96	45.83	
3	1	63	99	162	38.89	39,51
	2	29	31	60	48.33	
	3	16	32	48	33.33	
	4	48	80	128	37.50	
Rata-rata (%)						37,74
Standar Deviasi						2,56

B.5. Kelompok V (Monosit+Media M.199+Kopi,gula,susu+B. cereus)

Replikasi	Lapang Pandang	Sel Hidup	Sel Mati	Jumlah Total Sel	Viabilitas Sel (%)	Rata-rata (%)
1	1	14	79	93	15.05	23,14
	2	28	53	81	34.57	
	3	16	97	113	14.16	
	4	21	52	73	28.77	
2	1	19	41	60	31.67	25,43
	2	20	53	73	27.40	
	3	14	52	66	21.21	
	4	9	33	42	21.43	
3	1	15	32	47	31.91	29,19
	2	33	84	117	28.21	
	3	20	58	78	25.64	
	4	31	69	100	31.00	
Rata-rata (%)						25,92
Standar Deviasi						3,06

Lampiran C. Analisis data dengan program SPSS

C.1. Normalitas dengan *Saphiro-Wilk*

Case Processing Summary

	kelompok_p erlakuan	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
prosentase_ viabilitas	Kelompok I	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	Kelompok II	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	Kelompok III	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	Kelompok IV	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
	Kelompok V	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%

Tests of Normality

perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
viabilitas Monosit+Media199	.329	3	.	.868	3	.290
Monosit+Media199+B. Cereus	.253	3	.	.964	3	.635
Monosit+Media199+Kopi,gula+B. Cereus	.245	3	.	.970	3	.670
Monosit+Media199+Kopi,gula,krimer+B. Cereus	.341	3	.	.847	3	.232
Monosit+Media199+Kopi,gula,susu+B. Cereus	.230	3	.	.981	3	.734

a. Lilliefors Significance Correction

C.2. Uji Homogenitas dengan Levene

Descriptives

viabilitas

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kelompok I	3	92.5607	1.25047	.72196	89.4543	95.6670	91.66	93.99
Kelompok II	3	8.6043	.23426	.13525	8.0224	9.1863	8.40	8.86
Kelompok III	3	66.6533	1.52775	.88205	62.8582	70.4485	65.30	68.31
Kelompok IV	3	37.7367	2.55346	1.47424	31.3935	44.0798	34.81	39.51
Kelompok V	3	25.9200	3.05462	1.76359	18.3319	33.5081	23.14	29.19
Total	15	46.2950	30.97400	7.99745	29.1422	63.4478	8.40	93.99

Test of Homogeneity of Variances

Viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.642	4	10	.097

C.3. Uji Anova

ANOVA

Viabilitas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13391.837	4	3347.959	845.298	.000
Within Groups	39.607	10	3.961		
Total	13431.444	14			

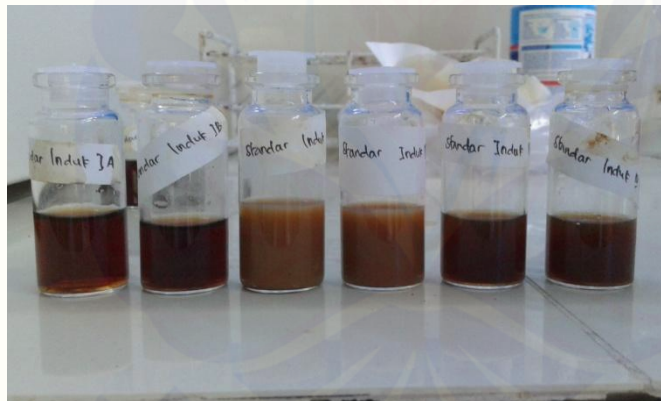
C.4. Uji LSD

Multiple Comparisons

viabilitas
LSD

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Monosit+Media 199	Monosit+ Media 199+ <i>B. Cereus</i>	83.95633*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula+ <i>B. Cereus</i>	25.90733*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula,krimer+ <i>B. Cereus</i>	54.82400*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula,susu+ <i>B. Cereus</i>	66.64067*	1.62495	.000
Monosit+ Media 199+B. <i>Cereus</i>	Monosit+ Media 199	-83.95633*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula + <i>B. Cereus</i>	-58.04900	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula,krimer+ <i>B. Cereus</i>	-29.13233*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula,susu+ <i>B. Cereus</i>	-17.31567*	1.62495	.000
Monosit+ Media 199+Kopi,gula+ <i>B. Cereus</i>	Monosit+ Media 199	-25.90733*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+ <i>B. Cereus</i>	58.04900	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula,krimer+ <i>B. Cereus</i>	28.91667*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula,susu+ <i>B. Cereus</i>	40.73333*	1.62495	.000
Monosit+ Media 199+Kopi,gula,krimer+ <i>B. Cereus</i>	Monosit+ Media 199	-54.82400*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+ <i>B. Cereus</i>	29.13233*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula + <i>B. Cereus</i>	-28.91667*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula,susu+ <i>B. Cereus</i>	11.81667*	1.62495	.000
Monosit+ Media 199+Kopi,gula,susu+ <i>B. Cereus</i>	Monosit+ Media 199	-66.64067*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+ <i>B. Cereus</i>	17.31567*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula + <i>B. Cereus</i>	-40.73333*	1.62495	.000
	Monosit+ Media 199+Kopi,gula,krimer+ <i>B. Cereus</i>	-11.81667*	1.62495	.000

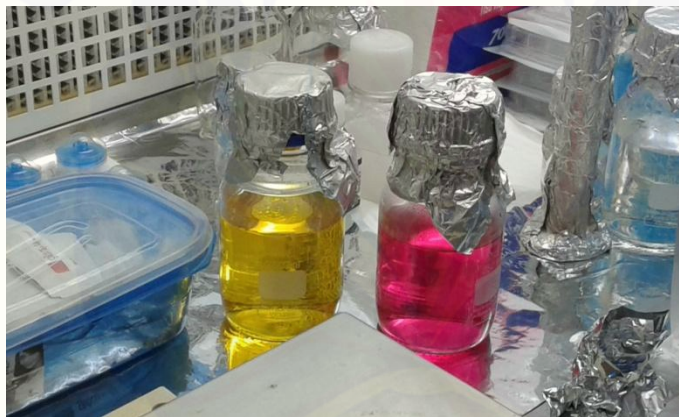
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran D. Dokumentasi Alat dan Bahan**D.1 Hasil penimbangan bahan uji****D.2 Seduhan kopi robusta dengan aditif****D.3 Pengambilan sampel darah**

D.4 Pembuatan bakteri *B.cereus*



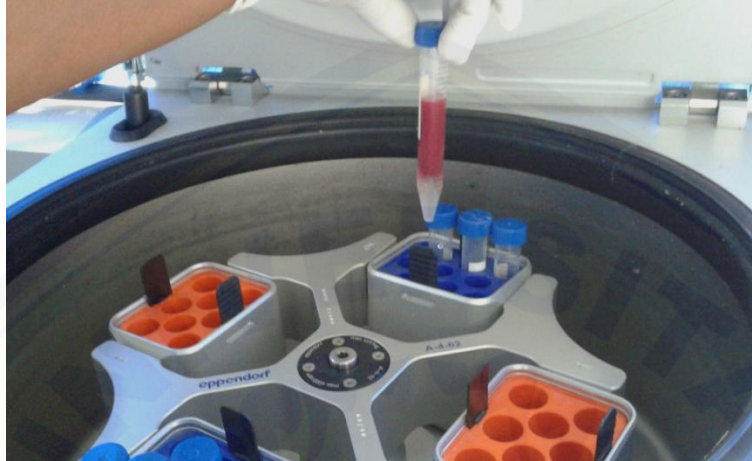
D.5 Pembuatan RPMI dan Media 199



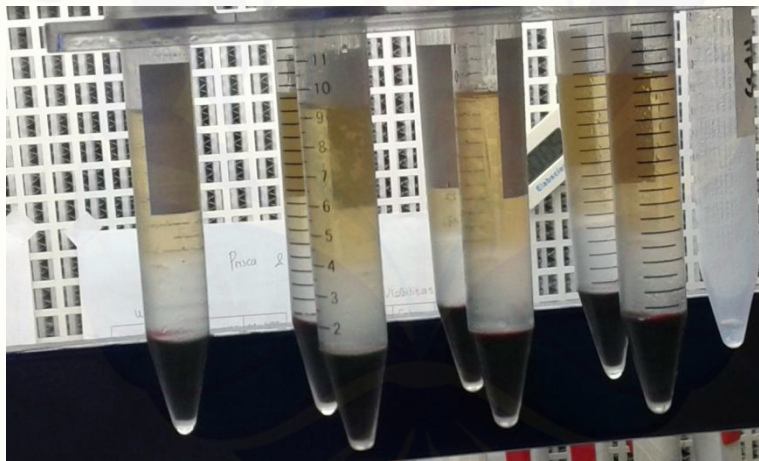
D.6 Tabung falcon berisi darah dan Lymphoprep™



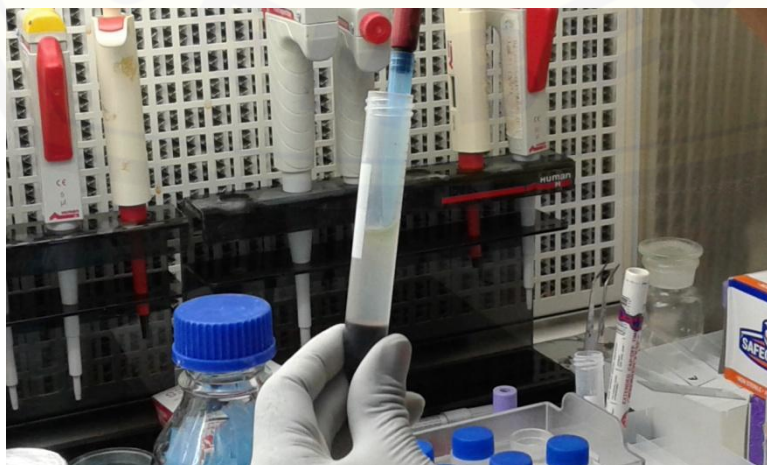
D.7 Tahapan sentrifugasi



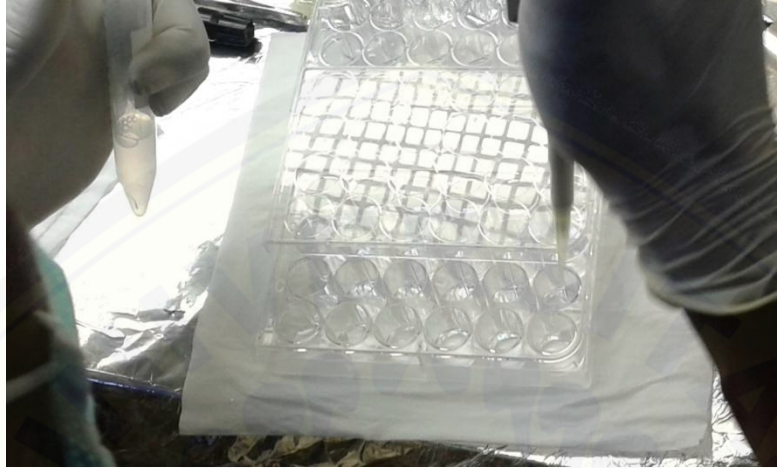
D.8 Hasil sentrifugasi



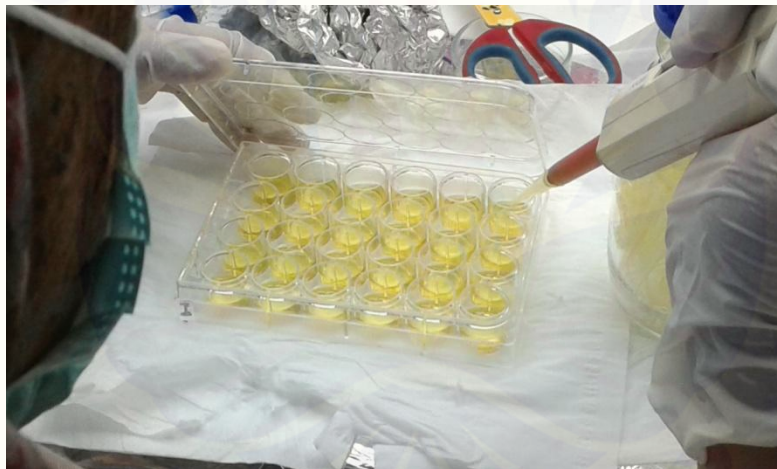
D.9 Pemipetan sel mononuklear



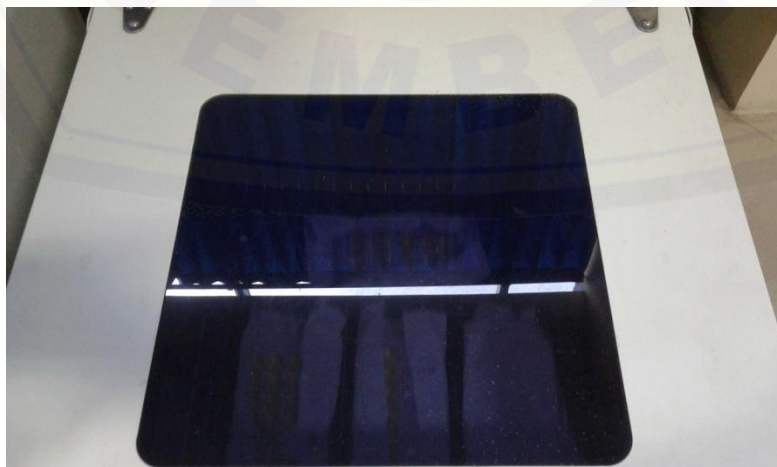
D.10 Menempatkan hasil *supernatant* pada *coverslip* dalam *well culture*



D.11 Menambahkan RPMI ke dalam *well culture*



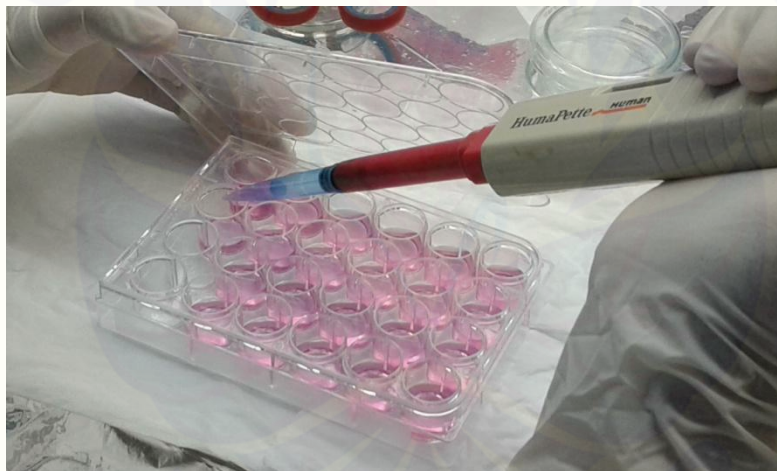
D.12 *Well culture* diinkubasi dalam *incubator shaker*



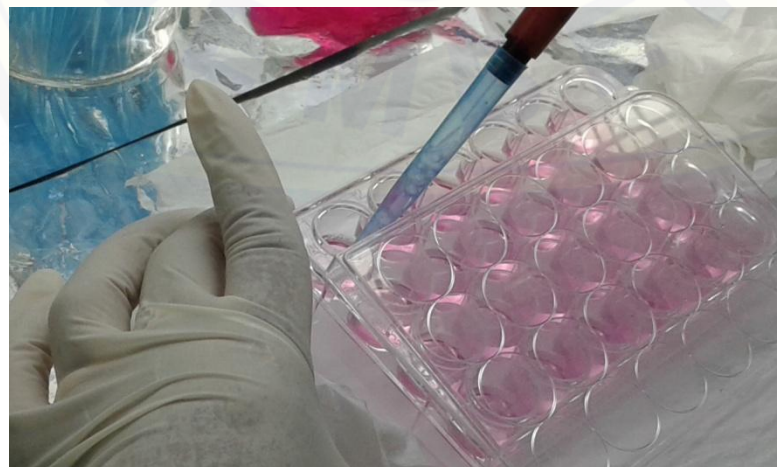
D.13 Penggantian media dengan *Media 199*



D.14 Penambahan seduhan bahan uji ke dalam *well culture*



D.15 Penambahan *B.cereus* ke dalam *well culture*



D.16 Mikroskop *inverted*



D.17 Autoklaf



D.18 *Laminar Air Flow*



D.19 *Media 199*



D.20 RPMI Medium (Roswell Park Memorial Institute)



D.21 HBSS-Hank's Balance Salt Solution

