



EFEKTIFITAS EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) DALAM MENGHAMBAT EFEK TOKSIK SENYAWA NIKEL PADA SEL PBMC

SKRIPSI

Oleh:

Fadylla Nuansa Citra Bening

NIM: 141610101046

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



EFEKTIFITAS EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) DALAM MENGHAMBAT EFEK TOKSIK SENYAWA NIKEL PADA SEL PBMC

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi pada Fakultas Kedokteran Gigi (S-1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Fadylla Nuansa Citra Bening

NIM 141610101046

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah subhanahu wa ta'ala, karena berkat rahmat dan hidayah yang diberikan, penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan lancar.
2. Nabi Muhammad shallallahu 'alaihi wasallam, tauladan umat manusia
3. Orangtua tercinta, Papa Atok Setyo Wiyono dan Mama Endang Lestariningsih yang telah banyak memberikan kasih sayang, dukungan, doa dan pengorbanan tiada henti.
4. Adik tersayang, Eling Shidqi Aswidisukma yang sudah banyak memberikan semangat.
5. Bapak ibu guru sejak penulis bersekolah di taman kanak-kanak hingga SMA yang telah banyak membimbing dan memberikan ilmu kepada penulis.
6. Dosen-dosen di Fakultas Kedokteran Gigi yang telah mendidik dan memberikan ilmunya kepada penulis.
7. Almamater Universitas Jember

MOTTO

“Life is like riding bicycle. To keep your balance, you must keep moving.”
(Albert Einstein)

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

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

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fadylla Nuansa Citra Bening

NIM : 141610101046

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efektifitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) dalam Menghambat Efek Toksik Senyawa Nikel pada Sel PBMC” adalah benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang saya sebut sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Dengan demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa tekanan dan paksaan dari pihak manapun, serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Januari 2019

Yang menyatakan,

Fadylla Nuansa Citra Bening

141610101046

SKRIPSI

EFEKTIFITAS EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) DALAM
MENGHAMBAT EFEK TOKSIK SENYAWA NIKEL PADA SEL PBMC

Oleh:

Fadylla Nuansa Citra Bening

NIM 141610101046

Dosen Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : drg. Dessy Rachmawati, M.Kes, Ph.D

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Yenny Yustisia, M.Biotech

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efektifitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) dalam Menghambat Efek Toksik Senyawa Nikel pada Sel PBMC” karya Fadylla Nuansa Citra Bening telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

Hari, tanggal : Senin, 26 November 2018

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota

Prof. Dr. drg. FX Ady Soesetijo, Sp.Pro.
NIP. 196005091987021001

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

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

drg. Dessy Rachmawati, M.Kes, Ph.D
NIP. 197612232005012001

drg. Yenny Yustisia, M.Biotech
NIP. 197903252005012000

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pro.
NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Efektifitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) dalam Menghambat Efek Toksik Senyawa Nikel pada Sel PBMC; Fadylla Nuansa Citra Bening; 141610101046, 94 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Nikel diketahui merupakan logam paling reaktif dibandingkan dengan logam lain dan dapat menimbulkan sensitisasi di kulit dan mukosa rongga mulut. Ion logam nikel dapat merangsang respon sel-sel imun PBMC. Nikel juga dapat menginduksi kematian sel melalui aktivitas *species oxygen reactive* (ROS) yang bertindak sebagai faktor penting dalam tahap awal terjadinya apoptosis. Apoptosis sel dikarenakan logam nikel dapat dicegah dengan bahan antioksidan yang berasal dari sediaan herbal. Sediaan herbal memiliki efek samping yang minimal serta tersedia secara melimpah. Salah satu bahan herbal yang dapat berperan sebagai antioksidan antara lain adalah biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Ekstrak biji kopi robusta mengandung polifenol dan flavonoid yang merupakan antioksidan kuat dan dapat melindungi sel imun dari kerusakan biologis akibat radikal bebas. Bahan herbal ini dapat diaplikasikan setelah diketahui bioavailabilitasnya melalui uji sitotoksitas. Uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah bahan tersebut dapat diterima oleh tubuh atau tidak. Uji sitotoksitas yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji MTT dan *trypan blue*.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris *in vitro* dengan rancangan penelitian *the posttest group design*. Penelitian ini menggunakan isolat PBMC yang diambil dari darah vena perifer orang sehat yang kemudian dipapar dengan larutan logam $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 125 μM dan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan beragam konsentrasi.

Larutan logam yang digunakan dibuat dengan melarutkan *powder* dalam aquades dan selanjutnya dalam *Iscove's modified Dulbecco's medium* (IMDM) untuk mendapatkan konsentrasi 125 μM yang siap untuk dipaparkan langsung

pada PBMC. Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dibuat menggunakan metode maserasi yang selanjutnya diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan yaitu 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 125 µg/ml. Konsentrasi tersebut didapat setelah dilakukan penelitian pendahuluan, yaitu dengan menggunakan konsentrasi 500 µg/ml, 250 µg/ml dan 125 µg/ml. Konsentrasi ekstrak kopi 500 µg/ml, 250 µg/ml toksik terhadap sel PBMC. Data yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk* dan uji homogenitas *Levene*, dilanjutkan uji parametrik *One Way Anova* dan uji beda *LSD (Least Significance Difference)*. Data yang tidak homogen maupun normal dianalisis dengan uji non-parametrik *Kruskall Wallis* dan uji beda *Mann Whitney*.

Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) efektif dalam menghambat efek toksik senyawa nikel pada sel PBMC. Ekstrak biji kopi robusta dalam konsentrasi paling kecil 31,25 µg/ml yang dipaparkan pada sel PBMC dapat menurunkan efek toksik secara signifikan dari paparan logam nikel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sedangkan pada konsentrasi 125 µg/ml dan 62,5 µg/ml memiliki efek yang tidak begitu kuat dalam menurunkan efek toksik dari nikel karena dengan konsentrasi ekstrak kopi tersebut diketahui memiliki sifat toksik yang tergolong sebagai toksisitas rendah (60-90%).

PRAKATA

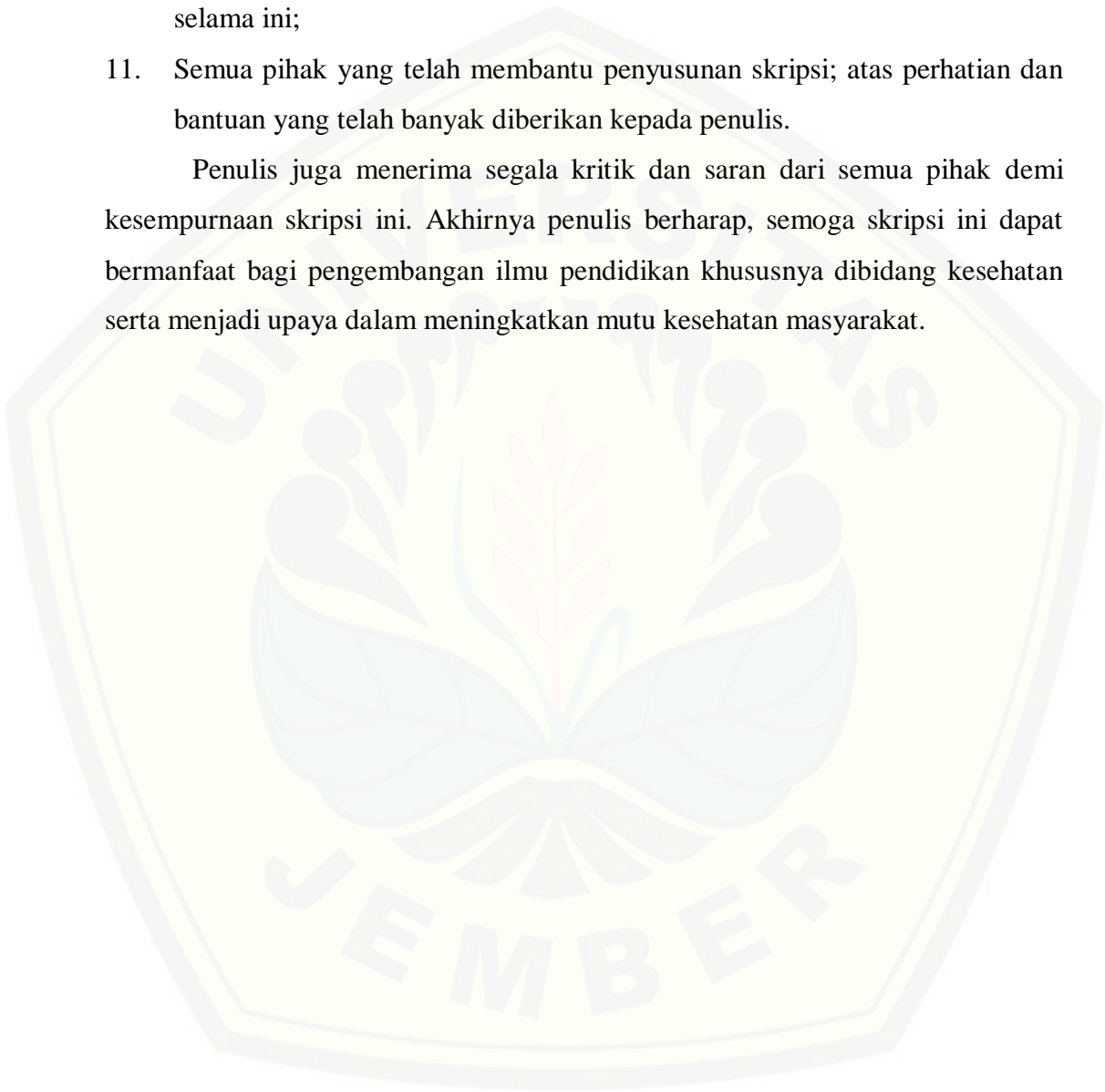
Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efektifitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) dalam Menghambat Efek Toksik Senyawa Nikel pada Sel PBMC”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Allah subhanahu wa ta'ala, yang selalu memberikan kemudahan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini;
2. Orang tua tercinta; Papa Atok Setyo Wiyono dan Mama Endang Lestariningsih yang selalu mendoakan, memberi dukungan, semangat serta mencurahkan kasih sayangnya hingga saat ini;
3. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
4. drg. Dessy Rachmawati, M.Kes, Ph.D dan drg. Yenny Yustisia, M.Biotech selaku dosen pembimbing utama dan dosen pembimbing pendamping skripsi;
5. Prof. Dr. drg. FX Ady Soesetijo, Sp.Pros dan Dr.drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes selaku dosen penguji utama dan dosen penguji anggota skripsi;
6. drg. Rendra Christedy Prasetya, MDSc selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi selama penulis menjadi mahasiswa;
7. Adik tersayang, Eling Shidqi Aswidisukma yang selalu menyemangati dan mendoakan penulis.
8. Seluruh staf di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang membantu dalam penyelesaian administrasi penulisan skripsi ini;

9. Teknisi Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah membantu dalam proses penelitian;
10. Teman-teman seperjuangan FKG Universitas Jember angkatan 2014 “LECI”. Terima kasih atas kebersamaan, dukungan, bantuan dan doa kalian selama ini;
11. Semua pihak yang telah membantu penyusunan skripsi; atas perhatian dan bantuan yang telah banyak diberikan kepada penulis.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan khususnya dibidang kesehatan serta menjadi upaya dalam meningkatkan mutu kesehatan masyarakat.



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 PBMCs (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)	4
2.2 Alloy Logam Nikel	5
2.2.1 Pengertian <i>Alloy</i>	5
2.2.2 <i>Alloy</i> Logam Nikel.....	5
2.3 Respon Sel Rongga Mulut terhadap Paparan Logam.....	8
2.4 Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	15
2.4.1 Taksonomi dan Deskripsi Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	15
2.4.2 Komposisi Kimia Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>).....	16
2.4.3 Manfaat Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	18

2.5 Uji Sitotoksitas	20
2.5.1 MTT	20
2.5.2 Trypan Blue	23
2.5.3 Tingkat Toksisitas.....	24
2.6 Peta Konsep	25
2.8 Keterangan Peta Konsep.....	26
2.9 Hipotesis.....	26
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	27
3.1 Jenis Penelitian	27
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	27
3.2.1 Waktu Penelitian.....	27
3.2.2 Tempat penelitian	27
3.3 Identifikasi Variabel.....	27
3.3.1 Variabel Bebas.....	27
3.3.2 Variabel Terikat.....	27
3.3.3 Variabel Terkendali	28
3.4 Definisi Operasional	28
3.4.1 Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	28
3.4.2 PBMC	28
3.4.3 Larutan Logam Nikel.....	29
3.4.4 Uji Sitotoksitas.....	29
3.5 Alat dan Bahan.....	29
3.5.1 Alat penelitian	29
3.5.2 Bahan penelitian	30
3.6 Sampel Penelitian	31
3.6.1 Kriteria Sampel.....	31
3.6.2 Kelompok Sampel	31
3.6.3 Jumlah Sampel.....	31
3.6.4 Teknik <i>Sampling</i>	32
3.7 Prosedur Penelitian	32
3.7.1 <i>Ethical Clearance</i>	32

3.7.2 Sterilisasi alat	32
3.7.3 Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>) ..	32
3.7.4 Pengambilan sampel darah.....	33
3.7.5 Isolasi PBMC	33
3.7.6 Prosedur Penempelan Sel.....	34
3.7.7 Inkubasi PBMC dengan Logam Nikel.....	34
3.7.8 Inkubasi PBMC dengan Logam Nikel dan Ekstrak Biji Kopi	35
3.7.9 Uji Sitotoksitas dengan <i>Trypan Blue</i>	37
3.7.10 Uji Sitotoksitas dengan MTT	37
3.7.11 Pengamatan Hasil	38
3.8 Analisis Data.....	38
3.9 Alur Penelitian.....	39
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
4.1 Hasil	40
4.2 Pembahasan.....	49
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	56
5.1 Kesimpulan.....	56
5.2 Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tabel periodik unsur.	6
Gambar 2.2 Struktur atom nikel	7
Gambar 2.3 Masuknya Ni (II) ke dalam sel	9
Gambar 2.4 Pembentukan radikal hidroksil oleh reaksi <i>Fenton</i> dan <i>Haber-Weiss</i>	10
Gambar 2.5 Pembentukan ROS selama ledakan fagositosis	12
Gambar 2.6 Jalur caspase dependen (ekstrinsik dan intrinsik)	14
Gambar 2.7 Biji kopi robusta	16
Gambar 2.8 <i>Gallate moieties</i> yang berinteraksi dengan permukaan sel	18
Gambar 2.9 Struktur kimia dari flavonoid	19
Gambar 2.10 Siklus asam sitrat.	22
Gambar 2.11 Struktur molekul <i>trypan blue</i>	24
Gambar 4.1 Hasil pewarnaan <i>trypan blue</i>	40
Gambar 4.2 Hasil pewarnaan <i>trypan blue</i> pada PBMC yang telah diberi berbagai perlakuan	41
Gambar 4.3 Histogram prosentase sel hidup dengan uji <i>trypan blue</i>	42
Gambar 4.4 Hasil uji MTT pada PBMC yang telah diberi perlakuan	45
Gambar 4.5 Histogram Prosentase Sel Hidup dengan Uji MTT	46

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi Kimia dari Biji Kopi Robusta	17
Tabel 4.1 Hasil Prosentase Sel Hidup dengan Uji <i>Trypan Blue</i>	42
Tabel 4.2 Hasil Uji Normalitas <i>Saphiro wilk</i>	43
Tabel 4.3 Hasil Uji Homogenitas <i>Levene-test</i>	43
Tabel 4.4 Hasil Uji Parametrik <i>One Way Anova</i>	44
Tabel 4.5 Hasil Uji Beda LSD (<i>Least Significance Difference</i>).....	44
Tabel 4.6 Hasil Prosentase Sel Hidup dengan Uji MTT	46
Tabel 4.7 Hasil Uji Normalitas <i>Saphiro wilk</i>	47
Tabel 4.8 Hasil Uji Homogenitas <i>Levene-test</i>	47
Tabel 4.9 Hasil Uji Non-Parametrik <i>Kruskall Wallis</i>	48
Tabel 4.10 Hasil Uji Beda <i>Mann Whitney</i>	48

DAFTAR LAMPIRAN

A. Surat Keterangan	64
B. Alat dan Bahan Penelitian	68
C. Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>).....	76
D. Isolasi PBMC	78
E. Hasil Penelitian Pendahuluan	81
F. Hasil Penelitian	85
G. Analisis Data.....	88

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perawatan kedokteran gigi dikenal menggunakan banyak jenis dari material logam, salah satunya adalah nikel. Mahkota dan jembatan paduan nikel atau biasa disebut *alloy* nikel di Amerika dibuat sebanyak 15 juta restorasi, dengan total penggunaan mencapai 4-5 juta per tahun (Wataha *et al.*, 2013). *Alloy* masih digunakan di kedokteran gigi untuk beberapa alasan, seperti ketahanannya terhadap korosi dan harganya yang murah (Rachmawati *et al.*, 2013). Nikel diketahui merupakan logam paling reaktif dibandingkan dengan logam lain dan dapat menimbulkan sensitisasi di kulit dan mukosa rongga mulut (Hosoki dan Nishigawa, 2011). *Nickel (II) sulfate* memiliki sensitivitas paling tinggi dan mempengaruhi kira-kira 15% dari populasi masyarakat Amerika, diikuti *cobalt chloride* dan *potassium dichromate*, yang mempengaruhi 5% dan 3% dari keseluruhan populasi Amerika (Saito *et al.*, 2016).

Alloy di dalam mulut berinteraksi dengan lingkungan yang kurang kondusif menyebabkan peningkatan pelepasan ion logam. Ion logam yang dilepaskan berkontak dengan epitel dan mukosa rongga mulut. Ion logam nikel tersebut dapat merangsang respon sel-sel imun *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) (Rachmawati *et al.*, 2013). PBMC merupakan bagian dari sel-sel darah yang beinti bulat dan terdiri dari sel monosit, sel T, sel B, sel *Natural Killer* (NK) serta sel dendritik (Končarević *et al.*, 2014).

Nikel juga dapat menginduksi kematian sel melalui aktivitas *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang bertindak sebagai faktor penting dalam tahap awal terjadinya apoptosis (Birben *et al.*, 2012). Jumlah antioksidan di dalam tubuh yang terbatas belum mampu mengeliminasi ROS. Konsentrasi jumlah ROS yang berlebih akan menyebabkan stress oksidatif yang pada akhirnya dapat memicu apoptosis (Guo *et al.*, 2016).

Kematian sel dikarenakan paparan logam nikel dapat dicegah dengan bahan antioksidan yang berasal dari sediaan herbal. Sediaan herbal digunakan karena efek sampingnya yang sedikit serta ketersediaannya yang melimpah (Khotimah dan Muhtadi, 2008). Sediaan herbal yang dapat berperan sebagai antioksidan antara lain adalah biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Kopi merupakan tumbuhan yang banyak ditemukan di kota Jember serta merupakan sentra produksi terbanyak (Ermawati, 2015). Kopi robusta mendominasi lebih dari 90% dari areal pertanaman kopi Indonesia (Prastowo *et al.*, 2010). Rata-rata konsumsi kopi perorangan mencapai 2,91 kg/tahun dengan rata-rata konsumsi kopi laki-laki sebesar 3,83 kg/tahun dan perempuan yaitu sebesar 1,97 kg/tahun (Lestari *et al.*, 2009). Ekstrak biji kopi robusta mengandung polifenol dan flavonoid yang merupakan antioksidan kuat dan dapat melindungi sel imun dari kerusakan biologis akibat radikal bebas (Ermawati, 2015). Sifat tersebut diharapkan dapat mengurangi kematian sel setelah pengaplikasiannya.

Bahan obat herbal memerlukan uji sitotoksitas sebelum dapat diaplikasikan. Uji ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui apakah bahan tersebut telah memenuhi syarat biokompatibilitas yang dapat diterima oleh tubuh atau tidak (Nirwana, 2005). Uji sitotoksitas yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan uji MTT dan *trypan blue*.

Penelitian mengenai potensi ekstrak kopi robusta dalam menghambat kematian sel dikarenakan paparan logam nikel, sepengetahuan peneliti belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, perlu untuk dilakukan penelitian yang lebih lanjut tentang hal tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Apakah ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) efektif dalam menghambat efek toksik senyawa nikel pada PBMC?
2. Berapa konsentrasi optimal ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dalam menghambat efek toksik senyawa nikel pada PBMC?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Peneliti mengetahui efektifitas ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dalam menghambat efek toksik senyawa nikel pada PBMC.
2. Peneliti mengetahui konsentrasi optimal ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dalam menghambat efek toksik senyawa nikel pada PBMC.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Peneliti mengetahui manfaat ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dalam menghambat efek toksik senyawa nikel pada PBMC.
2. Bahan kajian dan panduan untuk penelitian selanjutnya, sehingga diharapkan dapat digunakan sebagai dasar menentukan konsentrasi paparan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang tepat terhadap PBMC. Penelitian lanjutan tersebut diharapkan dapat mengkaji lebih mendalam manfaat ekstrak biji kopi robusta sebagai antioksidan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)*

Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) merupakan bagian dari sel-sel darah yang berinti bulat. PBMC terdiri dari sel monosit (10-20%), sel T (50-70%), sel B (5-15%), sel *Natural Killer* (NK) (2-10%), dan sel dendritik. PBMC memainkan peranan penting dalam sistem kekebalan tubuh dan memicu terjadinya respon inflamasi (Končarević *et al.*, 2014). PBMC beredar di dalam tubuh untuk mengantisipasi kelainan yang merangsang kerja sistem kekebalan tubuh. PBMC ditargetkan untuk menghilangkan patogen potensial yang memicu kelainan tersebut. Aktivitas inflamasi dapat menyebabkan efek samping dan dalam jangka waktu yang lama dapat menjadi parah. Aktivasi inflamasi melibatkan beberapa fungsi biologis seperti migrasi leukosit, proliferasi sel T, respons interferon, pensinyalan NF- κ B dan regulasi kematian sel (Haudek-Prinz *et al.*, 2012).

Sel-sel tersebut masing-masing memiliki fungsi yang berbeda. Sel T merupakan bentuk sel darah putih (limfosit) yang berfungsi mencari jenis penyakit patogen dan merusaknya. Sel T penting dalam membantu tipe sel lain dalam sistem imun (Fatmah, 2006). Monosit bertindak sebagai regulator penting aktivitas sel T. Sel monosit menjadi aktif setelah bertemu dengan patogen potensial dan berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag memfagositosis dan menghasilkan protein pada permukaan sel yang dapat menginduksi pengaktifan sel T. Sel T yang diaktivasi selanjutnya dapat mengaktifkan sel endotel, fibroblas dan monosit/makrofag (Haudek-Prinz *et al.*, 2012).

PBMC banyak digunakan sebagai indikator beberapa penyakit karena adanya respon PBMC saat berkontak dengan sel-sel terinfeksi. PBMC diperoleh relatif mudah dari sampel darah pasien. Sel-sel ini dapat berkontak langsung pada protein plasma sel yang sesuai (Končarević *et al.*, 2014). PBMC banyak digunakan dalam penelitian dan aplikasi klinis seperti dalam bidang mikrobiologi, virologi, onkologi, pengembangan vaksin, transplantasi dan biologi regeneratif dan toksikologi (Warnasih *et al.*, 2016)

2.2 Alloy Logam Nikel

2.2.1 Pengertian Alloy

Logam yang digunakan di kedokteran gigi sebagai bahan restorasi tidak menggunakan logam tunggal, karena jika digunakan kurang memenuhi syarat fisis, mekanis, biologis, kimia dan estetis. Sifat tersebut dapat diperbaiki dengan mencampur dua atau lebih logam yang berbeda. Logam campur atau paduan tersebut disebut *alloy* (Rachmawati *et al.*, 2013). *Alloy* pengganti logam mulia harus memenuhi atau mendekati persyaratan American Dental Assosiation Spesification (ADAS) nomor 5 yaitu merupakan *alloy* sederhana, terdiri dari campuran tiga macam logam utama (*ternary alloy*), suhu pengecoran relatif rendah dan kemampuan cor yang baik, serta harganya relatif murah (Soesetijo, 2012).

2.2.2 Alloy Logam Nikel

Nikel merupakan logam transisi berwarna putih keperakan yang berada pada periode ke-4, grup 10 dalam sistem periodik unsur (Wataha *et al.*, 2013) (Gambar 2.1). Nikel jarang ditemukan dalam bentuk logam murni di alam, tetapi nikel banyak ditemukan dalam campuran kimia dan mineral dinamakan bijih. Bijih nikel berwarna hijau atau merah (Sparrow, 2015).

Atom nikel terdiri dari partikel yang lebih kecil, yaitu proton, neutron dan elektron. Inti atom terdiri dari proton dan neutron. Proton memiliki muatan listrik positif. Neutron tidak memiliki muatan namun memiliki massa atom sama dengan proton. Partikel lebih kecil dan mengorbit inti atom dinamakan elektron. Elektron tidak memiliki massa tetapi memiliki muatan listrik negatif sama dengan muatan positif proton. Atom secara keseluruhan membawa muatan listrik. Jumlah dari elektron dan proton pada atom selalu sama. Nikel memiliki 28 proton yang ditahan di inti atom dan 28 elektron mengorbit disekitarnya. Setiap elemen memiliki jumlah proton dan elektron yang spesifik. Ini dinamakan nomor atom (Sparrow, 2015). Nikel memiliki nomor atom 28 dan konfigurasi elektron terluarnya adalah $4s^1 3d^9$, sehingga menjadikan nikel sebagai unsur yang cukup reaktif (Wataha, *et al.*, 2013).

Periodic Table of the Elements

Normal boiling points are in °C.
SP = Triple Point.
Pressure is listed if not 1 atm.
Allotrope is listed if more than one allotrope.

Atomic Number	Symbol	Name	Atomic Mass
28	Ni	Nickel	58.693

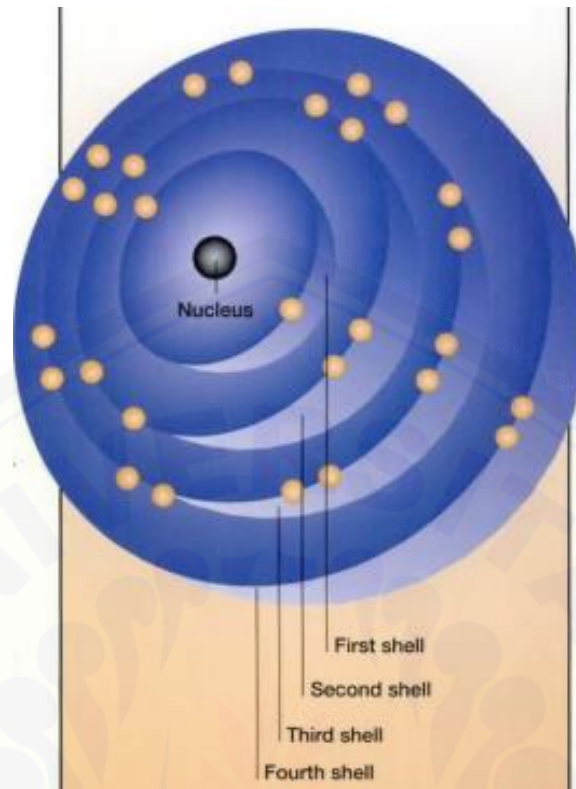
Legend:

- Alkali Metal
- Alkaline Earth
- Transition Metal
- Basic Metal
- Semimetal
- Nonmetal
- Halogen
- Noble Gas
- Lanthanide
- Actinide

© 2014 Todd Helmenstein
www.ck12.org

Gambar 2.1 Tabel Periodik Unsur. Nikel berada pada periode 4 grup 10 (Sumber: *sciencenotes.org*)

Nikel merupakan logam transisi seperti besi dan tembaga. Semua logam transisi memiliki dua elektron pada kulit terluarnya. Kulit terluar atom nikel dapat menampung paling banyak 8 partikel. Atom nikel kehilangan dua elektron terluarnya selama terjadinya reaksi nikel. Nikel kemudian berikatan dengan elemen lain yang dapat menerima elektron (Sparrow, 2015) (Gambar 2.2). Ion Ni (II) kemudian membentuk senyawa kompleks dengan ligan karena ion ini mempunyai orbital d yang belum terisi penuh oleh electron (King dalam Christianti, 2012). Nikel dalam reaksinya dengan unsur lain dapat menyebabkan reaksi oksidasi pada keadaan +2 (Ni(II)Cl_2). Konsentrasi ion klorida yang tinggi menyebabkan nikel dapat mudah terkorosi di lingkungan rongga mulut (Wataha *et al.*, 2013).



Gambar 2.2 Setiap atom nikel mengandung 28 elektron yang mengorbit inti proton dan neutron yang kecil dan padat. Elektron menempati 4 kulit di sekitar nukleus, 2 bagian terluarnya tidak lengkap. Kulit pertama memiliki 2 elektron dan yang kedua memiliki delapan. Kulit ketiga memiliki 16 dari 18 ruang yang seharusnya terisi, kulit keempat dan terluar memiliki 2 dari 8 ruang yang ditempati (Sumber: Sparrow, 2015).

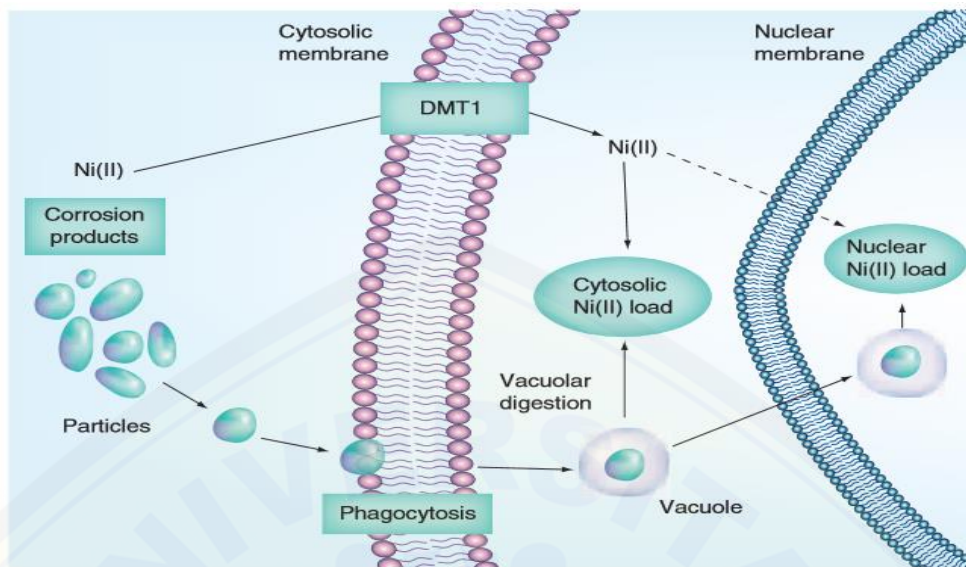
Nikel adalah elemen esensial yang penggunaannya sangat penting dalam kedokteran gigi. Nikel dasar (tidak murni) digunakan pada industri kedokteran gigi untuk semua perawatan restoratif (*fillings*, mahkota, jembatan, gigi tiruan sebagian) dan perawatan ortodontik (*wires*, *bands*, braket dan lain sebagainya) (Rachmawati *et al.*, 2013). Berat rata-rata atom nikel adalah 58,69 g/mol, dan densitasnya 8,9 g/cm³ menjadikannya lebih ringan dibandingkan logam lain di kedokteran gigi. Mahkota dan jembatan paduan nikel dibuat sebanyak 15 juta restorasi, dengan penggunaan 4-5 juta pertahun pada tahun 2007 di Amerika Serikat (Wataha, *et al.*, 2013). Nikel masih digunakan di kedokteran gigi oleh karena ketahanannya terhadap korosi dan harganya yang murah. Restorasi dan *casting alloy* berbahan dasar nikel yang digunakan dalam jangka waktu yang lama masih menjadi kontroversi oleh karena beberapa pengaruhnya yang merugikan,

seperti sifatnya yang reaktif dan banyak menimbulkan reaksi sensitivitas yang dapat berlanjut alergi pada manusia (Rachmawati *et al.*, 2013).

2.3 Respon Sel Rongga Mulut terhadap Paparan Logam

Ni (II) dapat memediasi terjadinya perubahan seluler. Perubahan seluler tersebut diawali dengan lepasnya ion logam Ni (II) dan ion lainnya melalui korosi. Korosi *alloy* nikel terjadi ketika *alloy* terpapar oleh gaya intraoral rongga mulut, seperti pada gaya yang timbul saat menyikat gigi, gaya yang disebabkan kekuatan gigi yang berseberangan selama mengunyah atau ketika *alloy* terpapar dengan asam makanan atau biofilm. Korosi terjadi ketika lapisan oksida permukaan *alloy* nikel terganggu. Produk korosi dapat meliputi partikulat atau ion, khususnya ion Ni (II). Ion Ni terakumulasi di jaringan yang berkontak dengan nikel dan menyebabkan inflamasi gingiva pada jaringan inang tersebut. Ion Ni juga terlepas saat terjadi akumulasi ion logam pada biofilm bakteri yang menutupi protesa (Wataha *et al.*, 2013). Ion logam yang dilepaskan kemudian berkontak dengan epitel dan mukosa rongga mulut dan merangsang respon sistem imun non-spesifik (Rachmawati *et al.*, 2013).

Ion logam nikel dapat merangsang respon sistem imun non-spesifik melalui ikatan antigen logam dengan reseptor TLR4 yang selama ini dikenal merupakan reseptor untuk lipopolisakarida (LPS) (Rachmawati *et al.*, 2013). Ni (II) dari senyawa Ni seperti Ni sulfat, Ni klorida atau Ni asetat kemudian masuk ke sel melalui transporter logam divalen (DMT1), yang berperan dalam mengangkut besi atau mangan. Mekanisme kedua melalui difusi langsung, namun jumlah Ni yang mencapai sitoplasma melalui rute ini tergolong sedikit. Fagositosis senyawa Ni yang tidak larut diperkirakan menyebabkan konsentrasi Ni (II) di daerah intraseluler menjadi lebih tinggi. Setelah difagositosis, partikel-partikel logam ini dicerna oleh vakuola untuk selanjutnya dikirim ke nukleus (Wataha *et al.*, 2013) (Gambar 2.3).

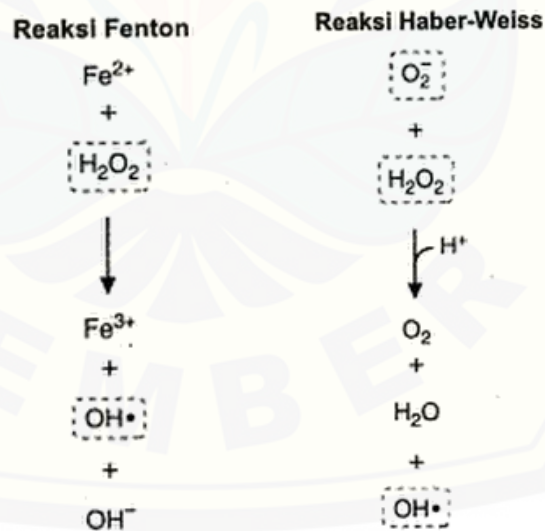


Gambar 2.3. Ni (II) diangkut ke dalam sel melintasi membran sitosol melalui transporter DMT1 yang digunakan untuk mengangkut ion seperti Mg (II) dan Ca (II). Muatan intraseluler Ni (II) yang sangat besar terbentuk ketika senyawa yang mengandung nikel seperti Ni_3S_2 atau NiO difagositosis kemudian dicerna oleh vakuola. Kemampuan senyawa nikel untuk masuk dan konsentrasi Ni (II) intraseluler yang relatif tinggi merupakan penyebab sifat karsinogenik dari senyawa nikel yang dimediasi perubahan epigenetik. Muatan permukaan, ukuran dan bentuk partikel menentukan kemampuan fagositosis dan sifat karsinogenisitasnya (Sumber: Wataha *et al.*, 2013)

Logam nikel dapat merangsang respon imun non-spesifik (Schmidt *et al.*, 2010). Sistem imun non-spesifik adalah proteksi tubuh di garis pertahanan pertama untuk melawan patogen. Mukosa rongga mulut memainkan peranan penting dalam menyediakan pertahanan untuk menjaga tubuh tetap dalam kondisi baik. Saliva rongga mulut mengandung mukus, enzim dan gen berbagai anti-bakteri yang berfungsi sebagai *barrier* (pertahanan). Komponen selular dari imunitas non-spesifik antara lain sel-sel fagosit seperti neutrofil dan monosit/makrofag, sel dendritik, sel mast, basofil, eosinofil dan sel NK (*Natural Killer*). Sel-sel ini mengetahui adanya patogen dengan berbagai reseptor berbeda untuk selanjutnya berperan dalam mengeliminasi patogen (Rachmawati *et al.*, 2013).

Nikel juga dapat menginduksi kematian sel melalui aktivitas *species oxygen reactive* (ROS) yang bertindak sebagai faktor penting dalam tahap awal

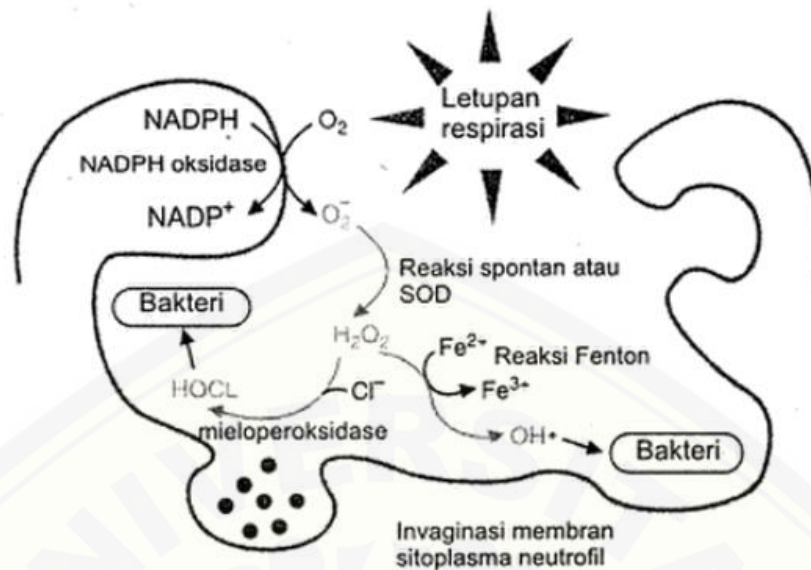
terjadinya apoptosis (Birben *et al.*, 2012). ROS dapat menginduksi stres oksidatif secara *in vitro* dan *in vivo* (Guo *et al.*, 2016). ROS merupakan metabolit oksigen yang dihasilkan melalui reduksi satu-elektron oksigen. Macam dari ROS antara lain adalah superoksida (O_2^-), radikal bebas hidroksil (OH^\cdot), dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikal bebas mampu bereaksi bebas pada setiap molekul yang berkontak dengannya, menarik elektron dan membentuk radikal bebas yang baru dalam reaksi berantai oksidatif sitotoksik (Marks *et al.*, 2000). ROS akan menarik elektron dari senyawa disekitarnya dan mengubah senyawa tersebut menjadi rantai radikal bebas yang baru. Reaksi ini dinamakan *chain reaction* (Sayuti dan Yenrina, 2015). Radikal hidroksil merupakan ROS yang menjadi inisiator dalam membentuk peroksida lemak dan radikal organik. Hidrogen peroksida merupakan zat pengoksidasi yang berikatan dengan logam transisi dan menghasilkan radikal hidroksil melalui reaksi *Fenton*. Hidrogen peroksida dapat menimbulkan kerusakan di membran lokal yang mengandung Fe^{2+} . O_2^\cdot juga dapat menghasilkan radikal hidroksil dan hidroperoksi yang lebih reaktif melalui reaksi dengan hidrogen peroksida dalam reaksi *Haber-Weiss* (Marks *et al.*, 2000) (Gambar 2.4).



Gambar 2.4 Pembentukan radikal hidroksil oleh reaksi Fenton dan Haber-Weiss. Dalam versi yang disederhanakan dari reaksi ini seperti diperlihatkan disini, pemindahan elektron tunggal menghasilkan radikal hidroksil. Spesies oksigen reaktif diperlihatkan dalam kotak warna abu-abu. Logam lain misalnya Cu^+ , juga dapat berfungsi sebagai donor elektron tunggal dalam reaksi Fenton (Sumber: Marks *et al.*, 2000)

ROS yang terbentuk dapat menyebabkan kerusakan DNA dan peroksidasi lipid pada ikatan lemak membran sel (Guo *et al.*, 2016). ROS dapat menyebabkan pembentukan radikal bebas lemak dan peroksida lemak yang memicu cedera sel. Reaksi ini membutuhkan satu inisiator, misalnya radikal hidroksil. Peroksidasi dimulai dengan ekstraksi atom hidrogen yang mengandung satu elektron dari ikatan rangkap terkonjugasi dalam asam lemak. Radikal hidroksil terbentuk dari hidrogen peroksida yang diperantai oleh Fe^{2+} . Jumlah radikal hidroksil diperbanyak dengan penambahan oksigen untuk membentuk radikal peroksil lemak dan peroksida lemak. Asam lemak utama yang mengalami peroksidasi lemak di dalam membran sel adalah asam lemak *polyunsaturated*. Peroksidasi lemak ini menyebabkan terjadinya degradasi lemak dan membentuk malondialdehida, etana dan pentana. Peroksida lemak menyebabkan membran secara alami menghancurkan dirinya sendiri. Aldehida yang terbentuk dapat menimbulkan ikatan-silang pada protein. Lapisan lemak yang rusak akan menyebabkan kerusakan struktural dari sel. Permeabilitas sel yang meningkat akan menyebabkan masuknya Ca^{2+} dan mencetus kerusakan mitokondria lebih lanjut (Marks *et al.*, 2000).

ROS dibentuk selama ledakan pernapasan fagositik oleh makrofag, neutrofil dan eosinofil dan berperan sebagai respons terhadap agen infeksius atau rangsangan lain (Gambar 2.5). ROS yang terbentuk yaitu anion superoksida, hidrogen peroksida, radikal hidroksil dan hipoklorit (HOCL), nitrogen monoksida (NO) dan radikal bebas lainnya. NADPH oksidase diaktifkan pada sisi sebelah luar membran plasma. Aktivasi dari NADPH oksidase akan mencetuskan ledakan pernapasan disertai pembentukan superoksida. Membran plasma membentuk invaginasi selama terjadinya fagositosis, sehingga superoksida dapat bebas ke dalam ruang vakuol. Anion superoksida menghasilkan spesies reaktif lain, termasuk H_2O_2 dan radikal hidroksil. Mieleperoksidase yang merupakan enzim dengan kandungan Fe-hem dan terdapat di dalam granula neutrofil, disekresikan ke dalam vakuol. Vakuol merupakan tempat enzim tersebut membentuk HOCL dan halida lainnya. Hasil dari reaksi ini adalah serangan terhadap membran dan senyawa lain (Marks *et al.*, 2000).



Gambar 2.5 Pembentukan spesies oksigen reaktif selama ledakan pernapasan fagositik oleh makrofag, neutrofil dan eosinofil yang diaktifkan. Pengaktifan NADPH oksidase, yang diperkirakan terjadi di sisi sebelah luar membran plasma, mencetuskan ledakan pernapasan disertai pembentukan superoksida. Selama fagositosis, membran plasma membentuk invaginasi, sehingga superoksida dibebaskan ke dalam ruang vakuol. Anion superoksida (baik secara spontan atau secara enzimatis melalui superoksida dismutase) menghasilkan spesies reaktif lain, termasuk H_2O_2 dan radikal hidroksil. Mieloperoksidase, suatu enzim yang mengandung Fe-hem dan terdapat di dalam granula neutrofit, disekresikan ke dalam vakuol, tempat enzim tersebut membentuk HOCl dan halide lainnya. Hasilnya adalah serangan terhadap membran dan senyawa lain dari sel bakteri, dan akhirnya lisis bakteri. Proses keseluruhan disebut sebagai ledakan pernapasan karena hanya berlangsung 30-60 menit, dan memerlukan O_2 (Sumber: Marks *et al.*, 2000)

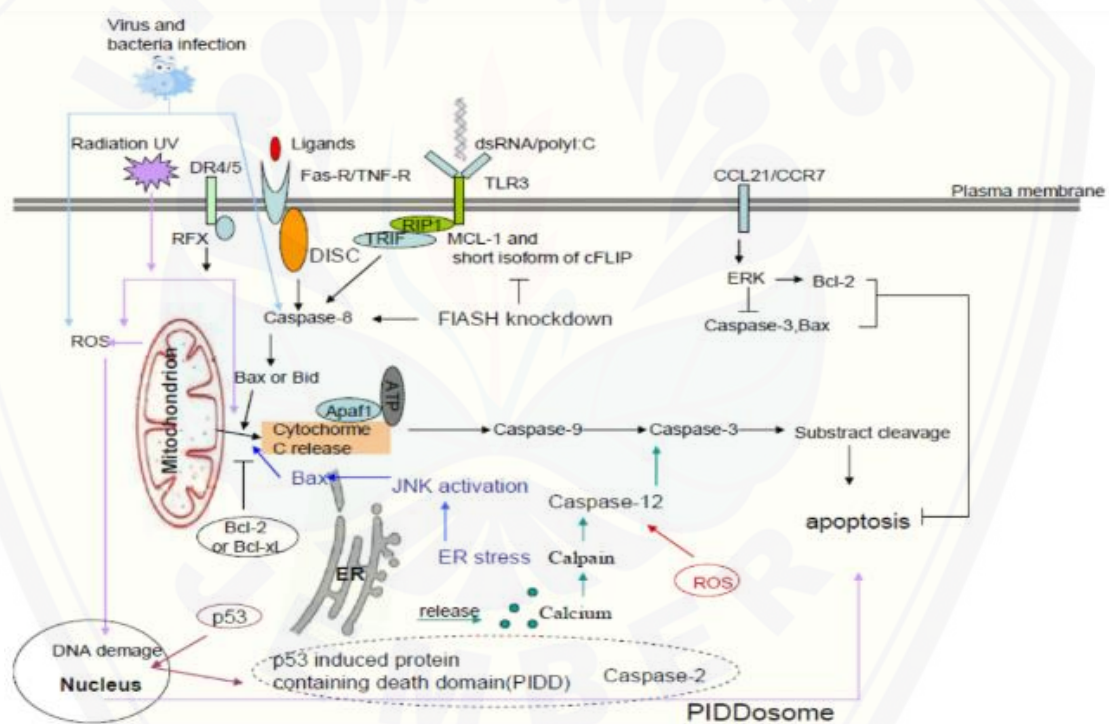
ROS sebenarnya merupakan salah satu jenis radikal bebas yang dibutuhkan dalam proses fisiologis, namun dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan stres oksidatif (Birben *et al.*, 2012). Jumlah antioksidan yang terbatas dalam tubuh juga merupakan salah satu penyebab utama terjadinya peningkatan ROS. *Superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT), *glutathione reductase* (GR), *glutathione peroxidase* (GSH-Px) dan *glutathione-S-transferase* (GST) dan GSH merupakan molekul antioksidan yang diperlukan tubuh. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa $NiCl_2$ dapat menurunkan sistem antioksidan. $NiSO_4$ dapat menurunkan tingkat GSH dan aktivitas SOD serta GSH-Px (Guo *et al.*, 2016).

Apoptosis adalah proses bunuh diri sel yang mengarah pada penghancuran sel dan pembuangan oleh makrofag, sel dendritik serta fagosit (Botto, 2004). Mekanisme apoptosis sangat kompleks dan rumit. Apoptosis dibagi menjadi empat tahap, yakni adanya sinyal kematian (penginduksi apoptosis) yang bersifat fisiologis (hormon dan sitokin), biologis (virus, bakteri, parasit), kimia (obat), atau fisik (radiasi dan toksin). Tahap awal apoptosis ditandai ekspresi *Phosphatidyl serine* (PS) yang keluar dari lapisan dalam ke lapisan luar membran sel (Sari, 2018). Paparan PS merangsang sinyal fagositosis sel (Botto, 2014). Tahap kedua adalah tahap integrasi atau pengaturan yang terdiri dari transduksi signal dan induksi gen apoptosis yang berhubungan). Tahap selanjutnya adalah tahap pelaksanaan apoptosis yakni terjadi perubahan morfologi dan kimia pada sel (degradasi DNA, pembongkaran sel serta pembentukan badan apoptotik). Tahap terakhir adalah tahap fagositosis atau eliminasi oleh makrofag, dendritik atau sel yang berdekatan dengan sel apoptosis. Peristiwa apoptosis melibatkan adanya pepadatan inti sel, pepadatan dan pembagian sitoplasma ke dalam selaput ikat badan apoptotik, dan kerusakan kromosom ke dalam fragmen yang berisi berbagai nukleosom (Sari, 2018).

Partikel nikel dapat meningkatkan ekspresi Fas, FADD, DR 3 dan *caspase-8* serta ditemukan pembentukan DISC. Partikel nikel dapat meningkatkan ekspresi protein dan aktivasi dari *caspase -3, -6, -9*. Nikel dapat menurunkan ekspresi protein Bcl-2 dan meningkatkan ekspresi protein Bax. Kompleks protein Bcl-2 berperan penting dalam modulasi membran terluar mitokondria (Guo *et al.*, 2016). Protein keluarga Bcl-2 dibagi menjadi dua kelompok: protein anti-apoptosis dan protein pro-apoptosis. Protein anti-apoptosis terdiri dari Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bcl-B, A1 dan Mcl-1, sedangkan protein pro-apoptosis terdiri dari Bax, Bak dan Bok. Sebagian besar sel mengandung berbagai protein keluarga BCL-2 pro dan anti-apoptosis. Keseimbangan antara protein pro-dan anti-apoptosis Bcl-2 difungsikan untuk mengatur apakah sel tetap hidup atau justru mengalami apoptosis. Kebanyakan protein keluarga Bcl-2 pro-apoptosis seperti Bid, Bax dan Bad ditemukan di sitosol. Protein Bcl-2 dan Bcl-XL anti-apoptosis terlokalisasi di OMM dan membentuk heterodimer dengan Bax, Bim, Bak dan

Bad sehingga mampu menghambat sifat pro-apoptosis protein tersebut (Dutordoir *et al.*, 2016).

Apoptosis tergantung mitokondria melibatkan kompleks pori permeabilitas mitokondria (MPTP). Kompleks MPTP terdiri dari *cyclophilin D* yang merupakan molekul *chaperone* dalam matriks mitokondria yang terikat pada *adenine-nucleotide – translocator* (ANT) pada *inner mitochondrial membrane* (IMM), yang berinteraksi dengan *voltage dependent-anion-channel* (VDAC) di *outer mitochondrial membrane* (OMM). Peningkatan permeabilitas membran mitokondria luar (MOMP) mempengaruhi pelepasan sitosol protein pro-apoptosis seperti sitokrom *c*, *apoptosis inducing factor* (AIF), endonuklease G (endo G) (Dutordoir *et al.*, 2016) (Gambar 2.6)



Gambar 2.6 Jalur *Caspase* Dependen (Ekstrinsik dan Intrinsik). Mitokondria dan organel nukleus memegang peranan penting dalam tipe apoptosis ini. Organel ini dapat menghubungkan sinyal yang berbeda untuk aktivasi *caspase* sehingga terjadi perubahan pada senyawa oksigen reaktif, sitokrom *c*, dan membran potensial mitokondria. Selain jalur mitokondria, ligan eksternal juga dapat mengaktifkan ERK yang dilanjutkan dengan rangkaian aktivitas *caspase* (Sumber: Sari, 2018)

Saat sitokrom c dan *apoptosis inducing factor* (AIF) dilepaskan ke sitoplasma, protein ini dapat mengaktifkan jalur aktivasi caspase. Pelepasan tersebut diatur oleh famili Bcl-2 yang terikat dengan mitokondria, yaitu Bax dan Bad. Sitokrom c yang keluar ke sitoplasma kemudian berikatan dengan Apaf-1 membentuk *Caspase Recruitment Domain* (CARD). Beberapa CARD bergabung membentuk kompleks apoptosom kemudian mengikat pro-caspase-9 dan mengaktifkannya menjadi *caspase-9* (*caspase* inisiator). *Caspase-9* ini akan mengaktifkan *procaspase-3* menjadi *caspase-3* yang merupakan *caspase* efektor yang melaksanakan apoptosis (Sari, 2018) (Gambar 2.6). AIF dan Endo G bertranslokasi ke dalam nukleus. AIF dapat berikatan langsung dengan DNA yang menyebabkan kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA (Dutordoir *et al.*, 2016).

2.4 Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kopi (*coffea spp*) adalah spesies tanaman berbentuk pohon yang termasuk dalam family *Rubiaceae* dan genus *Coffea* (Najiyati dan Danarti, 2001). Famili tersebut memiliki banyak genus, yaitu *Gardenia*, *Ixora*, *Cinchona*, dan *Rubia*. Genus *Coffea* mencakup hampir 70 spesies, tetapi hanya ada dua spesies yang ditanam dalam skala luas di seluruh dunia, yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora* var. *robusta*) (Rahardjo, 2012).

2.4.1 Taksonomi dan Deskripsi Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Berikut sistem taksonomi kopi secara lengkap (Rahardjo, 2012):

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

Tanaman kopi tumbuhnya tegak, bercabang, dan bila dibiarkan tumbuh dapat mencapai tinggi 12 m (Najiyati dan Danarti, 2001). Tanaman ini memiliki dua tipe pertumbuhan cabang, yaitu cabang ortotrop tumbuh ke arah vertikal dan cabang plagiotron ke arah horizontal. Daun kopi berwarna hijau mengilap yang tumbuh berpasangan dengan berlawanan arah. Bentuk daun tanaman kopi lonjong dengan tulang daun yang tegas (Rahardjo, 2012).

Tanaman kopi membutuhkan waktu 3 tahun dari saat perkecambahan sampai menjadi tanaman berbunga dan menghasilkan buah kopi. Semua spesies kopi berbunga berwarna putih yang beraroma wangi. Bunga tersebut muncul pada ketiak daunnya. Buah kopi tersusun dari kulit buah (*epikarp*), daging buah (*mesokarp*) yang dikenal dengan sebutan pulp, dan kulit tanduk (*endokarp*). Buah yang terbentuk akan matang selama 7-12 bulan (Rahardjo, 2012).

Buah terdiri dari daging buah dan biji. Daging buah terdiri atas 3 bagian lapisan kulit luar (*eksokarp*), lapisan daging (*mesokarp*) dan lapisan kulit tanduk (*endokarp*) yang tipis tetapi keras. Buah kopi ada yang memiliki dua biji, satu biji dan bahkan tidak berbiji sama sekali. Biji ini terdiri atas kulit biji dan endosperm. Endosperm merupakan bagian yang bisa dimanfaatkan sebagai bahan untuk membuat minuman kopi (Najiyati dan Danarti, 2001). Biji kopi dibungkus kulit keras disebut kulit tanduk (*parchment skin*) (Gambar 2.7). Biji mempunyai alur pada bagian datarnya (Rahardjo, 2012).



Gambar 2.7 Biji Kopi Robusta (Sumber: Panggabean dalam Asti, 2015).

2.4.2 Komposisi Kimia Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Komposisi kimia dari biji kopi bergantung pada spesies dan varietas dari kopi tersebut serta faktor-faktor lain yang berpengaruh antara lain lingkungan

tempat tumbuh, tingkat kematangan dan kondisi penyimpanan (Panggabean dalam Asti, 2015). Menurut Simanjuntak dalam Asti (2015) menyatakan bahwa biji kopi mengandung protein, minyak aromatis, dan asam-asam organik. Komposisi kimia dari biji dan bubuk kopi robusta dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kimia dari biji kopi robusta (*Coffea canephora*)

Komponen	Konsentrasi Senyawa (%)
Mineral	4.0-4.5
Kafein	1.6-2.4
Trigonelline	0.6-0.75
Lipid	9.0-13.0
Total Asam Klorogenat	7.0-10.0
Asam Alifatik	1.5-2.0
Oligosakaridac	5.0-7.0
Total Polisakarida	37.0-47.0
Asam Amino	2.0
Protein	11.0-13.0

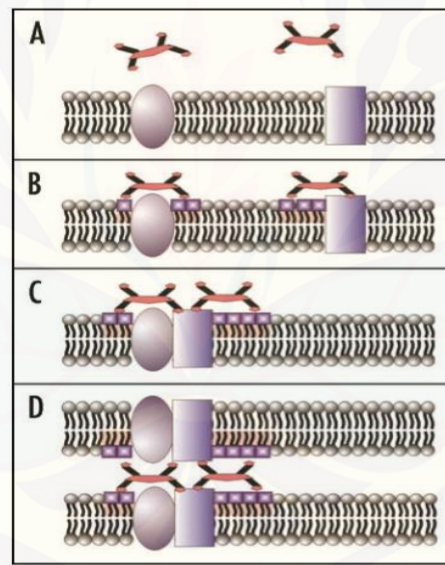
(Sumber: Panggabean, 2011)

Senyawa-senyawa kimia pada biji kopi dapat dibedakan atas senyawa volatil dan non volatil. Senyawa volatil adalah senyawa yang mudah menguap, terutama jika terjadi kenaikan suhu. Senyawa volatil yang berpengaruh terhadap aroma kopi antara lain golongan aldehid, keton dan alkohol. Senyawa non volatil yang berpengaruh terhadap mutu kopi antara lain kafein, asam klorogenat, hidrokarbonalifatik, asam, alkohol, tiol, furan, piro, piridin, quinon, fenol (asam alifatik) dan amin aromatik (Ramanaviciene *et al.*, 2003).

Biji kopi robusta yang diekstrak dengan pelarut etanol menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan pelarut heksana karena adanya senyawa fenolik yang dapat diekstraksi dengan pelarut yang lebih polar. Ekstrak biji kopi robusta dengan pelarut etanol menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi daripada ekstrak biji kopi robusta yang dipanggang. Aktivitas antioksidan yang tinggi berhubungan dengan kandungan polifenol yang lebih tinggi, terutama asam klorogenik. Asam klorogenat merupakan komponen utama dalam biji kopi robusta yang kandungannya berkurang karena proses pemanggangan (Kiattisin, 2016).

2.4.3 Manfaat Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Biji kopi secara alami mempunyai kandungan seperti polifenol dan flavonoid. Polifenol merupakan antioksidan kuat dan dapat melindungi sel imun dari kerusakan biologis akibat radikal bebas (Ermawati, 2015). Polifenol banyak mengandung *gallate moieties* yang dapat menempel pada permukaan sel, mengubah sifat fisik lipid, memulai segregasi lateral, pembentukan gugus lipid dan protein, dan memulai ikatan dengan sel-sel disekitarnya. *Gallates* dapat menginisiasi proses pembentukan fosfolipid dan menyebabkan agregasi dari beberapa kelompok protein dan lipid. Molekul polifenol dapat menghubungkan permukaan dua sel yang berdekatan dan mengawali ikatan sel-sel sehingga terbentuk gugus yang sama pada membran sel yang berseberangan (Tarahovsky, 2008) (Gambar 2.8).

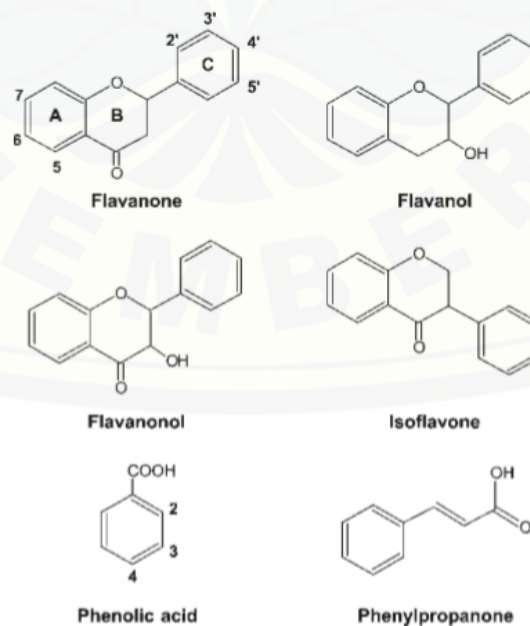


Gambar 2.8 *Gallate moieties* yang dapat berinteraksi dengan permukaan sel (Sumber: Tarahovsky, 2008)

Interaksi polifenol dan *membrane bilayers* merupakan mekanisme yang berhubungan dengan perlindungan *membrane bilayers* oleh flavonoid dari oksidasi membran. Flavonoid yang aktif pada bilayer non-polar memiliki aktivitas antioksidan yang dikaitkan dengan kemampuannya berinteraksi dengan radikal bebas, menghambat perambatan oksidasi lipid atau meningkatkan fluiditas membran. Interaksi antara flavonoid dan *membrane bilayers* menghasilkan ikatan

pada pertemuan lipid-air dan tersebar pada membran hidrofobik. Lokasi yang berbeda dari molekul-molekul ini ditentukan oleh sifat kimianya. Flavonoid hidrofilik dapat berinteraksi pada permukaan membran dan memberikan tindakan protektif terhadap agen-agen perusak yang berbeda. Interaksi membran-flavonoid merupakan mekanisme yang terlibat dalam aksi antioksidan flavonoid. Interaksi antara polifenol dan permukaan membran pada pertemuan lipid-air terbentuk melalui ikatan hidrogen (Oteiza *et al.*, 2005).

Flavonoid berdasarkan struktur kimianya diklasifikasikan sebagai *chalcones*, *dihydrochalcones*, *aurones*, *flavon*, *flavonol*, *dihydroflavonol*, *flavanol*, *flavandirol*, *anthocyanidins*, *isoflavonoid*, *bioflavonoid* dan struktur lain yang sangat terpolimerisasi (Gambar 2.9). Perbedaan flavonoid tersebut dilihat pada jumlah dan distribusi gugus hidroksil serta derajat polimerisasi. Perbedaan ini dapat mempengaruhi jenis interaksi yang terjadi antara flavonoid yang berbeda dan bilayers lipid. Dua reaksi yang mungkin terjadi: (a) partisi polifenol dalam membran inti non-polar, berhubungan dengan sifat hidrofobik dari flavonoid; dan (b) interaksi flavonoid hidrofilik dan oligomer dengan gugus kepala polar dari lipid pada antarmuka lipid-air, terutama yang terkait dengan pembentukan ikatan hidrogen (Oteiza *et al.*, 2005).



Gambar 2.9 Struktur kimia dari Flavonoid (Sumber: Oteiza *et al.*, 2005)

2.5 Uji Sitotoksitas MTT

2.5.1 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas merupakan salah satu sarana evaluasi biologi dan *screening test* yang menggunakan jaringan *in vitro* untuk mengamati pertumbuhan dan efek morfologi pada sel yang disebabkan oleh perlakuan medis (Li *et al.*, 2015). Tujuan uji ini adalah untuk mengetahui efek toksik suatu bahan secara langsung terhadap jaringan (Siregar dan Handijono, 2000). Uji ini banyak digunakan karena sederhana, cepat dan memiliki sensitivitas yang tinggi (McGaw *et al.*, 2014).

Sitotoksitas merupakan komponen utama dari biokompatibilitas. Biokompatibilitas mengacu pada kemampuan bahan sebagai terapi medis, tanpa menimbulkan efek lokal atau sistemik pada tubuh (Elshahawy dan Watanabe, 2014). Bahan yang diletakkan dalam mulut disyaratkan tidak toksik, tidak iritan, tidak karsinogenik dan tidak menimbulkan alergi (Nirwana *et al.*, 2005). Berbagai metode untuk menilai sitotoksitas suatu bahan antara lain uji MTT, agar *overlay*, filter molekul, pembebasan isotop kromium, dan metode pewarnaan eksklusif dengan *trypan blue* (Siregar dan Handijono, 2000).

2.5.2 MTT

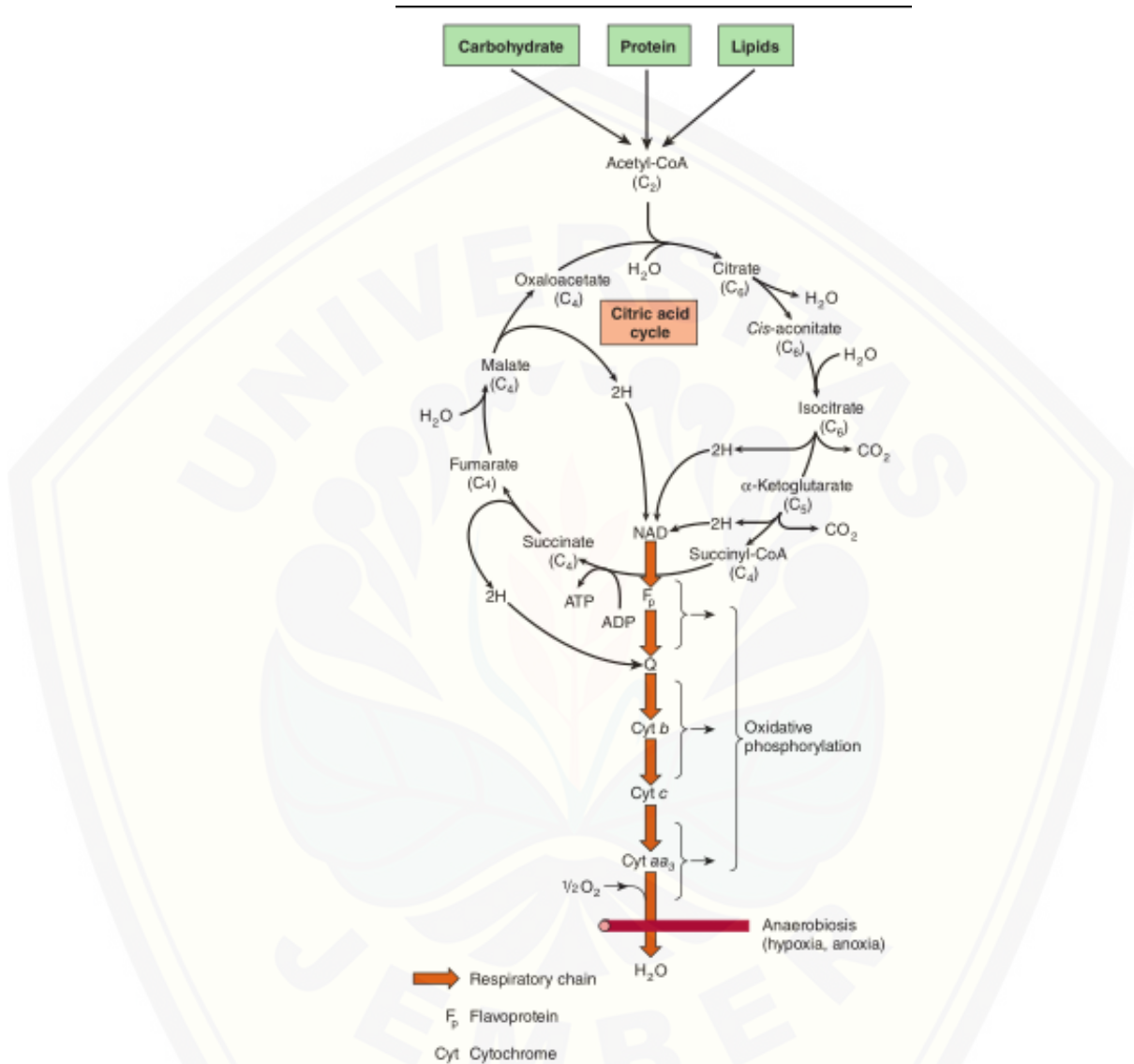
Uji MTT (3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5diphenyl tetrazolium bromide) merupakan salah satu uji sitotoksitas yang difungsikan untuk melihat jumlah sel yang hidup ditinjau dari aktivitas mitokondrianya (Meerlo *et al.*, 2011). Uji MTT didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT yang berwarna kuning menjadi formazan yang berwarna biru-ungu. Reduksi garam tetrazolium terjadi secara intraseluler dan disebabkan adanya enzim suksinat dehidrogenase yang dihasilkan oleh mitokondria (Siregar dan Handijono, 2000). Enzim ini berperan dalam siklus asam sitrat (siklus Krebs, siklus asam trikarboksilat) yang merupakan serangkaian reaksi di mitokondria untuk mengoksidasi gugus asetil pada asetil-KoA dan mereduksi koenzim yang teroksidasi melalui rantai transpor elektron yang berhubungan dengan pembentukan ATP (Murray *et al.*, 2009) (Gambar 2.10).

Siklus Krebs diawali dengan reaksi antara gugus asetil pada asetil-KoA dan asam dikarboksilat empat-karbon oksaloasetat yang membentuk asam trikarboksilat enam-karbon, yaitu sitrat. Reaksi berikutnya terjadi pembebasan dua molekul CO₂ dan pembentukan ulang oksaloasetat. Koenzim-koenzim pada tahapan ini mengalami reduksi dan kemudian direoksidasi di rantai respiratorik yang berkaitan dengan pembentukan ATP. Proses ini bersifat aerob yang memerlukan oksigen sebagai oksidan terakhir dari koenzim-koenzim yang tereduksi. Enzim-enzim pada siklus asam sitrat terletak di matriks mitokondria (Murray *et al.*, 2009).

Sitrat sintase merupakan enzim yang berperan dalam mengkatalisis asetil-KoA dan oksaloasetat untuk membentuk sitrat. Enzim ini membentuk ikatan karbon-ke-karbon antara karbon metil pada asetil-KoA dan karbon karbonil pada oksaloasetat. Sitrat mengalami isomerisasi menjadi isositrat oleh enzim akonitase (*akonitat hidratase*). Isositrat mengalami dehidrogenasi yang dikatalisis oleh *isositrat dehidrogenase* untuk membentuk oksalosuksinat untuk selanjutnya mengalami dekarboksilasi menjadi α -ketoglutarat. α -Ketoglutarat mengalami dekarboksilasi oksidatif dalam suatu reaksi yang dikatalisis oleh suatu kompleks multienzim yang berperan dalam dekarboksilasi oksidatif piruvat. Kompleks α -ketoglutarat dehidrogenase memerlukan faktor yang sama dengan kofaktor yang diperlukan kompleks piruvat dehidrogenase. Reaksi ini membentuk suksinil-KoA. Suksinil-KoA kemudian diubah menjadi suksinat oleh enzim suksinat tiokinase (Murray *et al.*, 2009).

Enzim suksinat dehidrogenase yang berfungsi dalam mereduksi garam MTT pada uji sitotoksisitas MTT, di dalam siklus asam sitrat berperan dalam reaksi dehidrogenasi pertama yang membentuk fumarat. Enzim ini terikat pada permukaan dalam membran dalam mitokondria. Enzim suksinat dehidrogenase ini mengandung FAD dan protein besi-sulfur (Fe:S), dan secara langsung mereduksi ubikuinon dalam rantai transpor elektron. Fumarase (*fumarate hidratase*) mengkatalisis penambahan air pada ikatan rangkap fumarat sehingga menghasilkan malat. Malat diubah menjadi oksaloasetat oleh malat dehidrogenase, suatu reaksi yang memerlukan NAD⁺. Akibat oksidasi yang dikatalisis oleh berbagai

dehidrogenase pada siklus asam sitrat, dihasilkan tiga molekul NADH dan satu FADH₂ untuk setiap molekul asetil-KoA yang dikatabolisme per satu kali putaran siklus (Murray *et al.*, 2009).

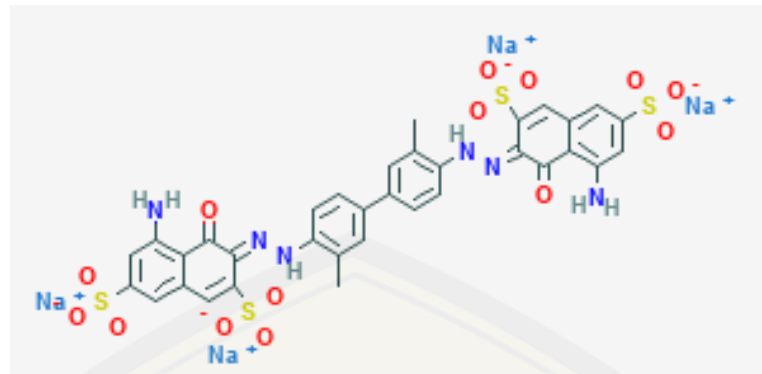


Gambar 2.10 Siklus Asam Sitrat: jalur katabolik utama untuk asetil KoA pada organisme aerob. Asetil KoA, produk katabolisme karbohidrat, protein, dan lipid, dibawa ke siklus asam sitrat dan dioksidasi menjadi CO₂ disertai pembebasan ekuivalen pereduksi (2H). Oksidasi 2H selanjutnya di rantai respiratorik menyebabkan fosforilasi ADP menjadi ATP. Untuk satu putaran siklus, dihasilkan 11 ATP melalui fosforilasi oksidatif dan 1 ATP dihasilkan di tingkat substrat dari perubahan suksinil KoA menjadi suksinat (Sumber: Murray *et al.*, 2009)

Tujuan umum uji MTT adalah untuk mengukur sel yang hidup di sumuran *96-well plates* sehingga dapat diukur banyak sampel pada saat yang sama (Meerlo *et al.*, 2011). Keuntungan uji ini adalah dapat menghemat waktu, tenaga dan dana. Keuntungan lain dari uji ini adalah tidak menggunakan isotop radioaktif, dan tidak memerlukan transfer sel. Produk formazan yang dihasilkan dilarutkan dalam pelarut DMSO dan diukur intensitas warnanya menggunakan spektrofotometer. Pengukuran intensitas warna dilakukan untuk selanjutnya dibaca menggunakan *ELISA reader*. Jumlah formazan yang dilarutkan berbanding lurus dengan jumlah sel, semakin pekat warnanya maka makin tinggi nilai absorbansinya sehingga berarti makin banyak jumlah selnya. Jumlah sel yang hidup dapat dideteksi dengan mengukur konsentrasi formazan pada densitas optik (OD) dengan menggunakan panjang gelombang yang tepat. Pengukuran absorbansi bergantung jenis pelarut yang digunakan dan faktor kelekatan sel terhadap substrat (Siregar dan Handijono, 2000).

2.5.3 Trypan Blue

Trypan blue (3, 31 – [3, 31 – *dimethyl* - 4, 41 -*biphenylene*] *bis(azo)*] *bis* (5-*amino*4-*hydroxy* 2,7-*naphthalene di sulfonic acid*) adalah pewarna diazo yang banyak digunakan untuk mewarnai jaringan mati atau sel secara selektif (Gambar 2.11). Rumus molekul dari *trypan blue* adalah $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$. Mekanisme pewarnaan *trypan blue* didasarkan pada interaksinya dengan sel. Pewarna ini tidak dapat berinteraksi dengan sel yang membrannya rusak. Sel yang tidak mengalami kerusakan bersifat selektif terhadap senyawa yang melewati membrannya, dan hal inilah yang menyebabkan sel tersebut tidak terwarnai oleh *trypan blue*. Sel yang tidak menyerap warna dianggap masih hidup dan tidak rusak sedangkan sel-sel dengan membran yang rusak terwarnai dengan warna biru yang dapat diamati di bawah mikroskop (Tran *et al.*, 2011).



Gambar 2.11 Struktur molekul *trypan blue* (Sumber: Pubchem, 2017)

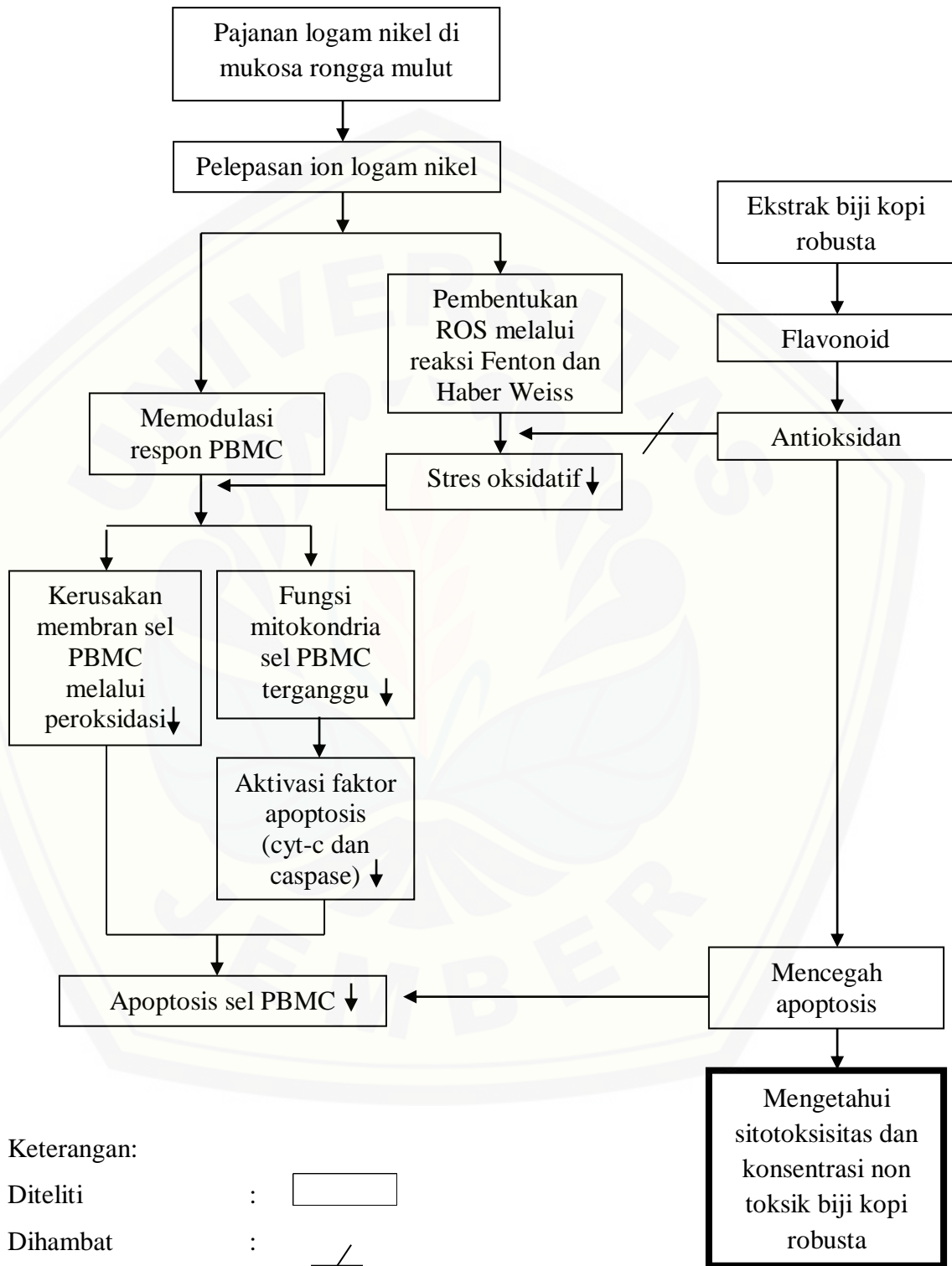
2.5.4 Tingkat Toksisitas

Data absorbansi yang didapat dari pembacaan oleh ELISA *reader* kemudian dikonversi ke dalam persen viabilitas sel dengan membandingkan nilai absorbansi kelompok perlakuan yang dipajan dengan bahan uji dengan kelompok kontrol (CCRC, 2010).

Menurut Heravi *et al.* (2013) tingkat toksisitas suatu bahan dikelompokkan berdasarkan jumlah sel yang hidup yaitu:

- Sel yang hidup lebih dari 90% diklasifikasikan sebagai non-toksik.
- Sel yang hidup diantara 60% hingga 90% diklasifikasikan sebagai toksisitas rendah.
- Sel yang hidup diantara 30% hingga 59% diklasifikasikan sebagai cukup toksik.
- Sel yang hidup kurang dari 30% diklasifikasikan sebagai sangat toksik.

1.5 Peta Konsep



2.7 Keterangan Peta Konsep

Pajanan logam nikel di mukosa rongga mulut seperti saat pemakaian braket dan mahkota menyebabkan pelepasan ion logam nikel yang memodulasi respon sel-sel PBMC dan juga peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*). ROS terbentuk karena ion logam nikel yang berikatan dengan hidrogen peroksida dan menghasilkan radikal peroksida melalui reaksi *Fenton* dan *Haber Weiss*. Peningkatan ROS menginduksi stres oksidatif yang mempengaruhi sel-sel tubuh manusia, terutama sel PBMC itu sendiri. Stres oksidatif yang meningkat pada sel PBMC akan memicu terjadinya apoptosis sel PBMC. Membran sel PBMC akan rusak dikarenakan adanya radikal peroksil lemak dan peroksida lemak yang menyebabkan peroksidasi lemak membran sel. ROS juga akan mempengaruhi kerja dari mitokondria sel PBMC. Mitokondria sel yang terganggu akan mengaktifasi faktor apoptosis seperti *cytochrome-c* dan *caspase-9*, *-3* dan *-6*. Ekspresi faktor apoptosis akan meningkat dan menginduksi terjadinya apoptosis. Apoptosis pada sel PBMC diharapkan dapat dicegah menggunakan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang mengandung flavonoid. Bahan tersebut berperan sebagai antioksidan yang memiliki ikatan gugus hidroksil sehingga dapat menangkap radikal bebas. Jumlah ROS dan stres oksidatif yang berkurang akan menurunkan apoptosis pada sel PBMC.

2.8 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) efektif dalam menghambat efek toksik senyawa nikel pada sel PBMC.
2. Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dalam konsentrasi optimal dalam menghambat efek toksik senyawa nikel pada sel PBMC.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris *in vitro*. Penelitian eksperimental bertujuan untuk mengungkapkan pengaruh atau suatu gejala yang timbul akibat manipulasi tertentu (Budiharto, 2008). *In vitro* merupakan suatu proses yang berlangsung diluar tubuh, diterapkan pada prosedur laboratoris (Makfoeld *et al.*, 2002). Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design*, yaitu dengan melakukan pengukuran atau observasi setelah perlakuan diberikan (Notoatmojo, 2005).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli 2018.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di:

- a. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- b. Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3 Identifikasi Variabel

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dan larutan $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah sitotoksisitas ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap PBMC yang dipapar larutan $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

3.3.3 Variabel Terkendali

- a. Isolat PBMC dari pasien sehat.
- b. Larutan senyawa nikel didapatkan dari stok yang sama.
- c. Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) didapat dari sumber, jenis dan teknik yang sama.
- d. Alat penelitian disterilkan dalam waktu yang bersamaan.
- e. Bahan penelitian yang digunakan merupakan bahan yang sama pada tiap perlakuan.
- f. Cara kerja penelitian.
- g. Perlakuan pada sampel
 1. Pemberian ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 31,25 µg/ml
 2. Pemberian ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 62,5 µg/ml
 3. Pemberian ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 125 µg/ml
- h. Uji sitotoksitas dan cara penghitungan hasil

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) merupakan suspensi dari serbuk biji kopi robusta yang didapatkan dari biji kopi yang masih mentah (*green bean*). Biji kopi robusta diperoleh dari perkebunan PTPN XII Durjo Kabupaten Jember. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta menggunakan metode maserasi, yaitu sediaan cair yang dibuat dengan mengencerkan bubuk biji kopi robusta dengan etanol 96% sehingga dihasilkan ekstrak kopi dalam bentuk pasta, kemudian dilakukan penimbangan dan pengenceran sehingga diperoleh konsentrasi 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 125 µg/ml. Konsentrasi tersebut dipilih setelah dilakukan penelitian pendahuluan menggunakan konsentrasi 500 µg/ml, 250 µg/ml dan 125 µg/ml, seperti dalam El-Nabi SEH (2018) didapati bahwa konsentrasi ekstrak kopi 500 µg/ml, 250 µg/ml bersifat toksik terhadap PBMC.

3.4.2 PBMC

PBMC terdiri dari sel monosit (10-20%), sel T (50-70%), sel B (5-15%), sel *Natural Killer* (NK) (2-10%), dan sel dendritik. (Končarević, *et al.*, 2014).

PBMC diperoleh dengan mengisolasi 3 ml darah vena tepi pasien donor sehat yang diketahui tidak memiliki alergi logam dengan metode *Single Filter/Lymphoprep*.

3.4.3 Larutan Senyawa Nikel

Larutan senyawa nikel yang digunakan berupa senyawa $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ yang diketahui merupakan penginduksi kematian sel. Larutan logam yang digunakan dibuat dengan melarutkan *powder* dalam aquades. Larutan selanjutnya ditambahkan *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) untuk mendapatkan konsentrasi 125 μM yang siap untuk dipaparkan langsung pada PBMC. (Rachmawati *et al.*, 2013).

3.4.4 Uji Sitotoksisitas

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan telah memenuhi syarat biokompatibilitas yang dapat diterima oleh tubuh atau tidak (Nirwana, 2005). Uji sitotoksisitas yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji *trypan blue* dan MTT. Uji *trypan blue* didasarkan pada interaksi pewarna *trypan blue* dengan sel. Sel yang tidak menyerap warna dianggap masih hidup dan tidak rusak (Tran *et al.*, 2011). Uji ini menggunakan *24-well plate culture* yang penggunaannya disesuaikan dengan jumlah sampel yang digunakan.

Uji MTT didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi formazan yang berwarna biru-ungu dan tidak larut (Siregar dan Handijono, 2000). Uji ini menggunakan *96-well plate culture* yang penggunaannya disesuaikan dengan jumlah sampel yang digunakan. Jumlah sel yang hidup dideteksi dengan mengukur konsentrasi formazan yang tercermin pada densitas optik (OD) dengan menggunakan pembaca pelat 630 nm.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

- a. *Centrifuge*
- b. Gelas ukur
- c. *Shaker Incubator*
- d. *Laminar Flow Cabinet*

- e. 24-well plate culture dan 96-well plate culture
- f. Pipet mikro
- g. Rak Tabung
- h. *Syringe* 5ml
- i. Tabung *epondorf*
- j. Tabung *Falcon*
- k. Tabung heparin
- l. Neraca Timbang
- m. *Rotary Evaporator*
- n. *Vortex*
- o. *ELISA reader*
- p. *Yellow tip* dan *blue tip*
- q. Blender
- r. Botol Duran
- s. Erlemeyer
- t. Tourniquet

3.5.2 Bahan

- a. Darah vena kapiler
- b. Bubuk logam $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- c. Larutan *Lymphoprep*
- d. Ekstrak Biji Kopi Robusta
- e. HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*)
- f. RPMI (*Rosewel Park Memorial Institute Media*)
- g. M199
- h. *Fungizone*
- i. *Penicillin streptomycin*
- j. *Dimethylsulfoxide* (Merck, Darmstadt, Germany)
- k. Alkohol 70%
- l. Aquades
- m. MTT (*3-(4,5 dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid*)
- n. PBS

- o. DMSO
- p. *Trypan blue*

3.6 Sampel Penelitian

3.6.1 Kriteria Sampel

Penelitian ini menggunakan isolat PBMC yang diperoleh dari darah vena perifer manusia. Sampel darah ini diperoleh dari pasien sehat (tidak mempunyai penyakit sistemik) yang telah mengisi *inform consent* dan memenuhi syarat kelayakan etik pada penelitian ini.

3.6.2 Kelompok Sampel

Sampel penelitian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, sebagai berikut:

- a. Kelompok 1 : PBMC + media kultur.
- b. Kelompok 2 : PBMC + media kultur yang dipapar larutan senyawa $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 125 μM .
- c. Kelompok 3 : PBMC + media kultur yang dipapar dengan larutan senyawa $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 125 μM dan larutan ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 31,25 $\mu\text{g/ml}$.
- d. Kelompok 4 : PBMC + media kultur yang dipapar dengan larutan senyawa $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 125 μM dan larutan ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 62,5 $\mu\text{g/ml}$.
- e. Kelompok 5 : PBMC + media kultur yang dipapar dengan larutan senyawa $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 125 μM dan larutan ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$.

5 kelompok perlakuan ini masing-masing akan diujikan pada *24-well plate culture* sebagai kelompok A dan *96-well plate culture* sebagai kelompok B.

3.6.3 Besar Sampel

Besar sampel pada penelitian ini diambil menurut rumus: $n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$

Keterangan :

n= Besar sampel tiap kelompok

σ = Standar deviasi sampel

d= Kesalahan yang masih dapat ditolerir

z= Nilai pada tingkat kesalahan tertentu, jika $\alpha = 0,05$ maka $z = 1,96$ (Daniel, 2009)

Pada penelitian ini nilai σ diasumsikan sama dengan nilai d ($\sigma = d$)

Perhitungannya yaitu:

$$n = \frac{(1,96)^2 \sigma^2}{d^2} = 3,84$$
$$= 3,84 \rightarrow \text{di bulatkan menjadi } 4$$

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

3.6.4 Teknik *Sampling*

Teknik sampel yang digunakan adalah teknik *simple random sampling*. Sampel PBMC pada *24-well plate culture* dan *96-well plate culture* yang telah memenuhi kriteria diuji secara acak kemudian pada masing-masing *microplate* dibagi dalam 5 kelompok terdiri dari 4 buah sampel sehingga secara keseluruhan terdapat 20 sampel. *24-well plate culture* yang terdiri dari 24 *well* diambil 20 *well* untuk selanjutnya dilakukan uji *trypan blue* dan pada *96-well plate culture* yang terdiri dari 96 *well*, diambil 20 *well* untuk selanjutnya dilakukan uji MTT.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 *Ethical Clearance*

Prosedur pengambilan darah pada pasien dilakukan setelah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.7.2 Sterilisasi Alat

Mencuci bersih semua alat penelitian yang terbuat dari logam kemudian disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dan mensterilkan alat yang terbuat dari plastik menggunakan alkohol 70%.

3.7.3 Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Pembuatan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan teknik maserasi dan dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

- a. Membersihkan biji kopi yang telah dikumpulkan dengan cara dicuci di bawah air mengalir sampai bersih.

- b. Mengeringkan biji kopi robusta dengan membiarkan sampel ditempat terbuka. Sampel yang telah kering dibuat menjadi serbuk menggunakan blender kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 65 hingga diperoleh serbuk yang halus dan seragam.
 - c. Memasukkan serbuk biji kopi robusta ke dalam wadah gelas tertutup
 - d. Menimbang serbuk biji kopi robusta sebanyak 500 gram menggunakan neraca timbang dan dimaserasi dalam larutan etanol 96% sebanyak 2000 ml selama 48 jam. Menutup wadah dengan *aluminium foil*.
 - e. Menyaring hasil maserasi menggunakan corong yang dilapisi kertas saring sehingga dihasilkan filtrat 1 dan ampas 1.
 - f. Menyaring ampas 1 menggunakan kertas saring sehingga dihasilkan filtrat 2 dan ampas 2.
 - g. Menggabungkan filtrat 1 dan 2 untuk kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 30-40°C, sehingga diperoleh ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 100%.
 - h. Menyimpan ekstrak dalam wadah gelas tertutup.
- (Tanauma *et al.*, 2016).

3.7.4 Pengambilan sampel darah

- a. Melakukan pengambilan darah sebanyak 6 ml dari darah vena perifer orang sehat dengan menggunakan syringe 3 ml.
- b. Memasukkan darah yang telah diambil ke dalam tabung heparin secara perlahan-lahan dengan melewatkan pada dinding tabung agar tidak berbuih, kemudian tabung digoyangkan agar tidak menggumpal.

3.7.5 Isolasi PBMC

Teknik isolasi PBMC ini menggunakan metode *Single Filter/Lymphoprep*.

- a. Memasukkan 6 ml sampel darah pada tabung heparin dan dicampur sampai merata secara perlahan-lahan dengan melewatkan pada dinding tabung sehingga tidak berbuih menggunakan mikropipet dan *blue tip*.
- b. Membuat *diluent* darah yang berasal dari darah yang diencerkan menggunakan garam fisiologi (HBSS/PBS pH 7.4) dengan perbandingan 1:1 dan dicampur hingga homogen.

- c. Memasukkan *diluent* darah secara perlahan pada tabung yang sudah diisi 3 ml larutan *lymphoprep* menggunakan perbandingan *Lymphoprep* dengan *diluent* darah adalah 1:2. Larutan *Lymphoprep* dibuat tidak sampai pecah.
- d. Mensentrifugasi *diluent* darah menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 700 g selama 30 menit pada suhu 20°C hingga terbentuk 4 lapisan (plasma, mononuklear, *lymphoprep*, polimorfonuklear eritrosit).
- e. Mempipet lapisan ke 2 mononuklear (cincin kabut) secara hati-hati yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung steril.
- f. Mengencerkan dan menghomogenkan sampel mononuklear menggunakan PBS/HBSS (1:1).
- g. Mensentrifugasi sampel menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 700 g selama 3 menit dengan suhu 20°C.
- h. Melakukan pengulangan sebanyak 3 kali.
- i. Menambahkan 1 ml HBSS/PBS pH 7,4 pada *supernatant* yang telah didapat kemudian dihomogenkan.
- j. Menambahkan 5 µl *fungizone* dan 20 µl *penicillin streptomycin* yang kemudian didapatkan 2 lapisan, yaitu lapisan *supernatant* (PBS dan sisa plasma) pada bagian atas serta PBMC pada bagian bawah.
- k. Membuang *supernatant* untuk akhirnya menyisakan lapisan PBMC.

3.7.6 Prosedur Penempelan Sel

- a. Menyiapkan *24-well plate culture* dan *96-well plate culture*. Pada *24-well culture*, diletakkan *coverslip* pada masing-masing *well*.
- b. Memasukkan *suspense* sel dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 10 menit.
- c. Mengamati *suspense* sel di bawah mikroskop *inverted* dalam kondisi *plate culture* senantiasa bergetar sehingga dapat dilihat penempelan selnya.
- d. Mencuci *suspense* sel dengan RPMI sebanyak 3 kali dengan tujuan menghilangkan kontaminasi pada sel dan sel kembali diamati.

3.7.7 Inkubasi PBMC dengan Logam Nikel

- a. Kelompok A2 : Menambahkan 500 µl larutan senyawa $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 125 µM pada 20 *well* dari *24-well plate*

culture yang tersedia dan telah terisi 500 μl sel PBMC + media kultur. Menginkubasi sel pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO₂ selama 60 menit sebelum dilakukan uji *trypan blue*.

- b. Kelompok B2 : Menambahkan 100 μl larutan senyawa NiCl₂.6H₂O konsentrasi 125 μM pada 20 *well* dari 96-*well plate culture* yang tersedia dan telah terisi 100 μl sel PBMC (dengan masing-masing *well* terisi 5x10⁴ PBMC) + media kultur. Menginkubasi sel pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO₂ selama 24 jam sebelum dilakukan uji toksisitas MTT (Rachmawati *et al.*, 2013).

3.7.8 Inkubasi PBMC dengan Logam Nikel dan Ekstrak Biji Kopi Robusta

Menambahkan 500 μl larutan senyawa NiCl₂.6H₂O konsentrasi 125 μM pada 20 *well* dari total 24 *well* di 24-*well plate culture* yang telah terisi 500 μl sel PBMC + media kultur. Menginkubasi PBMC yang telah diberi perlakuan pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO₂ selama 30 menit. Menyiapkan stok larutan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ dan memberikan perlakuan menggunakan larutan ekstrak biji kopi robusta dengan penjabaran sebagai berikut:

- a. Kelompok A3: Membuang 31,25 μl PBMC dan media kultur yang telah ditambahkan larutan senyawa NiCl₂.6H₂O pada 4 *well* kelompok perlakuan A3, lalu menambahkan 31,25 μl stok larutan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ untuk didapatkan konsentrasi NiCl₂.6H₂O 125 μM dan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta 31,25 $\mu\text{g/ml}$.
- b. Kelompok A4: Membuang 62,5 μl PBMC dan media kultur yang telah ditambahkan larutan senyawa NiCl₂.6H₂O pada 4 *well* kelompok perlakuan A4, lalu menambahkan 62,5 μl stok larutan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ untuk didapatkan konsentrasi NiCl₂.6H₂O 125 μM dan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta 62,5 $\mu\text{g/ml}$.

- c. Kelompok A5: Membuang 125 μl PBMC dan media kultur yang telah ditambahkan larutan senyawa $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pada 4 *well* kelompok perlakuan A5, lalu menambahkan 125 μl stok larutan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ untuk didapatkan konsentrasi $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 125 μM dan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta 125 $\mu\text{g/ml}$.

Menginkubasi PBMC yang telah diberi perlakuan pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO_2 selama 30 menit.

Perlakuan pada 96-*well plate culture* dimulai dengan menambahkan 100 μl larutan senyawa $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 125 μM pada 20 *well* dari total 96 *well* di 96-*well plate culture* yang telah terisi 100 μl sel PBMC (5×10^4) + media kultur. Menginkubasi PBMC yang telah diberi perlakuan pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO_2 selama 30 menit. Menyiapkan stok larutan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ dan memberikan perlakuan menggunakan larutan ekstrak biji kopi robusta dengan penjabaran sebagai berikut:

- a. Kelompok B3: Membuang 10 μl PBMC dan media kultur yang telah ditambahkan larutan senyawa $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada 4 *well* kelompok perlakuan B3, lalu menambahkan 10 μl stok larutan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ untuk didapatkan konsentrasi $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 125 μM dan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta 31,25 $\mu\text{g/ml}$.
- b. Kelompok B4: Membuang 20 μl PBMC dan media kultur yang telah ditambahkan larutan senyawa $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pada 4 *well* kelompok perlakuan B4, lalu menambahkan 20 μl stok larutan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ untuk didapatkan konsentrasi $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 125 μM dan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta 62,5 $\mu\text{g/ml}$.
- c. Kelompok B5: Membuang 40 μl PBMC dan media kultur yang telah ditambahkan larutan senyawa $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pada pada 4 *well* kelompok perlakuan B5, lalu menambahkan 40 μl stok larutan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$

untuk didapatkan konsentrasi $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 125 μM dan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta 125 $\mu\text{g/ml}$.

Menginkubasi PBMC yang telah diberi perlakuan pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO_2 selama satu jam sebelum dilakukan uji toksisitas MTT.

3.7.9 Uji Sitotoksitas dengan *Trypan Blue*

- a. Mencuci isolat PBMC yang telah diberi perlakuan sebanyak dua kali dengan HBSS.
- b. Memberi *trypan blue* sebanyak 50 μl pada masing-masing *well* yang akan diuji pada *24-well plate culture* dan diratakan memenuhi *cover slip*.
- c. Menginkubasi sel PBMC yang tidak dan telah diberi perlakuan selama 1 menit.
- d. Melakukan pemotretan di bawah mikroskop *inverted*. PBMC yang tidak menyerap pewarnaan *trypan blue* dihitung sebagai sel PBMC yang hidup.

3.7.10 Uji Sitotoksitas dengan MTT

- a. Menginkubasi *96-well plate culture* berisi sel PBMC + media kultur yang tidak dan telah diberi perlakuan dengan inkubator CO_2 pada suhu 37° selama satu jam. Inkubasi ini bertujuan agar sel dapat beradaptasi dan menempel pada dinding maupun dasar sumuran.
- b. Membuang media kultur dan menambahkan masing-masing 50 μl larutan MTT 5mg/ml pada tiap *well*.
- c. Membungkus *plate* dengan kertas atau *aluminium foil* dan menginkubasikan *plate* tersebut di tempat gelap.
- d. Menginkubasi *plate* kembali selama 4 jam dalam inkubator CO_2 5% pada suhu 37° .
- e. Menghentikan kerja MTT dengan larutan DMSO. Peneliti meletakkan *plate* diatas *plate shaker* selama 30 menit agar kristal formazan terlarut.
- f. Menghidupkan ELISA *reader* menunggu hingga proses *progressing* selesai. Peneliti memasukkan *plate* ke dalam ELISA *reader* setelah pembungkus *plate* dibuka.
- g. Melakukan pembacaan ELISA dengan *optical density* (OD) 630 nm. Sel tanpa dipapar logam dianggap 100% (CCRC, 2010)

3.7.11 Pengamatan Hasil

Menghitung persentase viabilitas PBMC yang diuji dengan uji *trypan blue* menggunakan rumus:

$$\text{Viabilitas PBMC (\%)} = \frac{\text{Jumlah PBMC yang viable} \times 100}{\text{Jumlah PBMC seluruhnya}}$$

Menghitung persentase viabilitas sel yang diuji dengan uji MTT menggunakan persamaan berikut (CCRC, 2010):

$$\% \text{ Viabilitas sel} = \frac{\text{Absorbansi sel setelah perlakuan} - \text{Absorbansi media} \times 100}{\text{Absorbansi sel} - \text{Absorbansi media}}$$

Keterangan:

% Viabilitas sel : Persentase jumlah kehidupan sel setelah diuji

Absorbansi tes : Nilai *Optical Density* (OD) formazan setiap sampel setelah uji

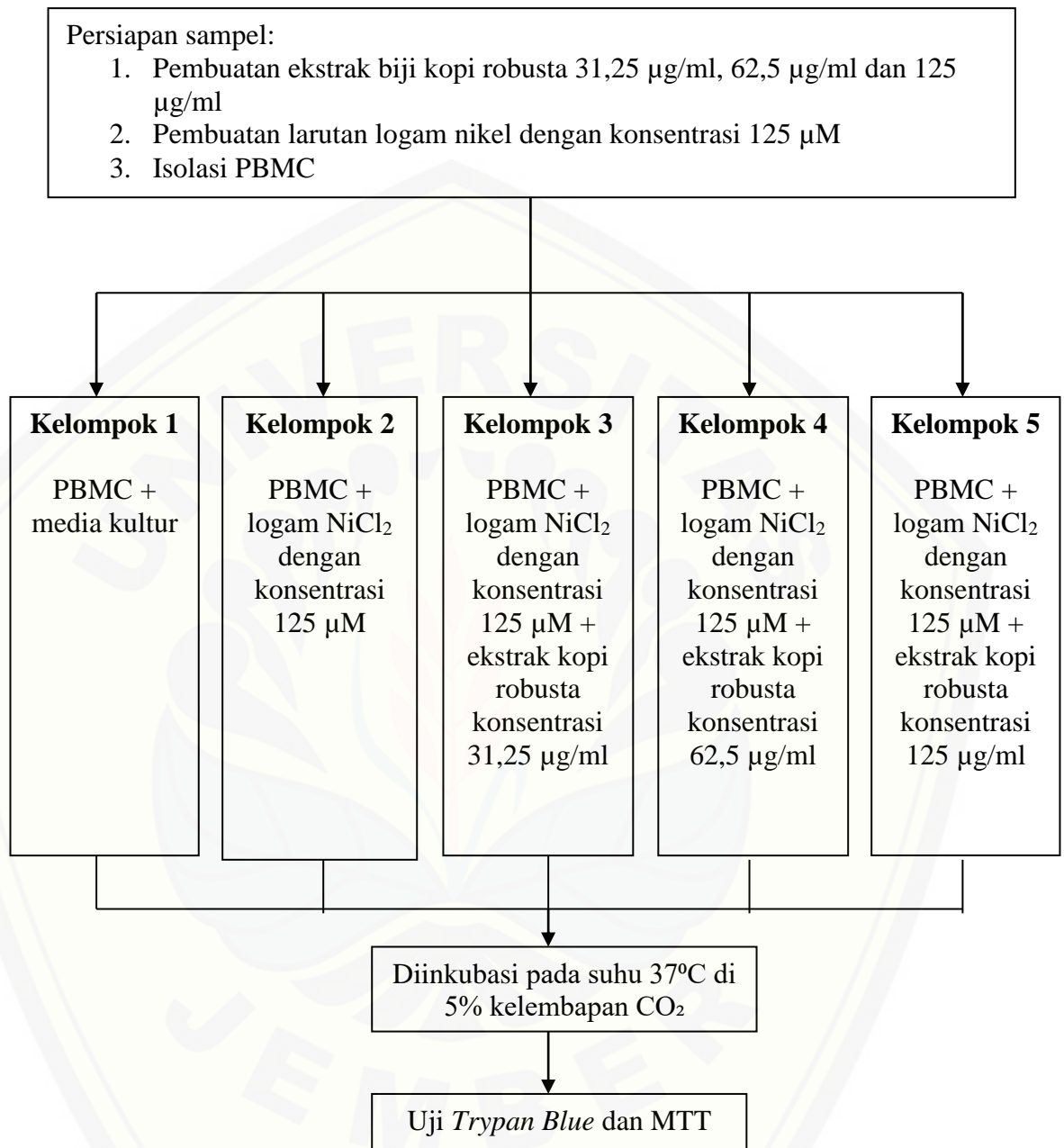
Absorbansi media : Nilai OD formazan pada rata-rata setiap kontrol media.

Absorbansi sel : Nilai OD formazan pada rata-rata kontrol sel.

3.8 Analisis Data

Data hasil penelitian ditabulasi kemudian dianalisis dengan uji normalitas *Saphiro wilk* dengan ($p \geq 0,05$) dan uji homogenitas dengan uji *Levene-test* dengan ($p \geq 0,05$). Data yang terdistribusi normal dan homogen, kemudian dianalisis dengan uji statistik parametrik dengan uji analisa varian satu arah (*One way ANOVA* dengan $p \leq 0,05$) menggunakan aplikasi SPSS. Data yang diketahui memiliki perbedaan antar kelompok diuji dengan uji *Least Significant Different* (LSD) untuk mengetahui kemaknaan perbedaan antar uji sampel. Apabila data yang dihasilkan tidak terdistribusi secara normal dan homogen maka dilakukan uji non parametrik *Kruskal Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

3.9 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- a. Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) efektif dalam menghambat efek toksik senyawa nikel pada sel PBMC.
- b. Ekstrak biji kopi robusta dalam konsentrasi paling kecil 31,25 $\mu\text{g/ml}$ yang dipaparkan pada sel PBMC dapat menurunkan efek toksik secara signifikan dari paparan logam nikel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sedangkan pada konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ dan 62,5 $\mu\text{g/ml}$ memiliki efek yang tidak begitu kuat dalam menurunkan efek toksik dari nikel karena dengan konsentrasi ekstrak kopi tersebut diketahui memiliki sifat toksik yang tergolong sebagai toksisitas rendah (60-90%).

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan zat aktif dari ekstrak biji kopi robusta yang aman dan tidak bersifat toksik bagi sel.

DAFTAR PUSTAKA

- Asti, S. 2015. Pengaruh Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Monosit (Penelitian Eksperimental Laboratoris *in-Vitro*). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi: Universitas Jember
- Baratawidjaja, K.G. dan Iris Rengganis. 2010. *Imunologi Dasar Ed¹⁰*. Jakarta: Fakultas Kedokteran UI
- Birben, Esra, Umit Murat Sahiner, Cansin Sackesen, Serpil Erzurum dan Omer Kalayci. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ Journal*, p 9-19
- Botto, Marina. 2004. Phosphatidylserine Receptor and Apoptosis : Consequences of a Non-Ingested Meal. *Arthritis Research and Therapy*. 6 (4) : 147-150
- Budiharto. 2008. *Metodologi Penelitian dengan Contoh Bidang Ilmu Kesehatan Gigi*. Jakarta: EGC
- Budirahardjo, Roedy. 2016. Peningkatan Viabilitas Monosit oleh Biji Kopi Robusta terhadap *Streptococcus mutans*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- CCRC. 2010. Standard Operating Procedure. *Cancer Chemoprevention Research Cancer* Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
- Christina, B., Fransisca, C., Caroline, K.K. dan Sudiono, J. 2015. Peran Monosit (Makrofag) pada Proses Angiogenesis dan Fibrosis. *Seminar Nasional Cendekiawan*: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti
- Christianti, Natalia D. 2012. Sintesis dan Karakterisasi Material Magnetik Berbasis Senyawa Kompleks Inti Ganda Nikel (II) dengan 2,2'-Bipiridin Menggunakan Ligan Jembatan Oksalat. *Skripsi*. Departemen Kimia: Universitas Airlangga
- Daniel, W.W. 2009. *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences* 9 th Edition. Georgia: Wiley

- Dewanti, I Dewa Ayu Ratna, I Dewa Ayu Susilawati, Pujiana Endah, Roedy Budirahardjo. 2016. Robusta Coffee Beans Decrease of Inflammation in Dental Caries. *UNEJ e-Proceeding, [S.l.]*, p. 173-176
- Dutordoir, Maureen Redza dan Diana A. Averill Bates. 2016. Activation of Apoptosis Signalling Pathways by Reactive Oxygen Species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863, p. 2977-2992
- Elshahawy, W dan I. Watanabe. 2014. Biocompatibility of Dental Alloys Used in Dental Fixed Prosthodontics. *Tanta Dental Journal*, p. 150-159
- Ermawati, Tantin. 2013. Efek Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) terhadap Kemampuan Adhesi dan Viabilitas Neutrofil yang Dipapar *Porphyromonas Gingivalis*. Penelitian Dosen Pemula Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- Ermawati, Tantin. 2015. Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap Ekspresi TNF- α pada Tikus Periodontitis yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*. Penelitian dosen pemula, Universitas Jember
- Fatmah. 2006. Respons Imunitas yang Rendah pada Tubuh Manusia Usia Lanjut. *Makara Kesehatan*. 10 (1) : 47-53
- Garanda, Cecilia., Di Liberto D, Vecchi A, La Manna MP, Buracchi C, Caccamo N, Salemo A, Dieli F, Mantovani A., 2007. Damping Excessive Inflammation and Tissue Damage in *Mycobacterium tuberculosis* Infection by Toll IL-1 Receptor 8/Single Ig IL-1-Related Receptor, a Negative Regulator of IL-1/TLR Signaling. *The Journal of Immunology*. 179 (5): 3119-3125
- Guo, Hongrui, Lian Chen, Hengmin Cui, Xi Peng, Jing Fang, Zhicai Zuo, Junliang Deng, Xun Wang dan Bangyuan Wu. 2016. Research Advances on Pathways of Nickel-Induced Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (10): 1-18
- Guyton, A.C., dan Hall, J.E. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 11*. Jakarta: EGC
- Haudek-Prinz, Verena J., Philip Klepeisz, Astrid Slany, Johannes Griss, Anastasia Meshcheryakova, Verena Paulitschke, Goran Mitulovic, Johannes Stöckland Christopher Gerner. 2012. Proteome Signatures of Inflammatory Activated Primary Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Proteomics*. 76(5): 150-162.

- Heravi F., Ramezani M., Poosti, M., Hosseini, M., Shajiei, A., dan Ahrari, F. 2013. In Vitro Cytotoxicity Assessment of an Orthodontic Composite Containing Titanium –dioxide Nano-particles. *Journal of Dental Research*, 7(4): 192-198
- Hikmah, Nuzulul dan I Dewa Ayu Ratna Dewanti.2010. Seputar Reaksi Hipersensitivitas (Alergi). *Stomatognatic (J.K.G Unej)*, 7 (2): 108-112
- Hosoki, M. dan Nishigawa, K. 2011. Dental Metal Allergy. *Journal InTech*
- Hundie, Gadissa Bedada, Dawit Woldemeskel, Amare Gessesse. 2016. Evaluation of Direct Colorimetric MTT Assay for Rapid Detection of Rifampicin and Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Journal Pone*, 1-14
- Hutomo, Suryani, Yanti Ivana Suryanto, Heni Susilowati, Agustinus Rudolf Phym, dan Devi Chrestella Maheswara. 2014. Ekspresi Caspase-3 pada Sel Epitel Rongga Mulut (Kb Cell Line) setelah Paparan Ekstrak Kopi. *Majalah Kedokteran Gigi*, 21(2): 122 – 126
- J. McGaw, Lyndy, Esameldin E. Elgorashi, Jacobus N. Eloff. 2014.8 - Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. 181-233
- Kalimuthu, S dan Kim Se-Kwon. 2013. Cell Survival and Apoptosis Signaling as Therapeutic Target for Cancer: Marine Bioactive Compounds. *Int. Journal. Marine Bioprocess Research Center, Pukyong National University*
- Khotimah, S.N. dan Muhtadi A. 2008. Review artikel: Beberapa Tumbuhan yang Mengandung Senyawa Aktif Antiinflamasi. *Jurnal Farmaka*, 4 (4)
- Kiattisin, Kanokwon, Thanaya Nantarat dan Pimporn Leelapornpisid. 2016. Evaluation of Antioxidant and Anti-tyrosinase Activities as Well as Stability of Green and Roasted Coffee Bean Extracts from Coffea arabica and Coffea canephora Grown in Thailand. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 8 (10); 182-192
- Končarević, Saša, Christopher Löbner, Karsten Kuhn, Thorsten Prinz, Ian Pike dan Hans-Dieter Zucht. 2014. In-Depth Profiling of the Peripheral Blood Mononuclear Cells Proteome for Clinical Blood Proteomics. *International Journal of Proteomics*. 1-9

- Kwok, A K H, C-K Yeung, T Y Y Lai, K-P Chan, C P Pang. 2004. Effects of Trypan Blue on Cell Viability and Gene Expression in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Br J Ophthalmol*. 1590–1594
- Lestari, Endang Wiji, Idha Haryanto, dan Surip Mawardi. 2009. Konsumsi Kopi Masyarakat Perkotaan dan Faktor-Faktor yang Berpengaruh: Kasus di Kabupaten Jember (Level of Coffee Consumption in Urban Community and Its Determinant Factors: Case Study in Jember District). *Pelita Perkebunan*, 25(3), 216-235
- Li, Weijia, Jing Zhou dan Yuyin Xu. 2015. Study of the In Vitro Citotoxicity Testing of Medical Devices (Review). *Biomedical Reports* 3, p. 617-620
- Manaari, Chaleb P., Edi Suryanto, Julius Pontoh. 2014. Aktivitas Penangkal Radikal Hidroksil Fraksi Flavonoid dari Limbah Tongkol Jagung pada Tikus Wistar. *Jurnal MIPA UNSRAT Online* 3 (2) : 134-138
- Makfoeld, Djarir. 2002. Kamus Istilah Pangan dan Nutrisi. Kaninus: Yogyakarta
- Marks, Dawn B, Allan D Marks, Colleen M. Smith. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar*. Jakarta : EGC
- Meerlo, J. 2011. Cell sensitivity assay: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 731(237): 45
- Murray, Robert K, Daryl K. Granner dan Victor W. Rodwell. 2009. *Biokimia Harper ed. 27*. Jakarta : EGC
- Najiyati, S dan Danarti. 2001. *Kopi, Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Nirwana, Intan dan R. Helal Soekartono. 2005. Sitotoksisitas resin akrilik hybrid setelah penambahan glass fiber dengan metode berbeda (Cytotoxicity of the hybrid acrylic resin after glass fiber reinforcement with difference method). *Maj. Ked. Gigi. (Dent. J.)*. 38 (2): 56–59
- Notoatmodjo, S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta : PT Rineka Cipta




- Oteiza, Patricia L, Alejandra G. Erlejman, Sandra V. Verstraeten, Carl L Keen dan Cesar G. Fraga. 2005. Flavonoid-membrane Interactions : A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface. *Clinical and Developmental Immunology*. 12 (1) : 19-25
- Panggabean, E. 2011. Buku Pintar Kopi. Jakarta: AgroMedia Pustaka.
- Prastowo, Bambang., Elna Karmawati, Rubijo, Siswanto, Chandra Indrawanto, S. Joni Munarso. 2010. Budidaya dan Pasca Panen Kopi. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan
- Parwata, I Made Oka Adi. 2015. *Bahan Ajar Uji Bioaktivitas Antioksidan*. Universitas Udayana : Kimia Terapan
- Pubchem. 2017. Trypan Blue. [on line] <http://Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- Rachmawati, D., Bontkes, H.J., Verstege, M.I., Muris, J., Blomberg, B., Scheper, R.J. dan Hoogstraten, I. 2013. Transition Metal Sensing by Toll-like receptor-4: Next to Nickel, Cobalt and Palladium are Potent Human Dendritic Cell Stimulators. *Contact Dermatitis* 68: 331-338
- Rachmawati, Dessy. 2016. *Innate Immune Reactivity to Dental Alloy*. Amsterdam: Vrije Universiteit
- Rahardjo, Pudji. 2012. *Kopi*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Ramanaviciene, Almira, Mostovojus, Voktoras, Bachmatova, Iriana, dan Ramanavicius. 2003. Anti-bacterial Effect on Caffeine on *Eschericia coli* and *Pseudomonas floescens*. *Journal Acta Medica Lituania*. 10 (4): 185-188.
- Saito, M., Arakaki R. dan Ishimaru N. 2016. Molecular Mechanisms of Nikel Allergy. *Int J Mol Sci*, 17 (2): 202
- Santoso, Broto, Rifqi Satrio Utomo, dan Muhammad Dhuha Wiyoga. 2016. Analisis Hubungan Senyawa Golongan Flavonoid dari 24 Famili Tanaman terhadap Aktivitas Penangkap Radikalnya. *Prosiding Seminar Nasional Kimia UNJANI-HKI 2016*

- Schmidt, Marc, Badrinarayanan Raghavan, Verena Muller, Thomas Vogl, Gyorgy Fejer, Sandrine Tchaptchet, Simone Keck, Christoph Kalis, Peter J Neilsen, Chris Galanos, Johannes Roth, Arne Skerra, Stefan F Martin, Marina A Freudenberg dan Matthias Goebeler. 2010. Crucial Role for Human Toll-like Receptor 4 in the Development of Contact Allergy to Nickel. *Nature Immunology*, 11 : 814-819
- Sari, Liza Meutia. 2018. Apoptosis : Mekanisme Molekular Kematian Sel. *Cakradonya Dent J*, 10 (2): 65-70
- Sayuti, K, Rina Yenrina. 2015. Antioksidan Alami dan Sintetik. *Andalas University Press*
- SEH, El-Nabi., Dawoud GTM, El-Garawani IM, El Shafey SS. 2018. HPLC Analysis of Phenolic Acids, Antioxidant Activity and In Vitro Effectiveness of Green and Roasted *Coffea Arabica* Bean Extract: A Comparative Study. *Anticancer Agents Med Chem*.
- Siregar, F. dan B. Hadijono. 2000. Uji Sitotoksitas dengan MTT Esei. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia* 7:29-30
- Soesetijo, FX Adi. 2012. Evaluasi Kekerasan Restorasi Nikel-Kromium dengan Berbagai Metode Casting. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Jember Stomatognatic*, 9 (3) 2 :145 – 151
- Sparrow, Giles. 2015. The Elements Nickel. New York : Marshall Cavendish Corporation
- Sumule, Indri, P.S Anindita, Olivia A. Waworuntu. 2015. Pelepasan Ion Nikel dan Kromium Braket Stainless Steel yang Direndam dalam Minuman Berkarbonasi. *Jurnal e-GiGi*, 3(2): 464-469
- Supriyadi. 2008. Evaluasi Apoptosis Sel Odontoblas Akibat Paparan Radiasi Ionisasi. *Indonesian Journal of Dentistry*, 15(1): 71-76
- Tanauma, Hizkia Alesta, Gayatri Citraningtyas dan Widya Astuty Lolo. 2016. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmiah Farmasi Pharmacon*, 5 (4): 243-251

- Tarahovsky, Yuri S. 2008. Plant Polyphenols in Cell-Cell Interaction and Communication. *Plant Signalling and Behavior*. 3 (8): 609-611
- Tran, Seav-Ly, Andrea Puhar, Maud Ngo-Camus, Nalini Ramarao. 2011. Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *Plos One Journal*, 6 (9), 1-5
- Warnasih, Siti, W. Yulia, B. Yohan, I.M. Artika dan R.T. Sasmono. 2016. Isolasi Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) dari Darah Manusia Sehat dengan Metode Sentrifugasi Gradien Ficoll. *Ekologia*, 16 (1) : 19-23
- Wataha, John C, Jeanie L Drury dan Whasun O Chung. 2013. Nickel Alloys in the Oral Environment. *Expert Rev. Med. Devices*, 10 (4), 519-539
- Zamble, Deborah, Magdalena Rowinska-Zyrek dan Henryk Kozlowski. 2017. *Metallobiology Series No. 10 : The Biological Chemistry of Nickel*. British : The Royal Society of Chemistry 2017

Lampiran A. Surat Keterangan

A.1 Ethical clearance

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</p>	
<p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL No. 053/UN25.8/KEPK/DL/2018</p>	
Title of research protocol	: "The Effectiveness of Robusta Coffee Bean Extract (<i>Coffea canephora</i>) as a Review of The Toxic Effects of Nickel Compounds on PBMC"
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Fadylla Nuansa Citra Bening
Member of research	: Indah Putri Arifiana Dewi
Responsible Physician	: Fadylla Nuansa Citra Bening
Date of approval	: March 28 th , 2018
Place of research	: 1. Laboratory of Bioscience Faculty of Dentistry Universitas Jember
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p>	
<p>Jember, April 2nd, 2018</p>	
<p>Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>	<p>Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>
 <p>dr. P. Wahardyan P. M. Kes, Sp. Pros</p>	 <p>dr. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M. Si</p>

A.2 Surat Identifikasi Tanaman

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
POLITEKNIK NEGERI JEMBER
LABORATORIUM TANAMAN**

Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531
E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 012/ PL17.3.1.03/LL/2018

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan 1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 1362/UN25.8/TL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada specimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Fadylla Nuansa Citra Bening
NIM : 141610101046
Jur/Fak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

Maka dapat disampaikan hasilnya bahwa specimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah: *Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub Kelas: Asteridae; Ordo: Rubiales; Famili: Rubicidae; Genus: Coffea; Spesies: Coffea canephora, Pierre*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 1 Maret 2018

Ka. Laboratorium Tanaman


Ir. Lili Mastuti, MP
NIP. 195808201987032001



A.3 Informed Consent

SURAT PERSETUJUAN
INFORMED CONSENT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Zakyya Ulaiyah
Usia : 20 tahun
Jenis Kelamin : Perempuan

Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari:

Nama : Fadylla Nuansa Citra Bening
NIM : 141610101046
Fakultas : Kedokteran Gigi

Dengan judul penelitian "Efektivitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dalam Menghambat Efek Toksik Senyawa Nikel pada Sel PBMC" dimana prosedur pelaksanaan penelitian untuk pengambilan sampel ini tidak akan menimbulkan resiko bagi subjek yang bersangkutan.

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

Jember,
Yang menyatakan


()

A.4 Surat Keterangan Pembuatan Ekstrak



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS FARMASI
Jl. Kalimantan 1/2 Kampus Tegal Boto. Telp./ Fax. (0331) 324736 Jember 68121

SURAT KETERANGAN PEMBUATAN EKSTRAK

Data pemohon :





Nama : Fadylla Nuansa C.B.
NIM : 141610101046
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember





Bahan : Biji Kopi *Robusta* (*Coffea canephora*)
Pelarut Pengekstraksi : Ethanol 96%
Metode ekstraksi : Maserasi
Prosedur : Serbuk biji kopi *Robusta* (*Coffea canephora*) sebanyak 850 gram dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 4 kali berat serbuk selama 3 hari. Maserat dipekatkan dengan rotary evaporator.
Hasil : Ekstrak biji kopi *Robusta* dengan rendemen 15 % (b/b)
Tanggal pembuatan : 30 Januari 2018

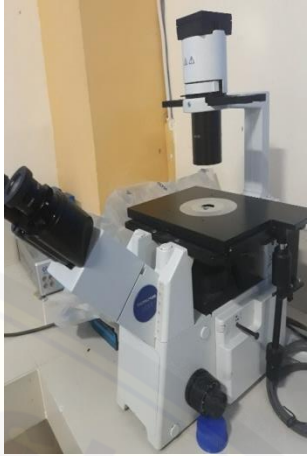

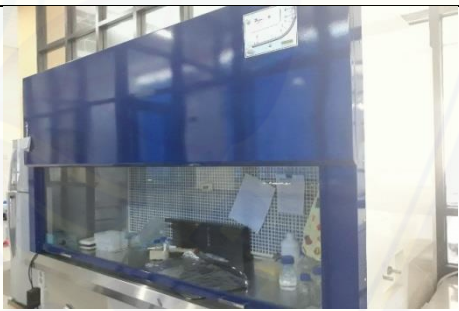

Jember, 2 Februari 2018
Ketua Bagian Biologi Farmasi,





Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP. 198407122008122002


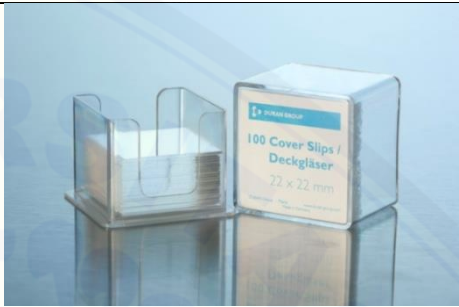

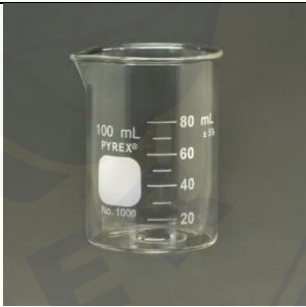

Lampiran B. Alat dan Bahan Penelitian**B.1 Alat Penelitian**

No	Nama Alat	Gambar Alat
1	ELISA Reader	
2	Syringe	
3	Botol Duran	
4	Vortex	

<p>5</p>	<p>Tabung Falcon</p>	
<p>6</p>	<p><i>Microplate-96 well</i></p>	
<p>7</p>	<p>Neraca timbang</p>	
<p>8</p>	<p><i>Centrifuge</i></p>	



9	Mikroskop <i>inverted</i>	
10	Shaker incubator	
11	Laminar Flow Cabinet	
12	Erlemenyer	



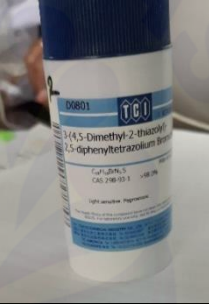


13	Pipet mikro	
14	Petridish	
15	Tourniquet	
16	Micropipet	




17	Tabung heparin	
18	Coverslip	
19	Rak tabung	
20	Gelas ukur	
21	<i>Filter syringe</i>	

22	Tabung <i>ependorf</i>	
23	<i>Yellow tip</i> dan <i>blue tip</i>	




B.2 Bahan Penelitian




No	Nama Bahan	Gambar Bahan
1	Darah vena kapiler	
2	Aquadest	

3	M199	
4	RPMI	
5	MTT	
6	DMSO	
7	Ekstrak biji kopi robusta	



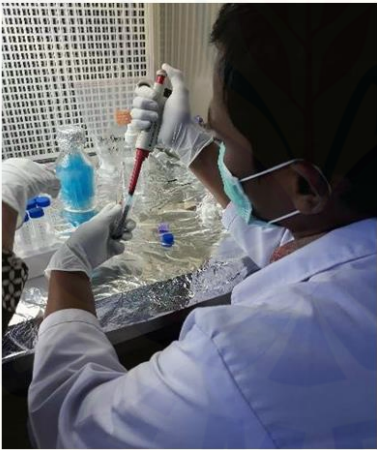

8	Larutan $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		
9	PBS		
10	Alkohol		

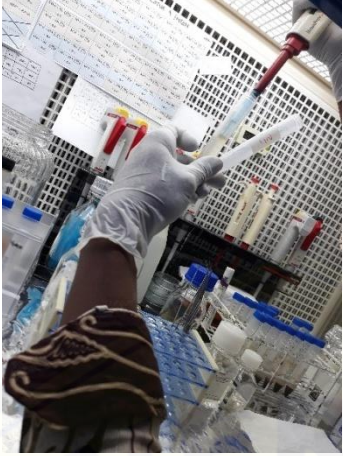



Lampiran C. Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)



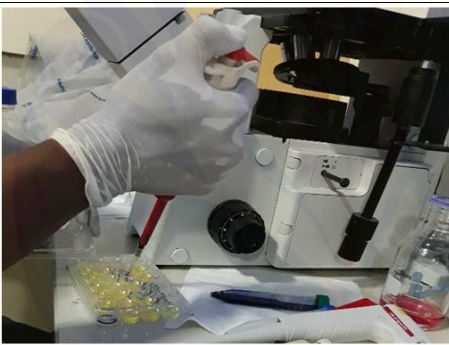
NO	Gambar	Tahapan
1	 A digital scale with a blue display showing '250.64' and 'BS600H 600g/0.01g'. A white plastic container filled with a light-colored powder is placed on the scale.	Menimbang biji kopi robusta yang telah dihaluskan sebanyak 500 gram
2	 A hand is pouring a clear liquid from a glass beaker into a glass jar. The jar already contains a small amount of coffee powder.	Biji kopi robusta yang telah dihaluskan, direndam dengan etanol 96% dengan perbandingan 1:4
3	 A glass jar with a red lid. The jar is filled with a yellowish-green liquid. At the bottom of the jar, there is a layer of coffee powder.	Dimaserasi selama 3 hari

4		Biji kopi robusta yang telah dimaserasi, disaring dengan kertas saring
5		Biji kopi robusta yang telah disaring, dievaporasi dengan <i>rotary evaporator</i> sehingga didapatkan ekstrak 100%
6		Ekstrak biji kopi robusta 100%

Lampiran D. Isolasi PBMC

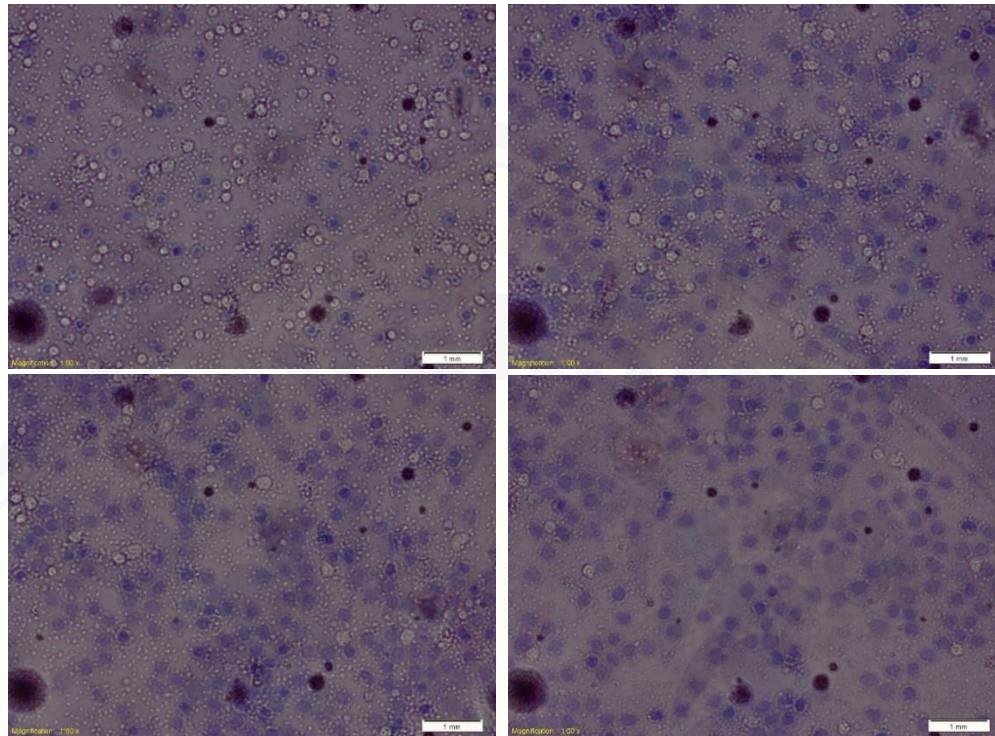
NO	Gambar	Tahapan
1		Pengambilan darah
2		Darah vena kapiler pada tabung heparin
3		Alirkan darah secara perlahan ke dalam tabung falcon
4		Sentrifugasi selama 10 menit

<p>5</p>		<p>Pengambilan sel PBMC</p>
<p>6</p>		<p>Penanaman sel di <i>well plate</i> dan tambahkan media kultur RPMI</p>
<p>7</p>	 <p> → Plasma → PBMC → Lymphoprep → Eritrosit </p>	
<p>8</p>		<p>Inkubasi 30 menit</p>

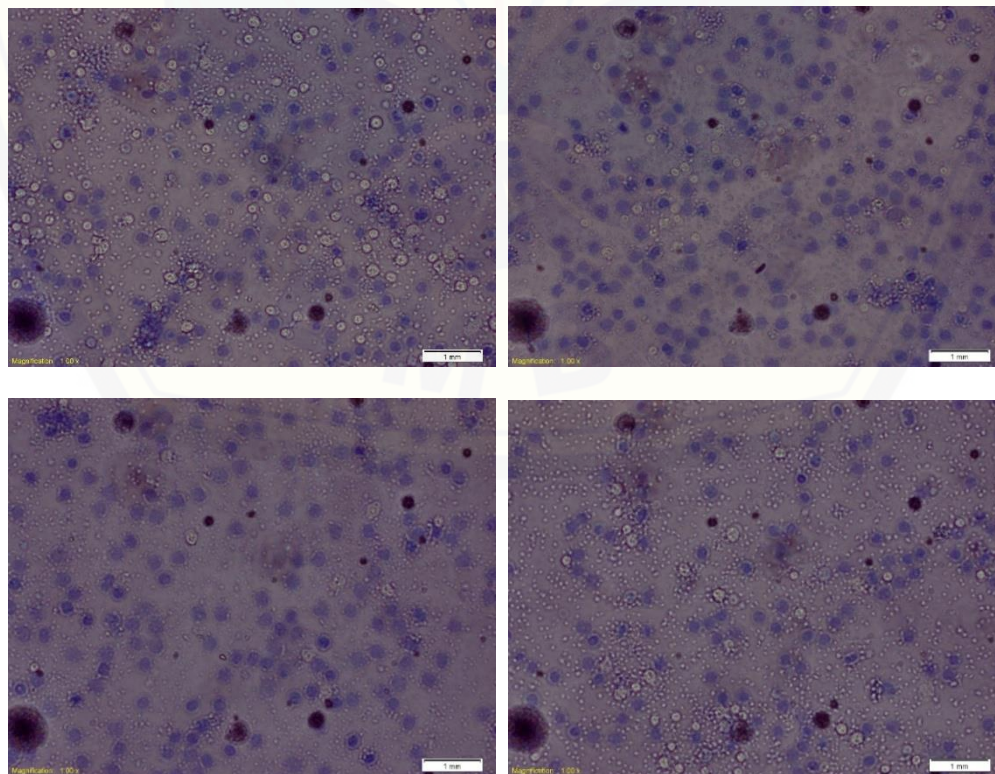
9		Penggantian media kultur M199 dan pemberian perakuan nikel dan kopi
10		Inkubasi sel 1 jam
11		Uji viabilitas <i>trypan blue</i> dengan mikroskop inverted

Lampiran E. Hasil Penelitian Pendahuluan

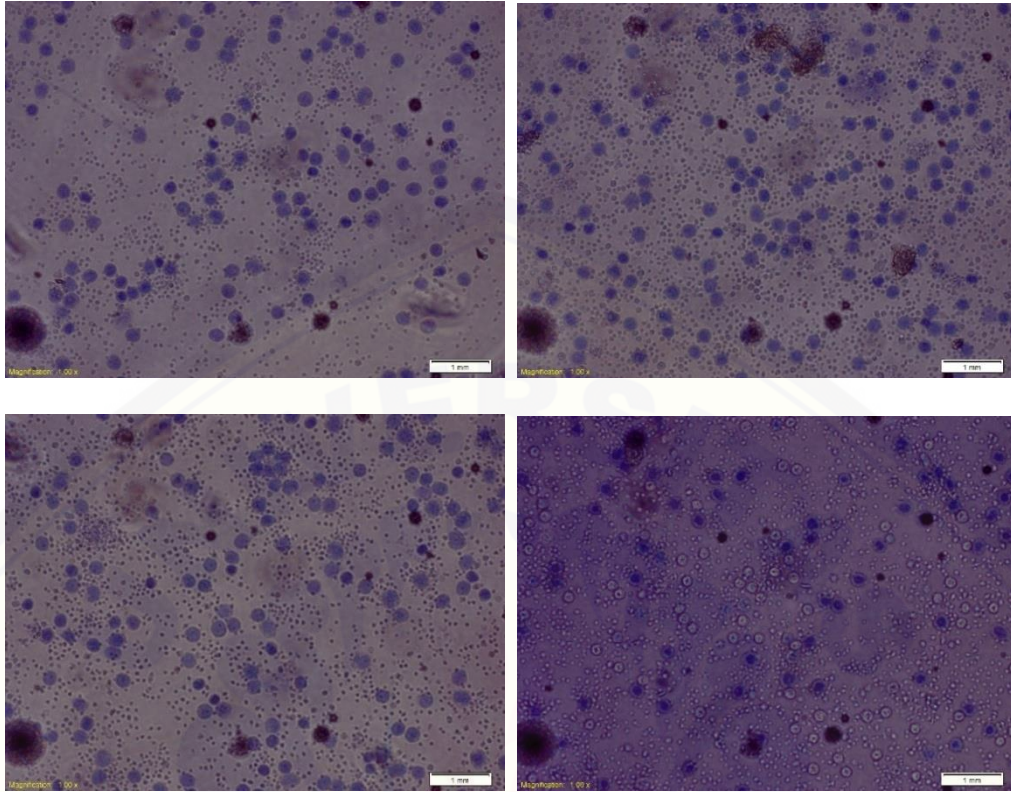
PBMC + Nikel 250 μ M



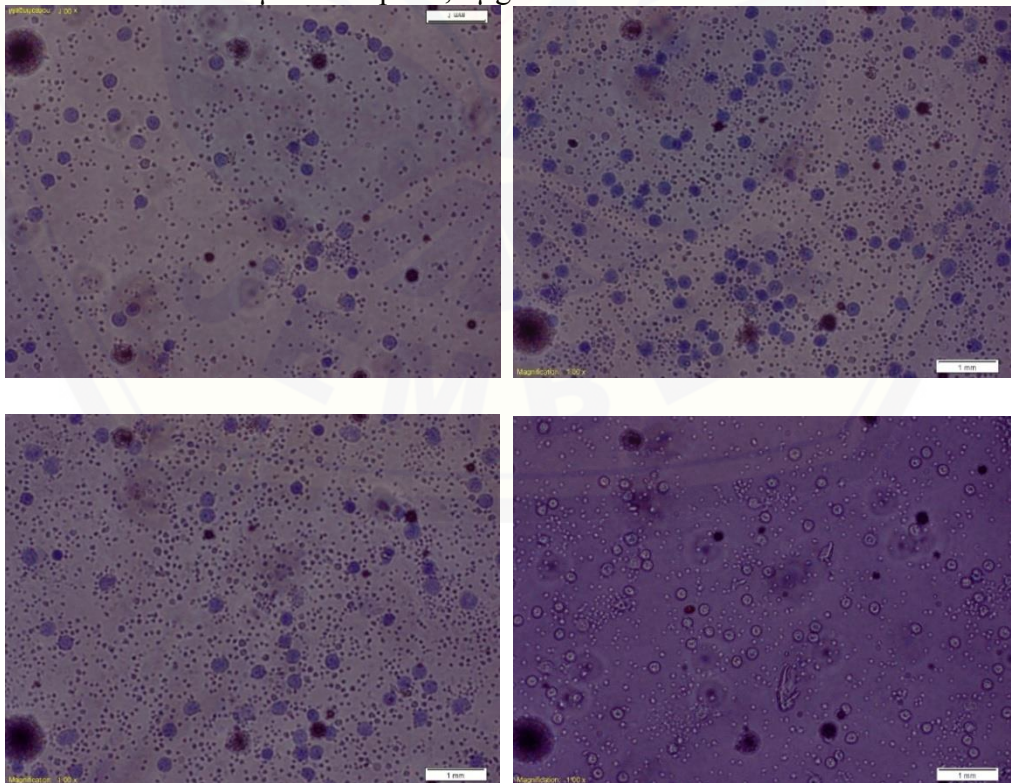
PBMC + Nikel 500 μ M



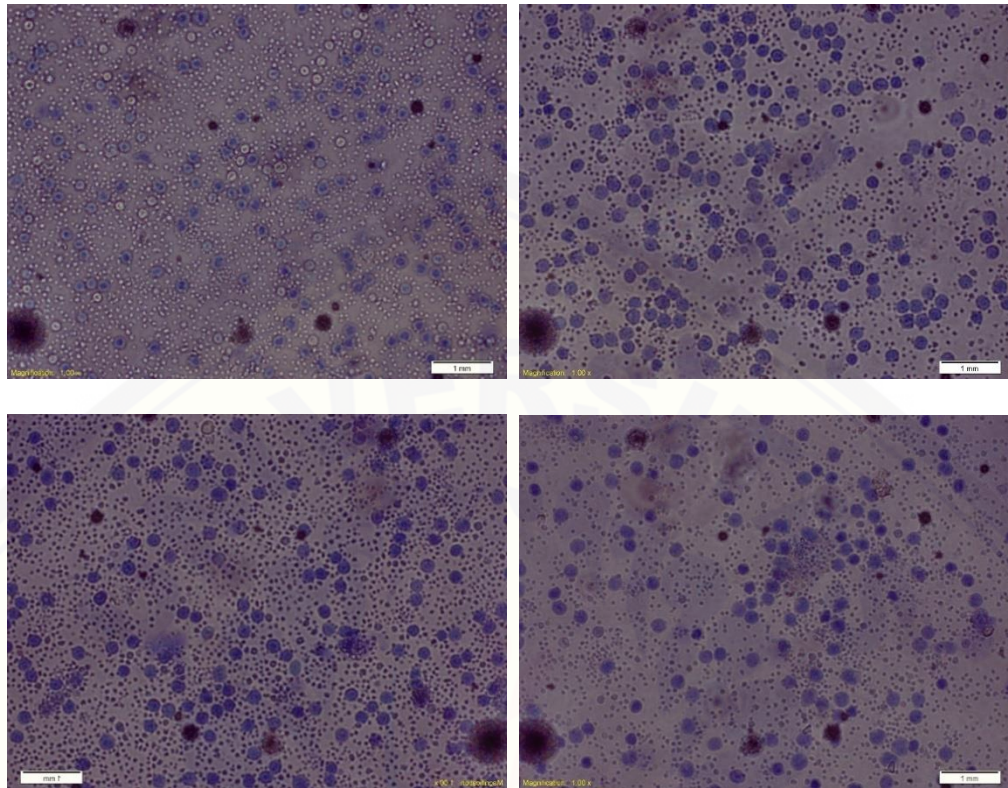
PBMC + Nikel 250 μ M + Kopi 125 μ g/ml



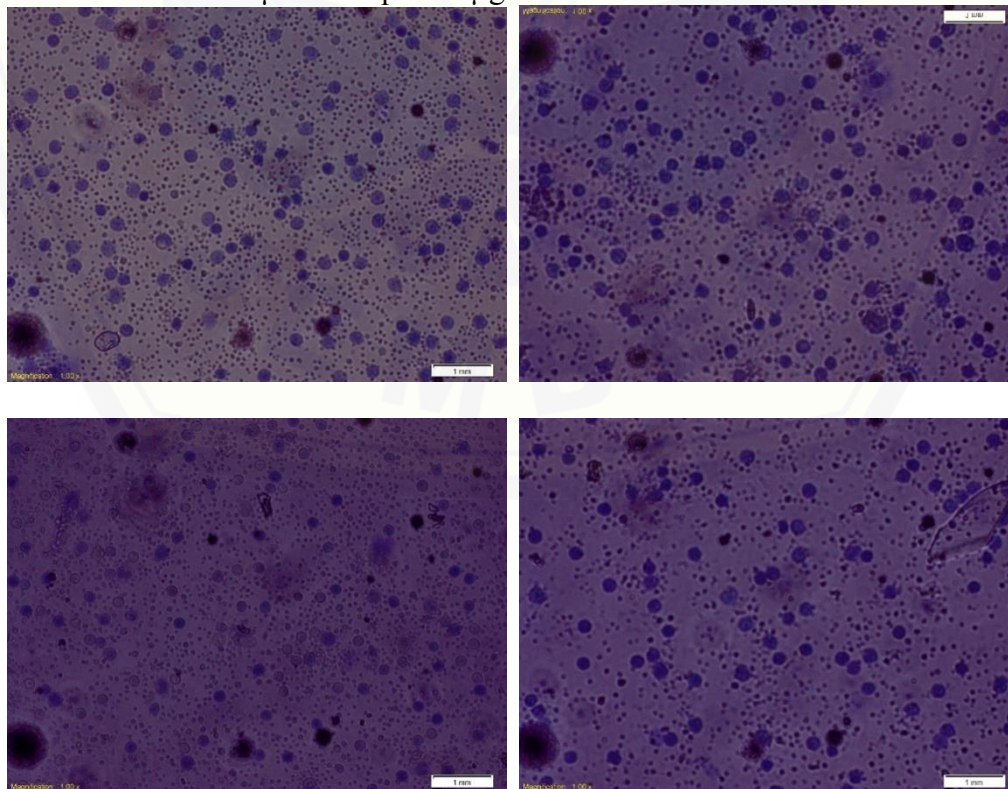
PBMC + Nikel 250 μ M + Kopi 62,5 μ g/ml



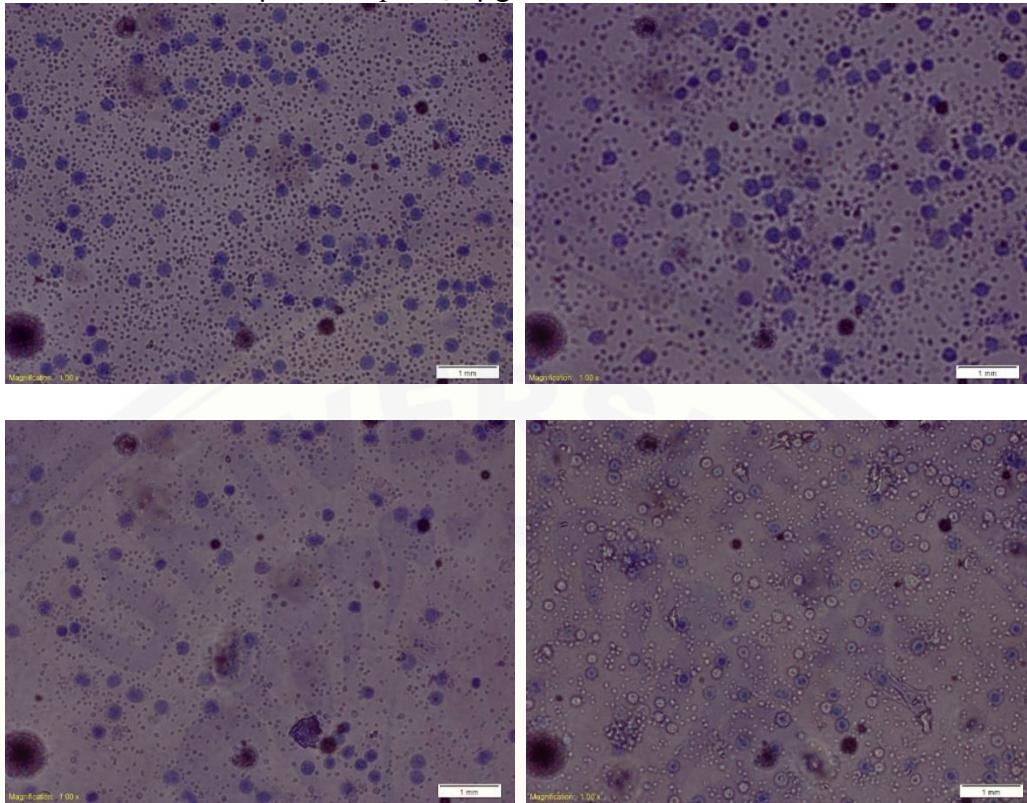
PBMC + Nikel 250 μ M + Kopi 31,25 μ g/ml



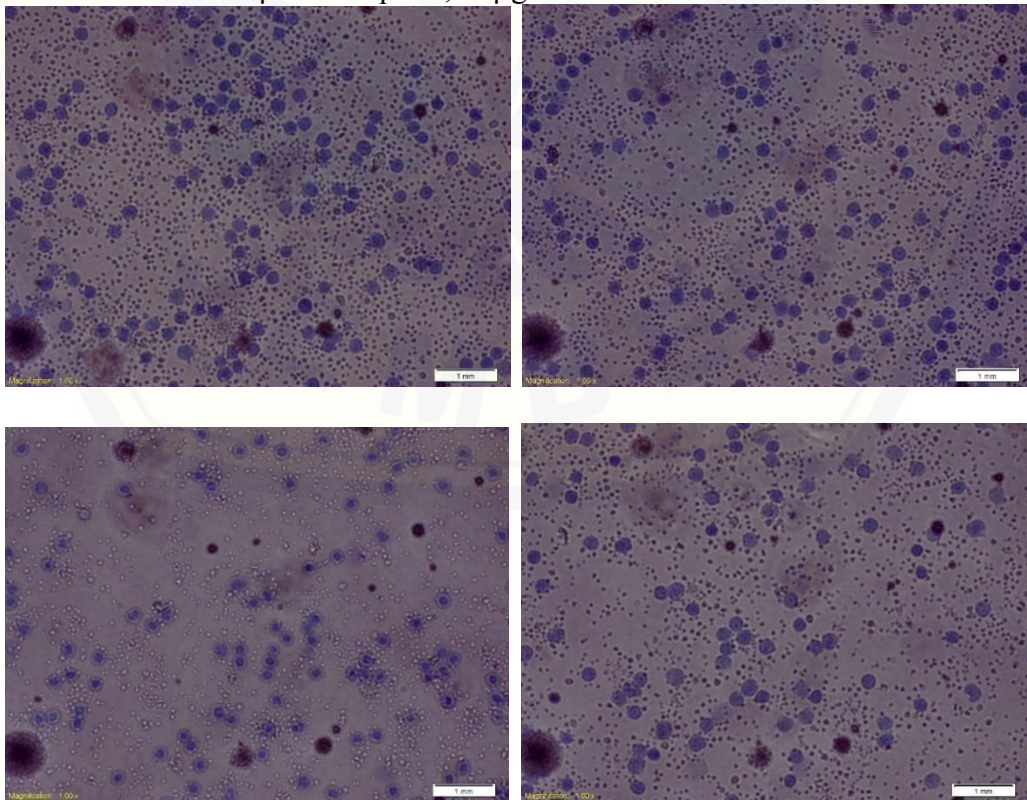
PBMC + Nikel 500 μ M + Kopi 125 μ g/ml



PBMC + Nikel 500 μ M + Kopi 62,5 μ g/ml

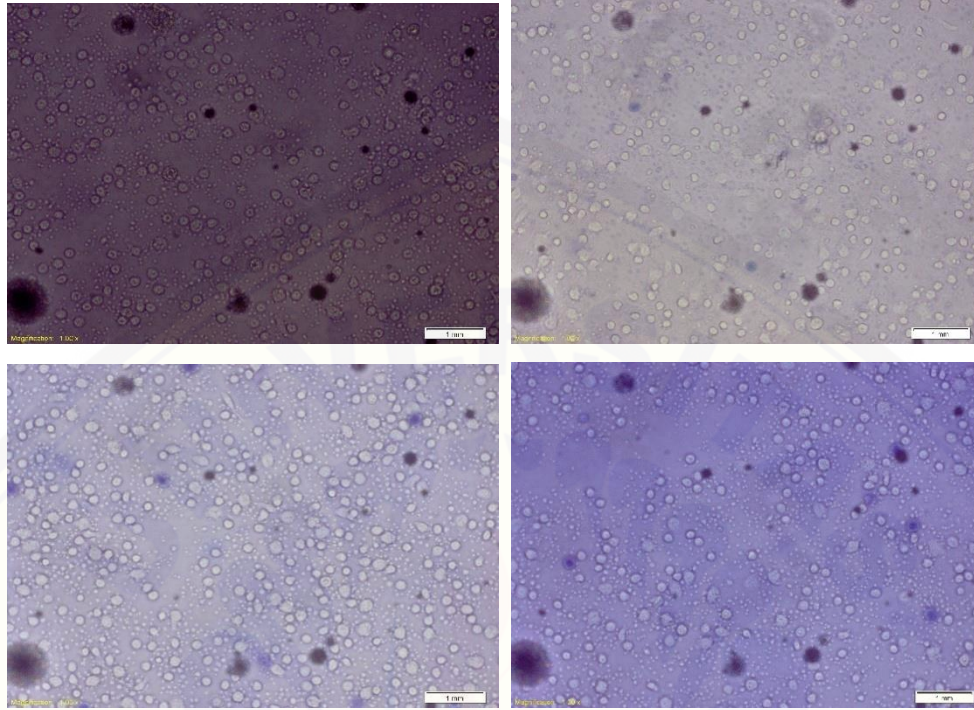


PBMC + Nikel 500 μ M + Kopi 31,25 μ g/ml

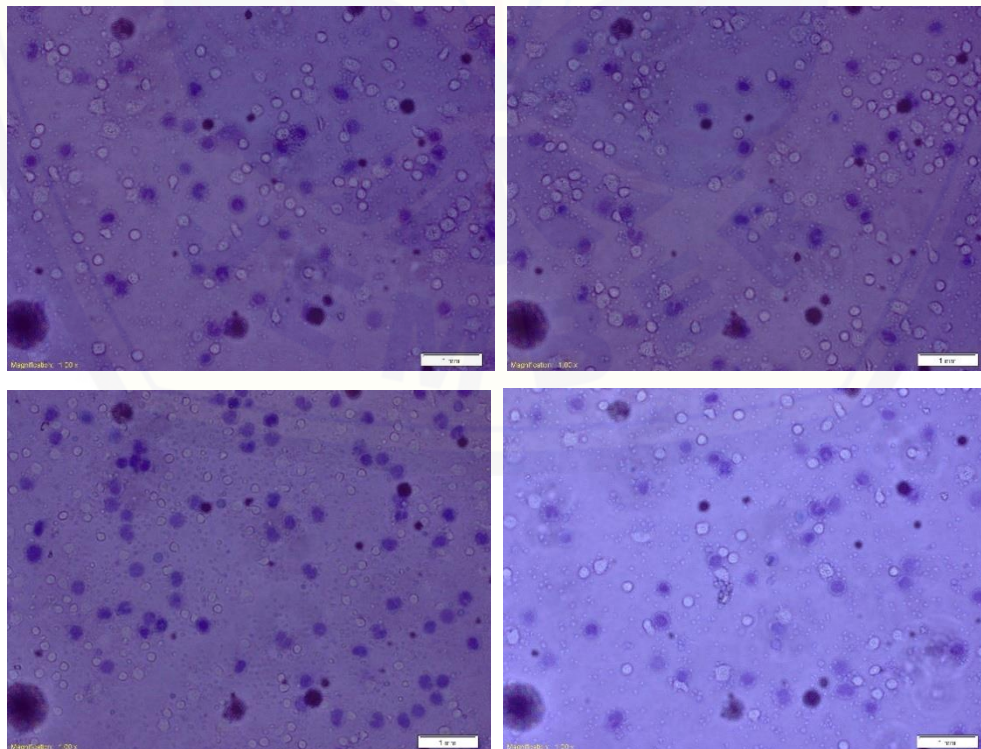


Lampiran F. Hasil Penelitian

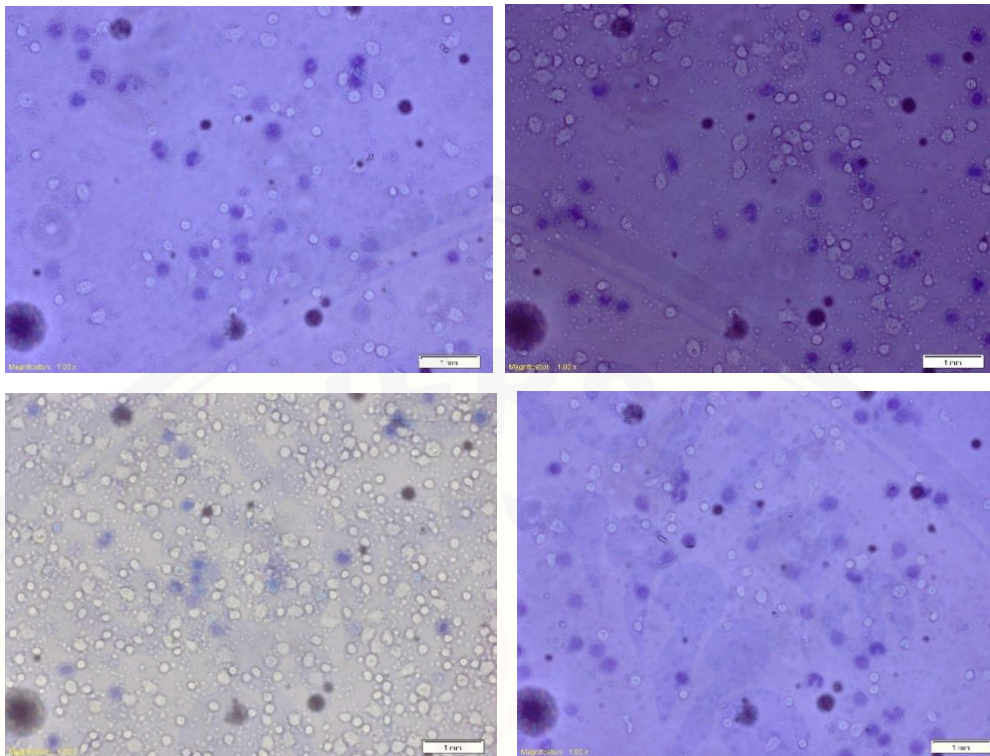
PBMC + Kultur media



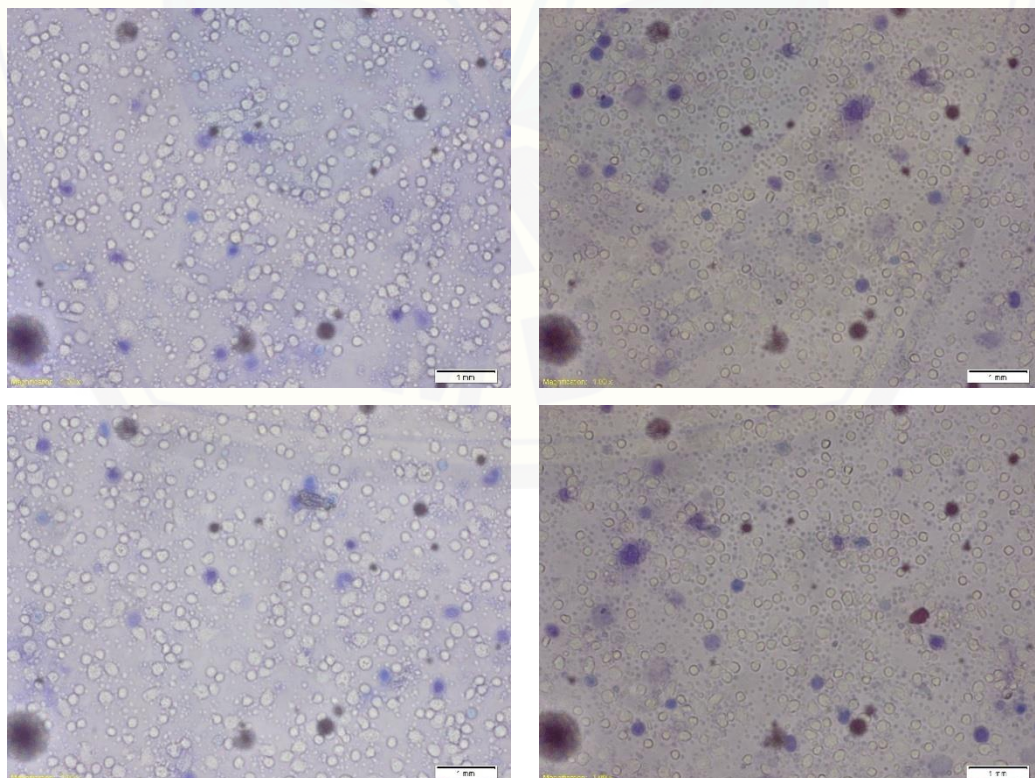
PBMC + Nikel 125 μ M



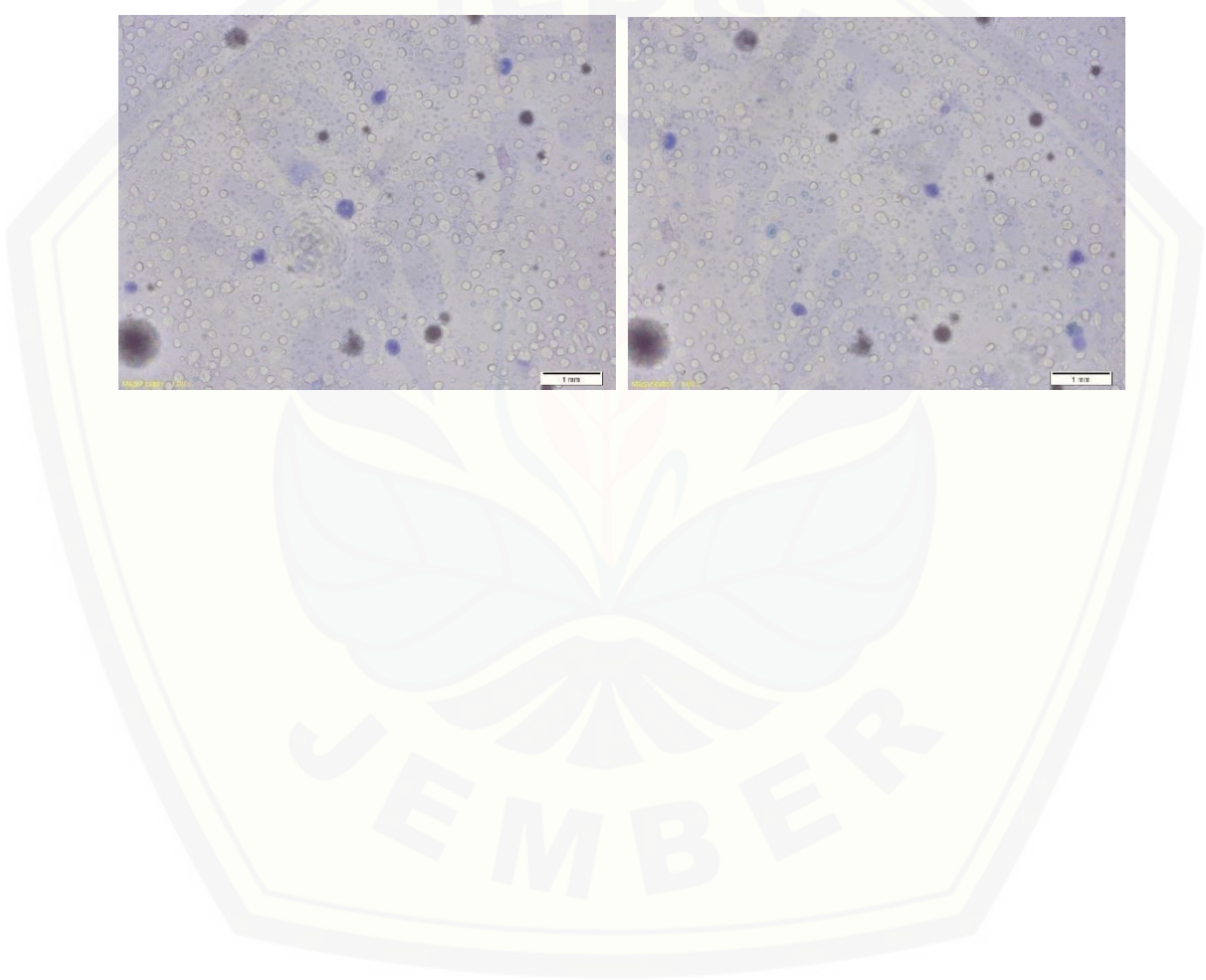
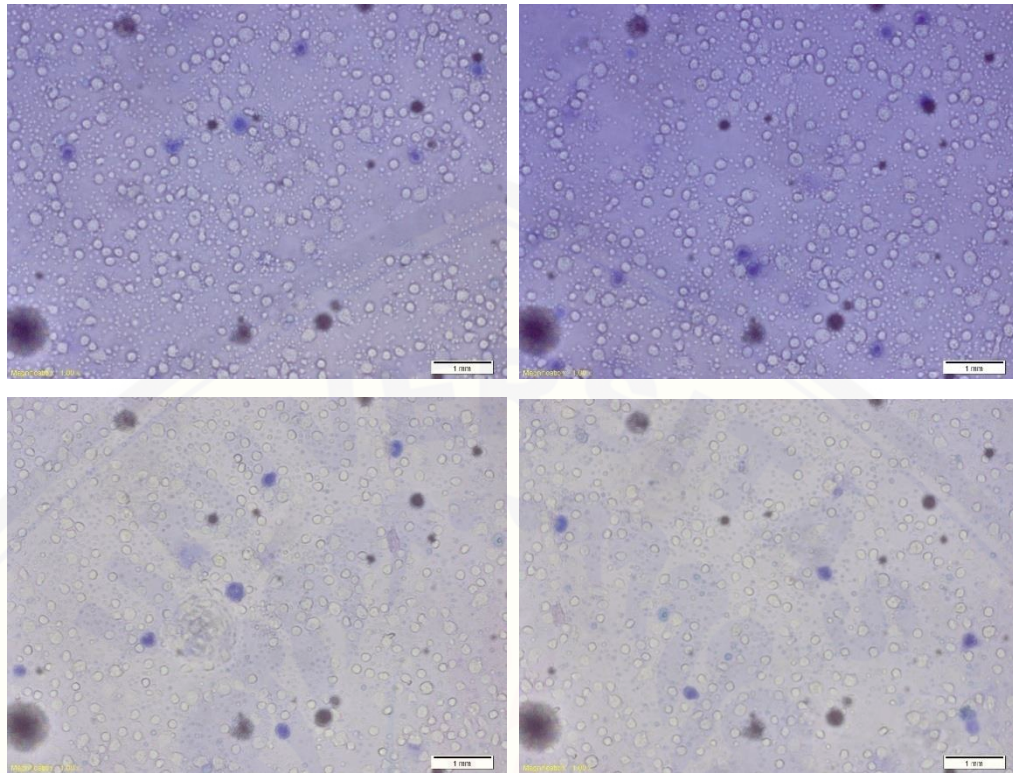
PBMC + Nikel 125 μ M + Kopi 125 μ g/ml



PBMC + Nikel 125 μ M + Kopi 62,5 μ g/ml



PBMC + Nikel 125 μ M + Kopi 31,25 μ g/ml



Lampiran G. Analisis Data

G.1. Analisis Data Hasil Penelitian dengan Uji *Trypan Blue*

% Viabilitas			
Kelompok	Mean	N	Std. Deviation
Kontrol	94.6200	4	.44930
Nikel	83.4425	4	.14841
Konsentrasi 125 %	85.7925	4	.32887
Konsentrasi 62.5 %	87.1900	4	.20116
Konsentrasi 31.25 %	90.4900	4	.52428
Total	88.3070	20	4.00890

a. Uji Normalitas *Shapiro wilk*

	Kelompok	Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.
% Viabilitas	Kontrol	.952	4	.729
	Nikel	.950	4	.715
	Konsentrasi 125 %	.882	4	.347
	Konsentrasi 62.5 %	.962	4	.792
	Konsentrasi 31.25 %	.963	4	.798

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji Homogenitas *Levene test*

% Viabilitas			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.749	4	15	.574

c. Uji Beda *One Way Anova*

% Viabilitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	303.413	4	75.853	585.845	.000
Within Groups	1.942	15	.129		
Total	305.355	19			

d. Uji Beda Lanjutan LSD (*Least Significance Difference*)

Dependent Variable: % Viabilitas						
LSD						
(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Nikel	11.17750*	.25444	.000	10.6352	11.7198
	Konsentrasi 125 %	8.82750*	.25444	.000	8.2852	9.3698
	Konsentrasi 62.5 %	7.43000*	.25444	.000	6.8877	7.9723
	Konsentrasi 31.25 %	4.13000*	.25444	.000	3.5877	4.6723
Nikel	Kontrol	-11.17750*	.25444	.000	-11.7198	-10.6352
	Konsentrasi 125 %	-2.35000*	.25444	.000	-2.8923	-1.8077
	Konsentrasi 62.5 %	-3.74750*	.25444	.000	-4.2898	-3.2052
	Konsentrasi 31.25 %	-7.04750*	.25444	.000	-7.5898	-6.5052
Konsentrasi 125 %	Kontrol	-8.82750*	.25444	.000	-9.3698	-8.2852
	Nikel	2.35000*	.25444	.000	1.8077	2.8923
	Konsentrasi 62.5 %	-1.39750*	.25444	.000	-1.9398	-.8552
	Konsentrasi 31.25 %	-4.69750*	.25444	.000	-5.2398	-4.1552
Konsentrasi 62.5 %	Kontrol	-7.43000*	.25444	.000	-7.9723	-6.8877
	Nikel	3.74750*	.25444	.000	3.2052	4.2898
	Konsentrasi 125 %	1.39750*	.25444	.000	.8552	1.9398
	Konsentrasi 31.25 %	-3.30000*	.25444	.000	-3.8423	-2.7577
Konsentrasi 31.25 %	Kontrol	-4.13000*	.25444	.000	-4.6723	-3.5877
	Nikel	7.04750*	.25444	.000	6.5052	7.5898
	Konsentrasi 125 %	4.69750*	.25444	.000	4.1552	5.2398
	Konsentrasi 62.5 %	3.30000*	.25444	.000	2.7577	3.8423

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

G.2. Analisis Data Hasil Penelitian dengan Uji MTT

% Viabilitas			
Kelompok	Mean	N	Std. Deviation
Kontrol	100.0000	4	.00000
Nikel	84.6475	4	9.04635
Konsentrasi 125 %	86.6475	4	8.69841
Konsentrasi 62.5 %	94.9300	4	1.78376
Konsentrasi 31.25 %	98.4775	4	.19602
Total	92.9405	20	8.12233

a. Uji Normalitas *Shapiro wilk*

	Kelompok	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
% Viabilitas	Nikel	.981	4	.908
	Konsentrasi 125 %	.981	4	.905
	Konsentrasi 62.5 %	.851	4	.228
	Konsentrasi 31.25 %	.921	4	.545

a. % Viabilitas is constant when Kelompok = Kontrol. It has been omitted.

b. Lilliefors Significance Correction

b. Uji Homogenitas *Levene test*

% Viabilitas				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
4.654	4	15	.012	

c. Uji Beda *Kruskal Wallis*

Data tidak normal dan tidak homogen

% Viabilitas	
Chi-Square	15.863
Df	4
Asymp. Sig.	.003

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

d. Uji Beda Lanjutan Mann Whitney

1. Kelompok kontrol dan kelompok nikel

Test Statistics^b

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

2. Kelompok kontrol dan kelompok nikel + kopi 31,25 µg/ml

Test Statistics^b

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

3. Kelompok kontrol dan kelompok nikel + kopi 62,5 µg/ml

Test Statistics^b

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.477
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

4. Kelompok kontrol dan kelompok nikel + kopi 125 $\mu\text{g/ml}$ **Test Statistics^b**

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

5. Kelompok nikel dan kelompok nikel + kopi 31,25 $\mu\text{g/ml}$ **Test Statistics^b**

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

6. Kelompok nikel dan kelompok nikel + kopi 62,5 $\mu\text{g/ml}$ **Test Statistics^b**

	Viabilitas
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	13.000
Z	-1.452
Asymp. Sig. (2-tailed)	.146
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

7. Kelompok nikel dan kelompok nikel + kopi 125 $\mu\text{g/ml}$ **Test Statistics^b**

	Viabilitas
Mann-Whitney U	6.500
Wilcoxon W	16.500
Z	-.436
Asymp. Sig. (2-tailed)	.663
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

8. Kelompok nikel+kopi 31,25 $\mu\text{g/ml}$ dan kelompok nikel+ kopi 62,5 $\mu\text{g/ml}$ **Test Statistics^b**

	Viabilitas
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	11.500
Z	-2.013
Asymp. Sig. (2-tailed)	.044
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

9. Kelompok nikel+kopi 31,25 $\mu\text{g/ml}$ dan kelompok nikel+kopi 125 $\mu\text{g/ml}$ **Test Statistics^b**

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

10. Kelompok nikel+kopi 62,5 µg/ml dan kelompok nikel+kopi 125 µg/ml

Test Statistics^b

	Viabilitas
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	13.000
Z	-1.452
Asymp. Sig. (2-tailed)	.146
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

