



**EFEK SEDUHAN BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)
TERHADAP JUMLAH SEL LIMFOSIT PADA TIKUS WISTAR
JANTAN YANG DIINDUKSI *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Oleh

Okta Fitri Nurhayati

151610101048

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2019



**EFEK SEDUHAN BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)
TERHADAP JUMLAH SEL LIMFOSIT PADA TIKUS WISTAR
JANTAN YANG DIINDUKSI *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

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

Oleh

Okta Fitri Nurhayati

151610101048

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orangtua saya, bapak Sugiyanto dan ibu Alisti Dwi Poerwati yang selalu memberikan dukungan dan doa sehingga saya bisa menyelesaikan skripsi.
2. Kakak saya tercinta Lisa Febriana Nur Wijayanti yang selalu mengingatkan saya untuk segera menyelesaikan skripsi.
3. Guru-guru saya dari taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi
4. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

MOTTO

“Hai orang-orang yang beriman, bersabarlah kalian dan kuatkanlah kesabaran kalian dan tetaplah bersiap siaga (di perbatasan negeri kalian) dan bertakwalah kepada Allah supaya kalian beruntung ” (terjemahan Q.S. Ali-Imran: 200) ^{*)}

Dia (Ibrahim) berkata, “Tidak ada yang berputus asa dari rahmat Tuhannya, kecuali orang yang sesat” (terjemahan Q.S. Al-Hijr: 56) ^{*)}

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2009. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Jakarta: Pustaka al-Fatih

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Okta Fitri Nurhayati

NIM : 151610101048

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Seduhan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Jumlah Sel Limfosit pada Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi *Staphylococcus aureus*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 8 Mei 2019

Yang menyatakan,

Okta Fitri Nurhayati

NIM 151610101048

SKRIPSI

**EFEK SEDUHAN BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)
TERHADAP JUMLAH SEL LIMFOSIT PADA TIKUS WISTAR
JANTAN YANG DIINDUKSI *Staphylococcus aureus***

Oleh

Okta Fitri Nurhayati

151610101048

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Dr.drg. Masniari Novita, M.Kes, Sp.OF

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Budi Yuwono, M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Seduhan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Jumlah Sel Limfosit pada Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi *Staphylococcus aureus*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Rabu, 8 Mei 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Utama

drg. Roedy Budirahardjo, M.Kes, Sp.KGA
NIP. 196407132000121001

Pembimbing Utama

Dr.drg. Masniari Novita, M.Kes, Sp.OF
NIP. 196811251999032001

Penguji Anggota

drg. Sri Lestari, M.Kes
NIP. 196608191996012001

Pembimbing Pendamping

drg. Budi Yuwono, M.Kes
NIP.196709141999031002

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Efek Seduhan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Jumlah Sel Limfosit pada Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi *Staphylococcus aureus*;Okta Fitri Nurhayati, 151610101048;2019; 58 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Inflamasi merupakan suatu respon pertahanan tubuh terhadap adanya trauma meliputi trauma fisik dan trauma kimia ataupun adanya mikroorganisme patogen. Mikroorganisme patogen yang sering menimbulkan inflamasi adalah bakteri. Salah satu bakteri yang dianggap sering menyebabkan inflamasi adalah bakteri golongan *Streptococcus* dan *Staphylococcus*. *Staphylococcus* dianggap sebagai penyebab infeksi baik pada manusia maupun pada hewan. Proses Inflamasi yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dapat terjadi karena adanya eksotoksin yang dimiliki bakteri gram positif pada umumnya. Untuk menekan adanya inflamasi biasanya digunakan obat-obatan sintesis berupa NSAID (*Non Steroid Anti Inflammatory Drugs*) ataupun kortikosteroid. Namun penggunaan NSAID ataupun kortikosteroid dapat menimbulkan efek samping berupa reaksi alergi diantaranya mual, muntah, pusing, urtikaria dan diare. Maka dari itu diperlukan alternatif lain untuk mengatasi efek samping dari obat-obatan sintesis tersebut. Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah tersebut adalah menggunakan tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*). Kopi robusta mempunyai banyak kandungan yang berguna untuk tubuh, senyawa aktif yang terkandung dalam kopi adalah polifenol dan alkaloid. Senyawa polifenol dalam kopi adalah asam klorogenat dan asam ferulat, komponen kimia lain yang terkandung di dalam kopi adalah kafein. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian seduhan biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap jumlah sel limfosit pada tikus Wistar jantan yang diinduksi *Staphylococcus aureus*.

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris. Pada penelitian ini menggunakan rancangan *the post test only control group design*. Besar sampel yang digunakan adalah 12 ekor tikus sebagai sampel yang terbagi secara acak dalam 3 kelompok, kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan perlakuan kopi. Kemudian membuat hapusan darah, darah diambil melalui *plexus retroorbitalis* pada tikus dan diwarnai dengan pewarnaan giemsa. Selanjutnya, dilakukan penghitungan jumlah limfosit per seratus leukosit.

Data yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk Test* untuk mengetahui distribusi data dan uji homogenitas data menggunakan *Levene Test*. Data yang diperoleh normal dan homogeny, maka dilakukan uji parametrik dengan *One Way Anova* kemudian dilanjutkan uji LSD (*Least Significance Difference*). Perbedaan yang signifikan dari hasil analisis statistik menandakan bahwa terdapat penurunan jumlah limfosit yang signifikan. Penurunan jumlah limfosit menunjukkan bahwa kopi robusta mengandung senyawa asam klorogenat, asam ferulat, dan kafein. Dari penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa seduhan biji kopi robusta efektif untuk menurunkan jumlah sel limfosit pada tikus wistar jantan yang diinduksi *Staphylococcus aureus*.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Seduhan Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Jumlah Sel Limfosit pada Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi *Staphylococcus aureus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Allah SWT atas segala rahmat-Nya sehingga saya bisa menyelesaikan skripsi ini.
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp. Pros, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
3. Dr.drg. Masniari Novita, M.Kes, Sp.OF, selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Budi Yuwono, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini terselesaikan.
4. drg. Roedy Budirahardjo, M.Kes, Sp.KGA, selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Sri Lestari, M.Kes., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini.
5. Staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Ibu Indri yang telah meluangkan waktu dan bantuannya sehingga penelitian dapat berjalan lancar dan skripsi dapat terselesaikan.
6. Staf Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Bapak Agus yang telah memberikan waktu dan bantuannya.
7. Staf Laboratorium Botani Fakultas Pertanian Politeknik Negeri Jember, Bapak Ujang yang telah memberikan waktu dan bantuannya.
8. Orang tua saya tercinta, Bapak Sugiyanto dan Ibu Alisti Dwi Poerwati yang selalu memberikan motivasi, semangat, dan doa kepada saya.

9. Kakak saya tersayang, Lisa Febriana Nur Wijayanti yang telah memberikan dukungan untuk menyelesaikan skripsi ini.
10. Teman yang telah membantu dalam penelitian saya : Layla Besty, Raziqa, Meryam Suvi, Putri Nila, Ditha Rizky, Shela Anisa', Reza Hesti, Anisa, dan Intan Maulia.
11. Teman sekaligus mentor saya Sakti dan Rizqa yang selalu membantu saya untuk revisi dan mengerjakan *powerpoint*.
12. Teman-teman seperjuangan skripsi : Salsa Firda, Nana, Mbak Fitri, Ayus, Husna, Karin, Titis, Mbak Yanti yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada saya.
13. Teman bimbingan skripsi saya : Firyal, Wanda, dan Wenny yang selalu menjadi tempat berkeluh kesah selama mengerjakan skripsi.
14. Seluruh anak angkatan 2015 yang saya sayangi, dari NIM awal sampai NIM akhir.
15. Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

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

Jember, 8 Mei 2019

Penulis

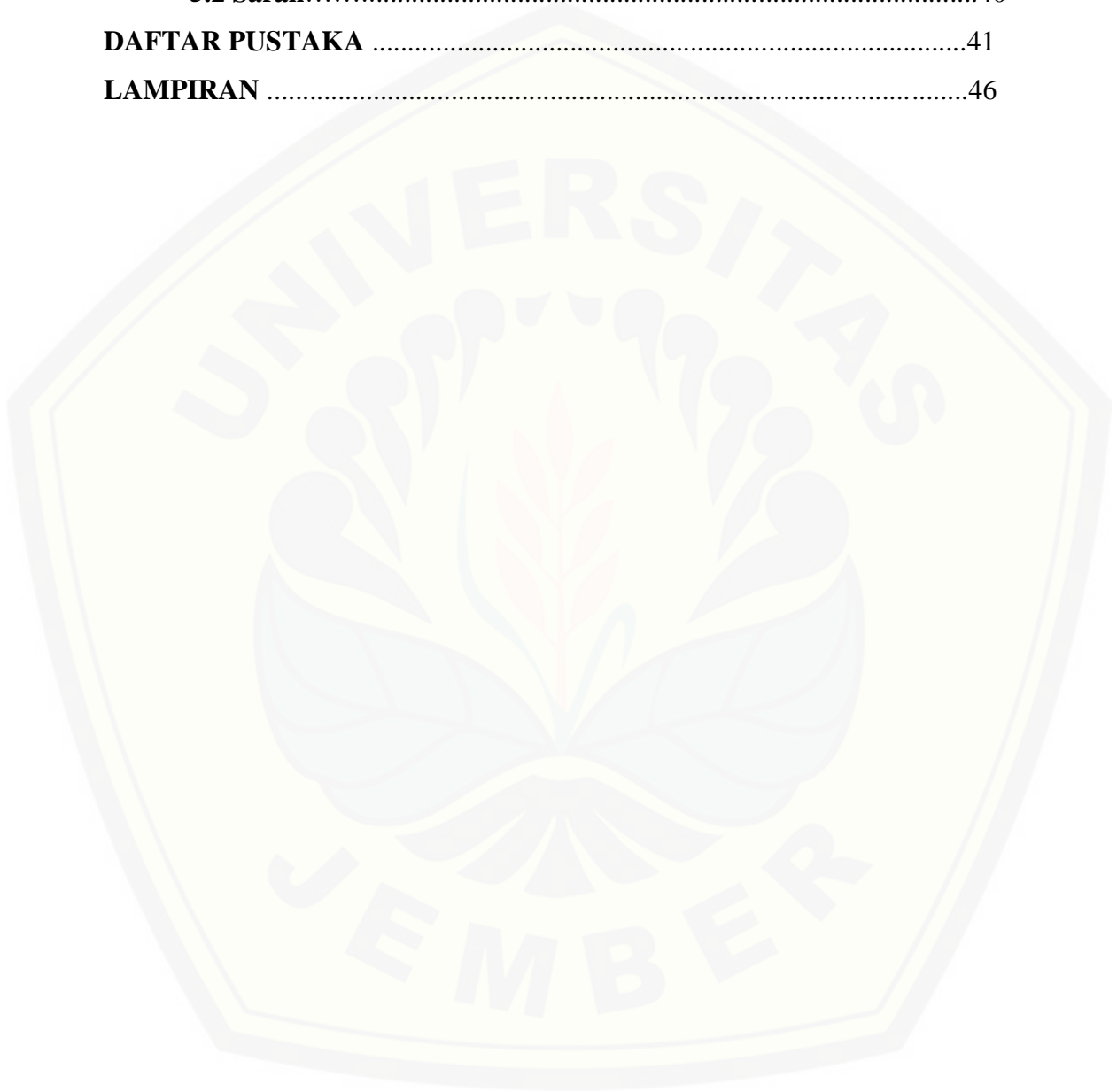
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.1.1 Taksonomi <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.1.2 Morfologi dan Karakteristik <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> Penyebab Infeksi.....	5
2.2 Inflamasi	5
2.2.1 Definisi Inflamasi.....	5
2.2.2 Hubungan Infeksi <i>Staphylococcus aureus</i> Dengan	

Terjadinya Inflamasi	6
2.3 Limfosit	6
2.3.1 Definisi dan Morfologi Limfosit.....	6
2.3.2 Limfosit Kecil.....	7
2.3.3 Peran Limfosit Dalam Proses Peradangan	9
2.4 Kopi.....	10
2.4.1 Taksonomi Kopi	10
2.4.2 Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>).....	11
2.4.3 Kandungan senyawa kopi.....	11
2.5 Obat Anti Inflamasi Non Steroid	13
2.5.1 Definisi obat antiinflamasi non steroid	13
2.5.2 Efek Samping Obat Antiinflamasi Non Steroid	13
2.5.3 Ibuprofen	14
2.6 Kerangka Konsep Penelitian.....	15
2.6.1 Penjelasan Kerangka Konseptual.....	16
2.7 Hipotesis	17
BAB 3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Jenis Penelitian	18
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.2.1 Tempat Penelitian	18
3.2.2 Waktu Penelitian	18
3.3 Variabel Penelitian	18
3.3.1 Variabel Bebas.....	18
3.3.2 Variabel Terikat	18
3.3.3 Variabel Terkendali.....	19

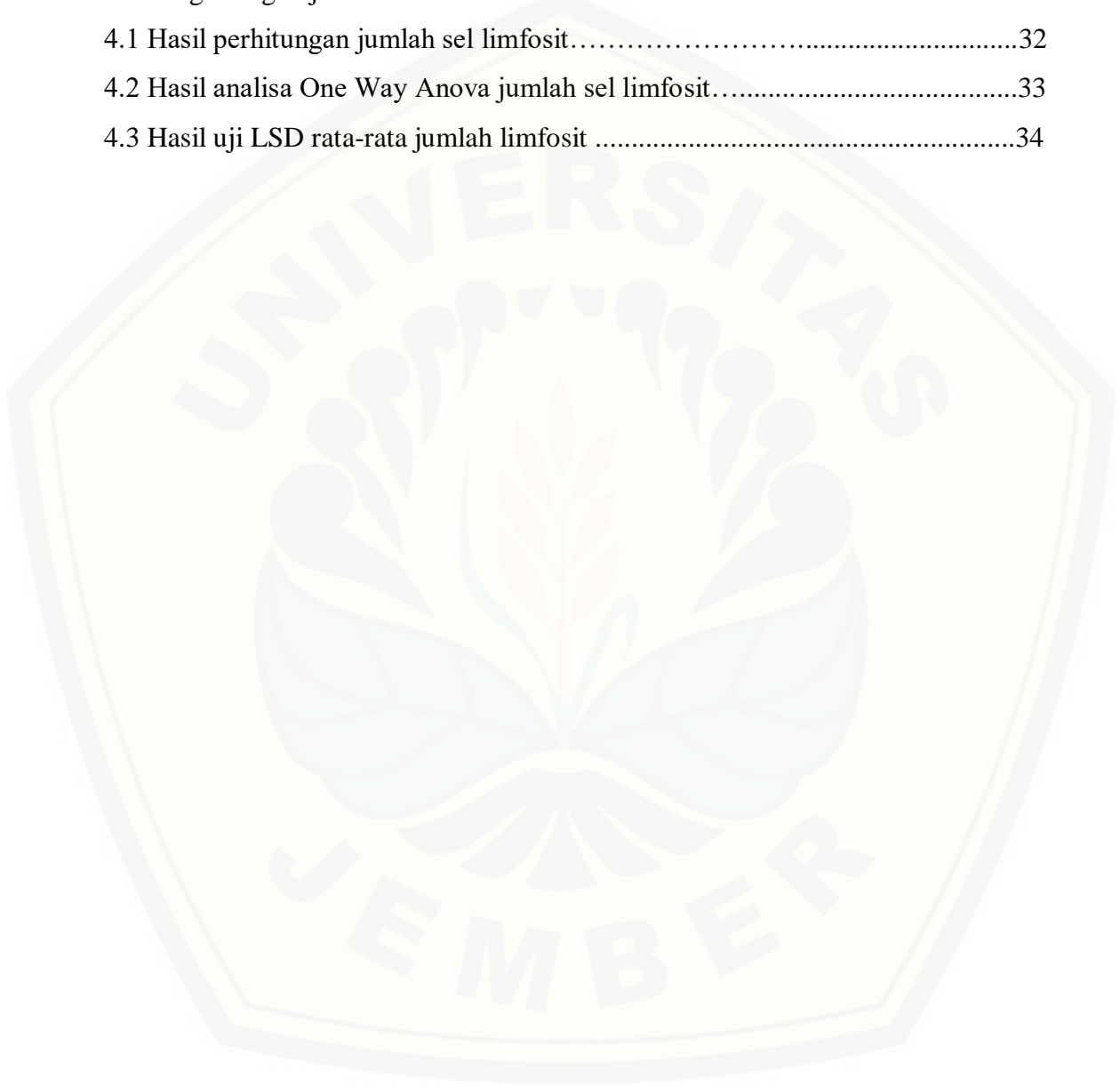
3.4 Definisi Operasional	19
3.4.1 Seduhan Biji Kopi Robusta	19
3.4.2 Jumlah Sel Limfosit	19
3.4.3 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.4.4 Sediaan Hapusan Darah Mata Tikus	20
3.5 Sampel Penelitian	20
3.5.1 Kriteria Sampel Penelitian.....	20
3.5.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	20
3.5.3 Besar Sampel	21
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	21
3.6.1 Alat Penelitian	21
3.6.2 Bahan Penelitian	22
3.7 Prosedur Penelitian	22
3.7.1 Permohonan <i>Ethical Clearance</i>	22
3.7.2 Tahap Persiapan Hewan Coba.....	22
3.7.3 Persiapan Bahan Perlakuan	23
3.7.4 Tahap Perlakuan	24
3.7.5 Tahap Pengamatan	26
3.8 Analisis Data	28
3.9 Alur Penelitian	30
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	31
4.1 Hasil Penelitian	31
4.2 Analisis Data	33
4.3 Pembahasan	36

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1 Kesimpulan	40
5.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	46



DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Penghitungan jumlah sel limfosit.....	28
4.1 Hasil perhitungan jumlah sel limfosit.....	32
4.2 Hasil analisa One Way Anova jumlah sel limfosit.....	33
4.3 Hasil uji LSD rata-rata jumlah limfosit	34



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> dalam mikroskop.....	4
Gambar 2.2 Bentuk sel limfosit	9
Gambar 2.3 Buah kopi jenis robusta	11
Gambar 3.1 Adaptasi hewan coba	24
Gambar 3.2 Injeksi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> secara intraperitoneal.....	25
Gambar 3.3 Tahap perlakuan hewan coba	26
Gambar 3.3 Pengambilan darah melalui mata (<i>plexus retroorbitalis</i>).....	26
Gambar 3.5 Sampel hapusan darah.....	27
Gambar 3.6 Tahap pewarnaan hapusan darah.....	28
Gambar 3.7 Alur penelitian.....	30
Gambar 4.1 Gambaran mikroskopis sel limfosit perbesaran 1000x.....	31
Gambar 4.2 Grafik perhitungan jumlah sel limfosit	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Surat Keterangan <i>Ethical Clearence</i>	46
B. Surat Izin Penelitian	47
C. Surat Identifikasi Tanaman Biji Kopi Robusta	48
D. Surat Identifikasi Bakteri <i>Staphyococcus aureus</i>	49
E. Alat Penelitian	50
F. Bahan Penelitian	51
G. Hasil Penelitian Jumlah Sel Limfosit Perbesaran 1000X.....	52
H. Tabel Perhitungan Jumlah Sel Limfosit	53
I. Hasil Uji Statistik	54
I1. Hasil Uji Normalitas dengan <i>Shapiro Wilk</i>	54
I2. Hasil Uji Homogenitas dengan <i>Levene Test</i>	55
I3. Hasil Uji Parametrik <i>One Way Anova</i>	55
I4. Hasil Uji LSD (<i>Least Significance Difference</i>)	56

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflamasi merupakan suatu respon pertahanan tubuh terhadap adanya trauma meliputi trauma fisik dan trauma kimia ataupun adanya mikroorganisme patogen. Mikroorganisme patogen yang sering menimbulkan inflamasi adalah bakteri (Achmadi, 2006). Salah satu bakteri yang dianggap sering menyebabkan inflamasi adalah bakteri golongan *Streptococcus* dan *Staphylococcus*. *Staphylococcus* merupakan bakteri normal yang biasa ditemukan dalam rongga mulut, kulit dan selaput lendir manusia. *Staphylococcus* dianggap sebagai penyebab infeksi baik pada manusia maupun pada hewan (Morgan, 2008).

Proses inflamasi yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* dapat terjadi karena adanya eksotoksin yang dimiliki bakteri gram positif pada umumnya. Eksotoksin tersebut akan mengaktifkan sistem pertahanan tubuh yaitu makrofag. Makrofag berperan sebagai *antigen presenting cell* (APC). Antigen ini membawa muatan polipeptida spesifik yang berasal dari *major histocompatibility complex* (MHC), kemudian berikatan dengan CD⁴⁺ (limfosit Th₁ dan Th₂) dengan perantaraan *T cell receptor* (TCR) (Llewelyn., 2002).

Saat terjadi proses inflamasi, tubuh berusaha untuk bereaksi terhadap infeksi tersebut maka limfosit T akan mengeluarkan substansi dari Th₁ yang berfungsi sebagai imunomodulator yaitu: IFN- γ , IL-2, dan *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) dan metabolit arakidonat. Limfosit Th₂ akan mengeluarkan IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10. IFN- γ merangsang makrofag mengeluarkan IL-1 β dan TNF- α . Pada kondisi ini, IL-2 dan TNF- α menginduksi polimorfonuklear (PMN) neutrofil untuk menuju area infeksi. IL-1 β berperan dalam pembentukan prostaglandin E₂ (PGE)₂, adanya prostaglandin menyebabkan timbulnya rasa sakit dan vasodilatasi pembuluh darah (Llewelyn., 2002). Obat-obatan sintetis berupa NSAID (*Non Steroid Anti Inflammatory Drugs*) ataupun kortikosteroid digunakan untuk menekan adanya inflamasi, namun penggunaan NSAID ataupun kortikosteroid dapat menimbulkan

efek samping berupa reaksi alergi diantaranya mual, muntah, pusing, urtikaria dan diare. Oleh karena itu diperlukan alternatif lain untuk mengatasi efek samping dari obat-obatan sintesis tersebut (Gunawan *et al.*, 2007)

Kopi adalah salah satu tanaman yang dapat diolah untuk menjadi minuman dan salah satu jenis kopi tersebut adalah kopi robusta (*Coffea canephora*). Kopi robusta merupakan kopi yang dapat ditemukan hampir di seluruh wilayah Indonesia. Menteri Pertanian Direktorat Jenderal Perkebunan (2014) menyatakan areal kopi robusta tersebar di hampir seluruh kepulauan Indonesia dengan Sumatera sebagai pulau terluas yakni sekitar 777,037 ribu hektar (67%), Jawa (12%), Nusa Tenggara dan Bali (8%). Sisanya terdapat di Kalimantan (4%), Sulawesi (7%), Maluku dan Papua (1%).

Kopi robusta mempunyai banyak kandungan yang berguna untuk tubuh (Farah, 2012). Setiap bahan yang akan dikonsumsi manusia harus dilakukan uji biokompatibilitas terlebih dahulu. Uji biokompatibilitas secara *in vivo* dilakukan terlebih dahulu pada hewan coba sebelum pada manusia. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kandungan kopi robusta memiliki efek antiinflamasi dan antibakteri pada tikus wistar (Dewanti *et al.*, 2016). Senyawa aktif yang terkandung dalam kopi adalah polifenol dan alkaloid. Senyawa polifenol dalam kopi adalah asam klorogenat dan asam ferulat (Iwahashi *et al.*, 1990). Asam klorogenat merupakan senyawa polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan dan antibakteri (Daglia *et al.*, 2000). Asam ferulat telah terbukti memiliki efek pada peradangan dan memicu penurunan produksi IL-1 β dan TNF- α (Hall *et al.*, 2015). Salah satu komponen kimia lain yang terkandung didalam kopi adalah kafein. Kadar kafein yang lebih tinggi memiliki aktivitas antiinflamasi yang lebih baik. Kopi robusta dipilih karena memiliki kadar kafein yang lebih tinggi dibandingkan dengan kopi arabika (Farah, 2012). Dalam beberapa penelitian, kafein mengurangi sekresi sitokin proinflamasi TNF- α , IL-1 β , IL-6 sehingga proses inflamasi terhambat (Lou *et al.*, 2011). Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti bertujuan untuk mengetahui efek

pemberian seduhan biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap jumlah sel limfosit pada tikus Wistar jantan yang diinduksi *Staphylococcus aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana efek pemberian seduhan biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap jumlah sel limfosit pada tikus Wistar jantan yang diinduksi *Staphylococcus aureus* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui efek pemberian seduhan biji kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap jumlah sel limfosit pada tikus Wistar jantan yang diinduksi *Staphylococcus aureus*.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat :

- a. Memberi informasi ilmiah mengenai efek dari seduhan biji kopi robusta terhadap jumlah sel limfosit pada tikus wistar jantan yang diinduksi *Staphylococcus aureus*
- b. Memberi informasi mengenai manfaat dari kandungan kopi
- c. Hasil penelitian ini dapat dipakai sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya

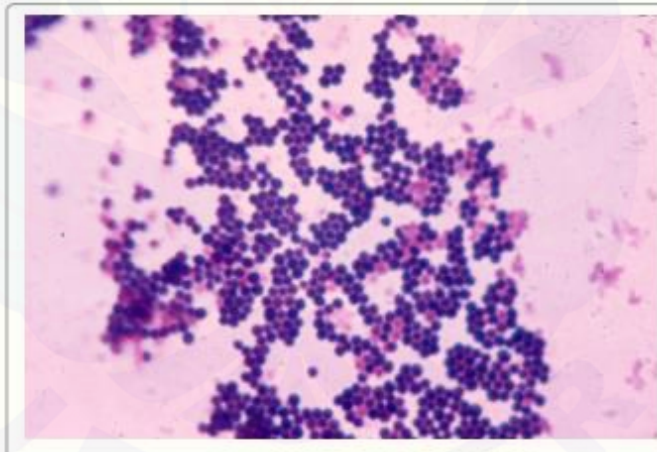
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Taksonomi *Staphylococcus aureus*

Sistematika taksonomi *Staphylococcus aureus* menurut Rosenbach (1884) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>



Gambar 2.1 *Staphylococcus aureus* dalam mikroskop (Sumber: Jawetz *et al.*, 2013)

2.1.2 Morfologi dan Karakteristik *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif dengan bentuk bulat, biasanya tersusun dalam rangkaian dan tidak beraturan seperti anggur (Gambar 2.1). Bakteri ini hidup bebas dalam lingkungan dan membentuk kelompok teratur yang biasanya terdiri atas empat sampai delapan kokus. Koloni bakteri ini berwarna kuning, merah, atau jingga. *Staphylococcus aureus* tidak bergerak dan tidak

membentuk spora (Jawetz *et al.*, 2013). *Staphylococcus aureus* dapat bertahan hidup sampai berbulan-bulan baik dalam lemari es maupun pada suhu kamar.

2.1.3 *Staphylococcus aureus* Penyebab Infeksi

Infeksi *Staphylococcus aureus* merupakan hasil interaksi berbagai protein permukaan bakteri dengan berbagai reseptor pada permukaan sel inang. Penentuan faktor virulen mana yang paling berperan sulit dilakukan karena demikian banyak dan beragam faktor virulen yang dimiliki *Staphylococcus aureus* (Frank, 2003). Berbagai zat yang berperan sebagai faktor virulensi dapat berupa protein, termasuk enzim dan toksin (Jawetz *et al.*, 2013).

Eksotoksin adalah salah satu toksin yang dihasilkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Eksotoksin merupakan komponen protein terlarut yang disekresikan oleh bakteri hidup pada fase pertumbuhan. Produksi toksin ini biasanya spesifik pada beberapa spesies bakteri tertentu yang menyebabkan terjadinya penyakit terkait dengan toksin tersebut (Garna, 2013).

2.2 Inflamasi

2.2.1 Definisi Inflamasi

Inflamasi adalah respons biologis kompleks dari jaringan vaskuler atas adanya bahaya, seperti patogen, kerusakan sel, atau iritasi. Hal ini merupakan usaha perlindungan diri organisme untuk menghilangkan rangsangan penyebab luka dan inisiasi proses penyembuhan jaringan. Jika inflamasi tidak ada maka luka dan infeksi tidak akan sembuh dan akan mengalami kerusakan yang lebih parah. Inflamasi yang tidak terkontrol juga dapat menyebabkan penyakit, seperti demam, *atherosclerosis*, dan *reumathoid arthritis* (Gard, 2001).

Inflamasi disebabkan oleh mikroorganisme, trauma mekanis, zat kimia, dan pengaruh fisika. Tujuan akhir dari respon inflamasi adalah menarik protein plasma dan fagosit ke tempat yang mengalami cedera atau terinfeksi agar dapat mengisolasi,

menghancurkan, atau menginaktifkan agen yang masuk, membersihkan debris dan mempersiapkan jaringan untuk proses penyembuhan (Corwin, 2008).

2.2.2 Hubungan Infeksi *Staphylococcus aureus* dengan Terjadinya Inflamasi

Infeksi diawali dengan adanya toksin bakteri *Staphylococcus aureus* berupa eksotoksin. Eksotoksin berperan sebagai superantigen, proses ini terjadi setelah eksotoksin difagosit oleh makrofag. Makrofag memiliki peran sebagai *antigen processing cell* dan kemudian ditampilkan sebagai *antigen presenting cell* (APC). Antigen ini membawa muatan polipeptida spesifik yang berasal dari *major histocompatibility complex* (MHC), kemudian berikatan dengan CD^{4+} (limfosit Th_1 dan Th_2) dengan perantaraan *T cell receptor* (TCR) (Llewelyn., 2002).

Saat terjadi proses inflamasi, tubuh berusaha untuk bereaksi terhadap infeksi tersebut maka limfosit T akan mengeluarkan substansi dari Th_1 yang berfungsi sebagai imunomodulator yaitu: $IFN-\gamma$, IL-2, dan *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF). Limfosit Th_2 akan mengeluarkan IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10. $IFN-\gamma$ merangsang makrofag mengeluarkan IL- 1β dan $TNF-\alpha$. Pada kondisi ini, IL-2 dan $TNF-\alpha$ dapat merusak endotel pembuluh darah. IL- 1β juga berperan dalam pembentukan prostaglandin E_2 ($PG-E_2$) dan merangsang ekspresi *intercellular adhesionmolecule-1* (ICAM-1). ICAM-1 berperan pada proses adesi neutrofil dengan endotel. Neutrofil yang beradesi dengan endotel akan mengeluarkan lisosim yang menyebabkan dinding endotel lisis. Kerusakan endotel akan menyebabkan gangguan vaskuler sehingga terjadi kerusakan pada daerah yang terinfeksi (Llewelyn., 2002).

2.3 Limfosit

2.3.1 Definisi dan Morfologi Limfosit

Limfosit merupakan sel utama pada sistem getah bening, memiliki ukuran yang relatif lebih kecil daripada makrofag dan neutrofil. Limfosit memiliki rentang usia sekitar 100-300 hari. Selama periode ini, sebagian besar dari sel ini secara kontinu beredar di antara jaringan limfoid, limfe, dan darah dengan menghabiskan

waktu beberapa jam saja di dalam darah. Dengan demikian, hanya sebagian kecil limfosit total yang transit di darah pada waktu tertentu (Sherwood, 2001).

Limfosit merupakan sel bulat di dalam darah manusia mempunyai diameter yang bervariasi antara 6 sampai 8 μm , walaupun beberapa diantaranya mungkin lebih besar. Kebanyakan limfosit hanya lebih besar sedikit dibandingkan eritrosit. Jumlah limfosit adalah 20 sampai 35 persen dari leukosit darah normal. Pada jaringan ikat, limfosit merupakan sel yang paling kecil di antara sel bebas, kebanyakan hanya berukuran 7 sampai 8 μm . Limfosit memiliki inti bulat, gelap yang hampir memenuhi seluruh sel. Di sekitar inti terdapat sedikit sitoplasma homogen yang basofil (Gambar 2.2) (Leeson *et al.*, 1996).

Limfosit paling banyak ditemukan dalam nodus limfe, namun juga dijumpai dalam jaringan limfoid khususnya, seperti limpa, daerah submukosa saluran cerna, timus dan sumsum tulang. Jaringan limfoid tersebar di lokasi-lokasi yang sangat menguntungkan di dalam tubuh untuk menahan invasi organisme atau toksin sebelum dapat menyebar luas (Guyton dan Hall, 2008).

2.3.2 Limfosit Kecil

Menurut Fawcett (2002) berdasarkan diameter dan jumlah relatif sitoplasmanya, limfosit dibagi menjadi tiga, yaitu limfosit kecil, limfosit sedang dan limfosit besar. Limfosit kecil merupakan limfosit yang paling mendominasi dalam darah, memiliki inti sferis yang terlihat lekukan kecil pada salah satu intinya yang bulat, kromatinnya padat dan tampak sebagai gumpalan kasar, sehingga inti terlihat lebih gelap pada tampilan biasa. Sitoplasmanya sangat sedikit dan pada hapusan darah tampak sebagai tepian tipis disekitar inti. Limfosit hidup bersifat motil dan dapat menyusup di antara sel-sel endotel pembuluh darah. Mereka juga mampu bermigrasi melalui epitel basal lainnya (Junqueira *et al.*, 2007).

Berdasar sifat fungsionalnya limfosit kecil digolongkan dalam dua kelompok besar yaitu :

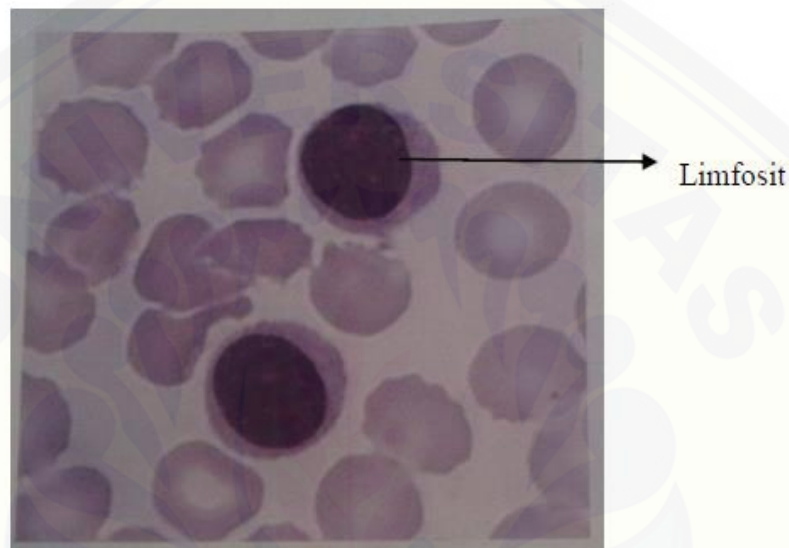
a. Limfosit T

Limfosit T berasal dari dalam sel induk sumsum tulang yang bermigrasi di timus, yang berdiferensiasi menjadi sel T dewasa dan meninggalkan timus. Sel T ikut aliran darah dan juga berada di jaringan limfoid perifer. Sel T mengarahkan beragam unsur imunitas selular dan juga penting untuk menginduksi imunitas humoral yang berasal dari sel B terhadap antigen. Sel T berjumlah 60%-70% dari limfosit dalam sirkulasi darah (Kumar *et al.*, 2007). Limfosit T bertanggung jawab dalam pembentukan limfosit teraktivasi yang dapat membentuk imunitas yang diperantai sel. Ketika terpapar antigen yang sesuai, limfosit T akan berproliferasi dan melepaskan banyak sel T yang teraktivasi, yang kemudian akan masuk ke dalam sirkulasi dan disebarkan ke seluruh tubuh, melewati dinding kapiler masuk ke dalam cairan limfe dan darah, dan bersirkulasi ke seluruh tubuh demikian seterusnya, hal ini dapat berlangsung sampai berbulan-bulan atau bahkan bertahun-tahun (Guyton dan Hall, 2008). Respon sel T terhadap antigen sangat bersifat spesifik, sama seperti respon antibodi sel B. Pada kenyataannya respon imun adaptif membutuhkan bantuan sel T untuk memulainya dan sel T berperan penting untuk membantu melenyapkan patogen yang masuk. Ada tiga kelompok utama dari sel T yaitu sel T pembantu, sel T sitotoksik dan sel T *supressor* (Guyton dan Hall, 2008).

b. Limfosit B

Limfosit B merupakan kelompok limfosit yang bertanggung jawab dalam pembentukan antibodi yang memberikan imunitas humoral. Limfosit B ini pada awalnya diolah lebih dahulu dalam hati selama masa pertengahan kehidupan janin dan sesudah dilahirkan. Kemudian sel ini bermigrasi ke jaringan limfoid di seluruh tubuh dimana mereka menempati daerah yang sedikit lebih kecil daripada limfosit T (Guyton dan Hall, 2008). Menurut Leeson *et al* (1996), limfosit ini bertugas untuk memproduksi antibodi (*humoral antibody response*) yang beredar dalam peredaran darah dan mengikat secara khusus dengan antigen asing yang menyebabkan terbentuknya antigen asing terikat antibodi (*Antibody-Coated Foreign Antigen*) yang dapat mempertinggi kemampuan fagositosis dan penghancuran oleh sel pembunuh

Nature Killer cell (NK cell) dari organisme yang menyerang. Jumlah limfosit B dalam total limfosit normal pada manusia adalah sekitar 15%. Nilai limfosit B mendapat rangsangan yang sesuai, akan membelah diri beberapa kali dan berdiferensiasi menjadi sel plasma dalam jaringan dan menghasilkan immunoglobulin (Junqueira *et al.*, 2007).



Gambar 2.2 Bentuk sel limfosit (Sumber: Junqueira *et al.*, 2007)

2.3.3 Peran Limfosit Dalam Proses Peradangan

Limfosit memiliki peranan fungsional yang berbeda, yang semuanya berhubungan dengan reaksi imunitas dalam bertahan terhadap serangan mikroorganisme, makromolekul asing dan sel kanker. Limfosit T secara langsung menghancurkan sel-sel sasaran spesifik, suatu proses yang dikenal sebagai respon imun yang diperantarai sel hidup (respon imun seluler). Sel yang menjadi sasaran limfosit T mencakup sel tubuh yang dimasuki oleh virus dan sel kanker (Sherwood, 2001). Limfosit umumnya terdapat pada eksudat dalam jumlah yang sangat kecil untuk waktu yang cukup lama yaitu sampai reaksi peradangan menjadi kronik (Price, 2005).

2.4 Kopi

Kopi merupakan salah satu minuman yang sering dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Kopi dijadikan sebagai komoditas andalan dalam sektor perkebunan Indonesia (Chandra *et al.*, 2013). Kopi (*coffeea spp*) merupakan spesies tanaman berbentuk pohon yang termasuk dalam famili *Rubiaceae* dan genus *Coffea* (Najiyati *et al.*, 2009).

Kopi di Indonesia pertama kali dibawa oleh pria berkebangsaan Belanda sekitar tahun 1646 yang mendapatkan biji arabika *mocca* dari Arab (Prastowo *et al.*, 2010). Kemudian tanaman kopi ditanam sehingga tersebar di berbagai provinsi di Indonesia. Pada saat itu, setelah timbul serangan penyakit karat daun (*coffee leaf rust*), Pemerintah Hindia Belanda kemudian mendatangkan jenis kopi robusta yang berasal dari Kongo, Afrika pada tahun 1900. Kopi jenis ini lebih tahan penyakit dan memerlukan syarat tumbuh serta pemeliharaan yang ringan, dengan hasil produksi yang jauh lebih tinggi. Hal inilah yang menyebabkan kopi robusta lebih cepat berkembang di Indonesia (Panggabean, 2011).

2.4.1 Taksonomi Kopi

Sistematika taksonomi tanaman kopi secara lengkap adalah sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i> (Tumbuhan)
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i> (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i> (Tumbuhan penghasil biji)
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i> (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i> (Tumbuhan berkeping dua/ dikotil)
Subclass	: <i>Asteridae</i>
Ordo	: <i>Rubiales</i>
Family	: <i>Rubiaceae</i> (Suku kopi-kopian)
Genus	: <i>Coffea</i>
Species	: <i>Coffea sp. Coffea canephora var robusta</i> (kopi robusta)

(Rahardjo, 2012).

2.4.2 Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Menteri Pertanian Direktorat Jenderal Perkebunan (2014) menyatakan bahwa, selama ini Indonesia dikenal sebagai negara produsen kopi robusta yang memiliki presentase sebesar 20% dari ekspor kopi robusta dunia. Areal kopi robusta tersebar di hampir seluruh kepulauan Indonesia dengan Sumatera sebagai pulau terluas yakni sekitar 777,037 ribu hektar (67%), Jawa (12%), Nusa Tenggara dan Bali (8%). Sisanya terdapat di Kalimantan (4%), Sulawesi (7%), Maluku dan Papua (1%).

Biji kopi robusta memiliki karakteristik, biji kopi agak bulat, lengkungan biji lebih tebal jika dibandingkan dengan jenis arabika, garis tengah (parit) dari atas ke bawah hampir rata, dan untuk biji yang sudah diolah, tidak terdapat kulit ari di lekukan atau bagian parit (Gambar 2.3) (Panggabean, 2011). Ciri-ciri dari tanaman kopi robusta yaitu tinggi pohon mencapai 5 meter, batangnya berkayu, keras, tegak berwarna putih keabu-abuan (Prastowo *et al.*, 2010).



Gambar 2.3 Buah kopi jenis robusta (Sumber: Panggabean, 2011)

2.4.3 Kandungan Senyawa Kopi

Senyawa aktif dari bahan alami yang terkandung dalam kopi adalah polifenol, yang terdiri dari *Chlorogenic acid*, *Caffeic acid*, dan *Ferulic acid* (Pathak *et al.*, 2013). Senyawa aktif lain yang terkandung dalam kopi robusta adalah alkaloid yaitu kafein (Oestreich-Janzen, 2010).

a. *Chlorogenic acid* (CGA)

Chlorogenic acid (asam klorogenik) memberikan efek biologi yang meliputi antimutagen, antivirus, dan antikarsinogen (Xu *et al.*, 2012), selain itu sebagai antiinflamasi, antioksidan, neuroprotektif, dan memberikan aktivitas neurotrofik (Shen *et al.*, 2012). CGA terbukti dapat mengurangi jumlah produksi mediator proinflamasi, yaitu meliputi TNF- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, dan interferon (IFN)- γ pada sel makrofag (Shen *et al.*, 2012). CGA juga merupakan senyawa antioksidan dengan kandungan terbanyak yaitu kurang lebih 200-550 mg/cangkir dalam 1 kali seduhan kopi jika dibandingkan dengan antioksidan lain seperti beta karoten, alfa tokoferol, dan vitamin C (Daglia *et al.*, 2000).

b. *Ferulic acid* (Asam Ferulik)

Ferulic acid terbukti memiliki efek pada peradangan. Penelitian yang telah dilakukan oleh Xu *et al.*, (2013), pada korteks depan regio dari otak tikus, dengan dosis kandungan biji kopi robusta 80 mg/kg dari asam ferulik dapat menurunkan produksi IL-1 β dan TNF- α . *Ferulic acid* memiliki bioaktivitas sebagai antiinflamasi dengan mekanisme penurunan kadar mediator inflamasi melalui inhibisi *Cyclooxygenase* (COX) (Tagaki *et al.*, 2009).

c. Kafein

Kafein adalah senyawa alkaloid. Kopi mengandung kafein cukup tinggi yaitu 1,2-3,8% (Oestreich-Janzen, 2010). Kafein sebagai antioksidan dapat berperan sebagai peredam radikal bebas. Antioksidan dapat membantu tubuh dalam mengurangi efek kerusakan oleh senyawa radikal bebas, seperti penurunan sistem imun (Handayani *et al.*, 2014). Menurut Ramanaviciene *et al.*, (2003) kafein memiliki peran dalam pengembangan pertahanan tubuh melawan agen infeksi dengan meningkatkan aktivitas sel imun dan memperkuat aktivitas lisozim. Kandungan kafein pada kopi terbukti sebagai antiinflamasi dan memberikan efek immunosupresan (Daly, 2007). Evaluasi hasil studi mengatakan bahwa kafein merupakan parameter yang memiliki keterkaitan dengan inflamasi. Kafein adalah salah satu metabolit utama yang memiliki peran untuk menghambat produksi *tumor*

necrosis factor alpha (TNF- α) yang telah dirangsang oleh LPS serta dapat menghambat enzim *Cyclooxygenase-2* (COX-2) (Horrigan *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2012).

2.5 Obat Antiinflamasi Non Steroid

2.5.1 Definisi Obat Antiinflamasi Non Steroid

Obat anti inflamasi (anti radang) Non Steroid (AINS), atau yang lebih dikenal dengan NSAID (*Non Steroidal Anti-inflammatory Drugs*) adalah suatu golongan obat yang memiliki khasiat analgesik (pereda nyeri), anti piretik (penurun panas), dan anti inflamasi (anti radang). Istilah non steroid digunakan untuk membedakan jenis obat-obatan ini dengan steroid, yang juga memiliki khasiat serupa. AINS bukan tergolong obat-obatan jenis narkotika (Gunawan *et al.*, 2007).

2.5.2 Efek Samping Obat Antiinflamasi Non Steroid

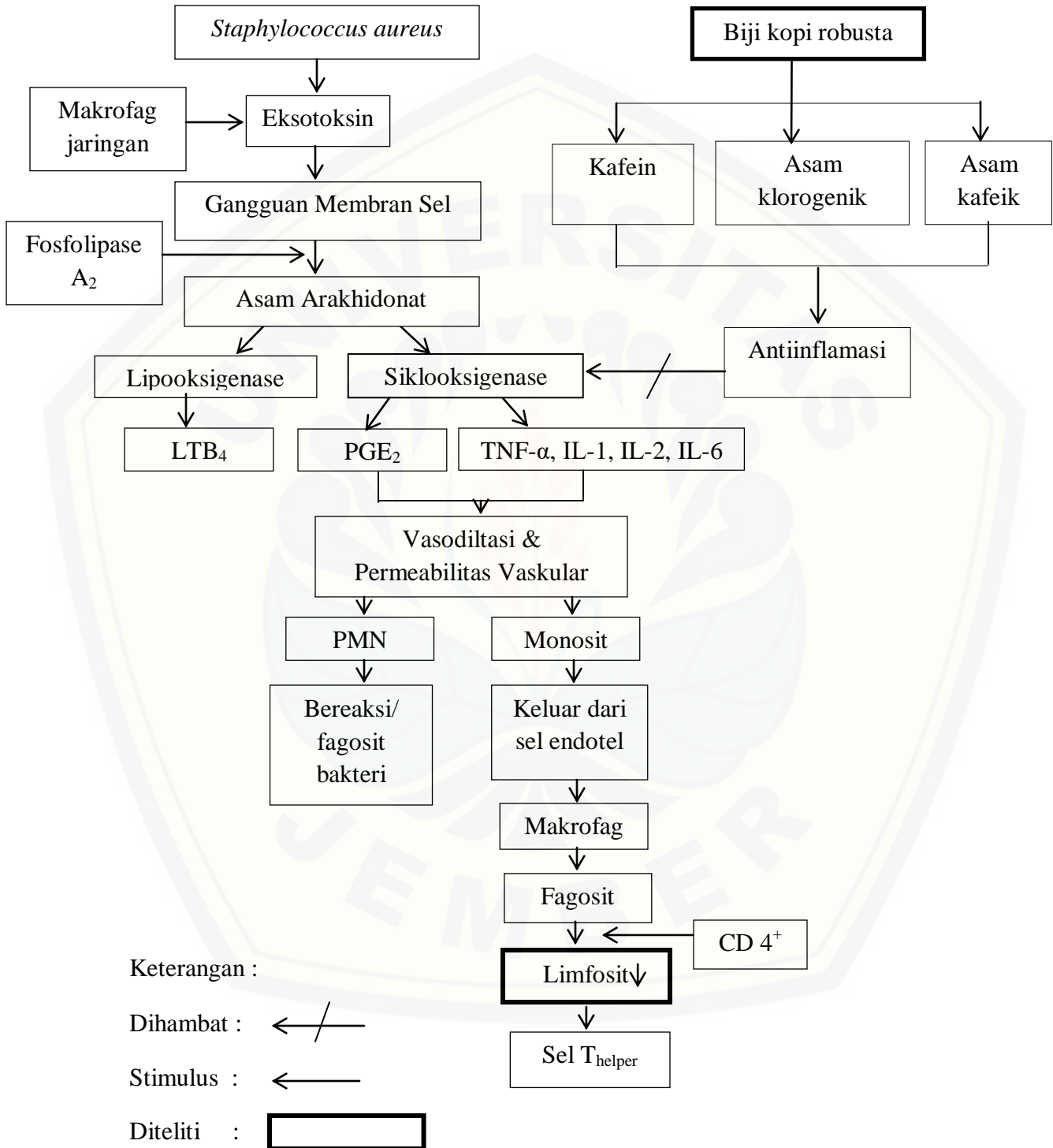
Obat anti inflamasi non steroid memiliki efek samping pada tiga sistem organ yaitu saluran cerna, ginjal, dan hati. Efek yang paling sering timbul adalah tukak peptik (tukak duodenum dan tukak lambung) biasanya dapat menimbulkan anemia sekunder karena perdarahan saluran cerna. Terdapat dua mekanisme iritasi lambung, yaitu iritasi yang bersifat lokal menimbulkan difusi asam lambung ke mukosa dan menyebabkan kerusakan jaringan, serta iritasi yang bersifat sistemik yang akan melepaskan prostaglandin dan menghambat sekresi asam lambung dan merangsang sekresi mukus usus halus (Gunawan *et al.*, 2007).

Terdapat efek samping yang lain berupa gangguan fungsi trombosit akibat penghambatan biosintesis tromboksan A_2 (TXA₂) yang berakibat bertambah panjangnya waktu perdarahan (Gunawan *et al.*, 2007). Penghambatan biosintesis prostaglandin di ginjal menyebabkan gangguan homeostasis. Pada orang normal gangguan ini tidak begitu berpengaruh pada fungsi ginjal. Pada pasien hipovolemia, gagal jantung, sirosis hepatitis, aliran darah ginjal dan kecepatan filtrasi glomerulus akan berkurang, bahkan dapat terjadi gagal ginjal akut (Gunawan *et al.*, 2007).

2.5.3 Ibuprofen

Ibuprofen merupakan derivat asam fenil propionat yang banyak digunakan sebagai obat anti inflamasi non steroid, analgetik, dan antipiretik yang tidak larut dalam air maka dari itu sebaiknya sediaan ibuprofen dibuat menjadi suspensi (Gunawan *et al.*, 2007; Eichie *et al.*, 2009). Ibuprofen merupakan inhibitor non selektif cyclooxygenase (COX) yang dapat menghambat enzim COX-1 dan COX- 2. Enzim COX- 2 diduga bertanggung jawab untuk efek antiinflamasi NSAID, sedangkan enzim COX-1 bertanggung jawab untuk toksisitas gastrointestinal (Neal, 2006).

2.6 Kerangka Konseptual



2.6.1 Penjelasan Kerangka Konseptual

Staphylococcus aureus memiliki eksotoksin, yaitu salah satu toksin yang merupakan komponen protein terlarut yang disekresikan oleh bakteri hidup pada fase pertumbuhan. Adanya eksotoksin akan direspon oleh makrofag jaringan yang merupakan *antigen presenting cell* yang mempunyai peranan utama memfagosit bakteri. Eksotoksin menyebabkan gangguan membran sel host, gangguan membran ini menghasilkan metabolit asam arakidonat dengan bantuan enzim fosfolipase A₂. Asam arakidonat menginduksi terbentuknya lipoksigenase yang mengaktifkan LTB₄ yang berperan dalam agregasi platelet. Adanya asam arakidonat juga menginduksi enzim siklooksigenase untuk menghasilkan prostaglandin E₂, TNF- α , IL- α , IL-1, IL-2, IL-6 yang berperan penting dalam proses inflamasi. Adanya prostaglandin E₂, TNF- α , IL- α , IL-1, IL-2, IL-6 menyebabkan teraktivasinya sel-sel radang akut berupa *polimorfonuklear neutrofil* (PMN) dan monosit. PMN merespon adanya bakteri paling tinggi 6-24 jam pertama, setelah itu sel-sel monosit akan keluar dari pembuluh darah dan berubah menjadi makrofag, kemudian makrofag akan memfagosit bakteri dan akan mengaktifkan sel T helper untuk mengaktifkan limfosit. Limfosit akan bermigrasi ke tempat radang dan menandakan bahwa terjadi radang kronis. Limfosit bermigrasi ke tempat radang setiap ada rangsang imun spesifik berupa infeksi maupun pada inflamasi yang diperantarai trauma jaringan.

Kopi robusta memiliki kandungan seperti kafein, asam klorogenik, dan asam ferulik yang dapat berperan sebagai antiinflamasi. Zat aktif tersebut dapat menghambat enzim siklooksigenase, adanya penghambatan enzim siklooksigenase ini menyebabkan menurunnya sel-sel inflamasi, salah satunya adalah sel limfosit.

2.7 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah seduhan biji kopi robusta (*Coffea canephora*) efektif menurunkan jumlah sel limfosit pada tikus Wistar jantan yang diinduksi *Staphylococcus aureus*.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris. Pada penelitian ini menggunakan rancangan *the post test only control group design* yaitu melakukan pengukuran atau pengamatan setelah diberi suatu perlakuan dan hasilnya dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2010).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

- a. Identifikasi tanaman kopi robusta (*Coffea robusta*) dilakukan di Laboratorium Tanaman Fakultas Pertanian Politeknik Negeri Jember.
- b. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- c. Proses perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- d. Proses penghitungan jumlah sel limfosit dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober-Desember 2018.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah seduhan biji kopi robusta (*Coffea robusta*)

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel limfosit darah tikus pada hapusan darah.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah :

1. Waktu pemberian seduhan kopi
2. Dosis pemberian seduhan kopi
3. Hewan coba (tikus wistar)
 1. Jenis kelamin hewan coba (tikus wistar jantan)
 2. Berat badan hewan coba (180-200 gram)
 3. Usia hewan coba (usia 2-3 bulan)
 4. Makan dan minum hewan coba
4. Prosedur penelitian
5. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 Seduhan Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*)

Seduhan biji kopi robusta (*Coffea robusta*) adalah hasil pelarutan bubuk biji kopi robusta sebanyak 13 gram dengan air mendidih 200 ml, kemudian didinginkan. Bubuk kopi Robusta yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bubuk kopi robusta murni kemasan Sekar Arum yang didapatkan dari PTPN XII Kabupaten Jember.

3.4.2 Jumlah Sel Limfosit

Sel limfosit diambil dari darah mata tikus yang diambil sebanyak 2 ml. Jumlah sel limfosit diamati pada hari ke 3, 5, dan 7. Sel limfosit ditandai dengan inti berwarna gelap, mengandung kromatin tebal dan sitoplasma berwarna biru pucat. Pengamatan sel limfosit dilakukan dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000 kali, penghitungan sel limfosit dimulai dari hapusan yang tipis ke hapusan yang tebal. Pengamatan dan perhitungan jumlah sel limfosit dilakukan oleh 3 orang.

3.4.3 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus didapat dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Karakteristik bakteri tersebut berbentuk bulat, tidak beraturan seperti anggur dan koloni berwarna jingga. Dosis *Staphylococcus aureus* yang digunakan adalah 0,09 cc/100 gr BB tikus. Bakteri tersebut diinjeksikan secara intraperitoneal pada tikus (Gjertsson *et al.*, 2000).

3.4.4 Sediaan Hapusan Darah Mata Tikus

Darah dari mata tikus yang diambil pada *plexus retroorbitalis*, ditampung pada tabung *Eppendorf* yang telah diberi EDTA. Darah diambil 1-2 tetes dari tabung *Eppendorf* diletakkan pada *object glass* kemudian diratakan dengan *deck glass*, dengan satu kali hapusan, selanjutnya dilakukan pengecatan *giemsa*, diamati di bawah mikroskop untuk dihitung jumlah sel limfositnya.

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah tikus Wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dengan kriteria sampel sesuai kriteria inklusi.

3.5.2 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria inklusi:

1. Tikus jenis kelamin jantan
2. Berat badan 180-200 gram
3. Usia 2-3 bulan
4. Kondisi umum baik

b. Kriteria eksklusi:

1. Tikus tidak sehat atau mati selama penelitian

3.5.3 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari penghitungan dengan menggunakan rumus (Daniel, 2005):

$$n \geq \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

n : besar sampel tiap kelompok

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

σ : standart deviasi sampel

d : kesalahan yang masih dapat ditoleransi

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

$$n \geq \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

$$n \geq (1,96^2)$$

$$n \geq (3,84)$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan rumus diatas, jumlah sampel minimum yang harus digunakan adalah 4 sampel untuk masing-masing kelompok. Jadi, pada penelitian ini peneliti menggunakan 12 ekor tikus sebagai sampel yang terbagi secara acak dalam 3 kelompok.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah :

- Kandang hewan coba
- Tempat makan tikus
- Tempat minum tikus
- Disposable syringe*

- e. Timbangan neraca
- f. Masker dan sarung tangan
- g. *Microhematocrit*
- h. Tabung *Eppendorf*
- i. *Object glass* dan *deck glass*
- j. Mikroskop binokuler

3.6.2 Bahan Penelitian

- a) Bubuk biji kopi Robusta
- b) Etanol 96%
- c) Aquadest
- d) Tikus Wistar jantan
- e) Makanan tikus
- f) Bakteri *Staphylococcus aureus*
- g) Alkohol
- h) Minyak emersi
- i) Methanol 96%
- j) Pewarnaan *giemsa*

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Permohonan *Ethical Clearance*

Sebelum dilakukan penelitian dilakukan permohonan *ethical clearance* di Komisi Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

3.7.2 Tahapan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini akan dilakukan pada hewan coba tikus dengan kriteria yang sudah ditentukan. Hewan coba diadaptasikan terhadap lingkungan kandang selama 5 hari sebelum perlakuan dan juga dilakukan pengukuran berat badan pada hewan coba.

Tikus diberi makan dan minum setiap hari secara *ad libitum*. Kandang dibersihkan setiap 3 hari sekali untuk menghindari adanya penyakit.

3.7.3 Persiapan Bahan Perlakuan

a. Pembuatan suspensi *Staphylococcus aureus*

Sediaan *Staphylococcus aureus* pada *blood agar plate* berasal dari penyimpanan suhu rendah kemudian didiamkan hingga mencapai suhu ruang. Mengambil suspensi kuman sebanyak satu ose, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl sebanyak 524 ml, kemudian suspensi dihomogenkan sampai diperoleh konsentrasi bakteri 1×10^9 CFU/ml (Gjertsson *et al.*, 2000).

b. Dosis dan Pembuatan Seduhan Biji Kopi

Seduhan biji kopi yang akan dibuat disesuaikan dengan pembuatan secangkir kopi pada umumnya. Cara membuatnya : aquades dipanaskan sampai mendidih (100° C), diambil 200 ml, dituangkan ke dalam gelas ukur yang berisi 13 gram bubuk kopi, kemudian diaduk selama 2 menit (Susilawati, 2013). Seduhan kopi kemudian didinginkan dalam suhu ruangan sampai mencapai suhu tubuh, kemudian disondasekan ke setiap tikus sebanyak 0,6 ml/hari. Dosis tersebut didapat dari,

$$70\text{kg manusia} : 200 \text{ ml} = 200 \text{ gram BB tikus} : \mathbf{X}$$

$$70.000 \text{ gram} : 200 \text{ ml} = 200 \text{ gram} : \mathbf{X}$$

$$70.000\mathbf{X} = 40.000$$

$$\mathbf{X} = 4:7$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{0,6 \text{ ml}}$$

Pemberian dosis tersebut berdasarkan aturan *single dose one cup of coffee per day* yang merupakan simulasi kebiasaan meminum satu cangkir kopi (200 ml) dalam satu hari.

c. Dosis Ibuprofen

Menurut penelitian (Kusumastuti *et al.*, 2014), dosis ibuprofen yang digunakan pada tikus dengan berat badan 180-200 gram adalah 20 mg/kg BB. Ibuprofen yang dibutuhkan untuk 200 gram/BB hewan coba adalah

$$\frac{20 \text{ mg}}{1 \text{ kg/BB}} = \frac{X}{200 \text{ g/BB}}$$

$$\frac{20 \text{ mg}}{1000 \text{ g/BB}} = \frac{X}{200 \text{ g/BB}}$$

$$X = 4 \text{ mg}$$

Dosis tersebut kemudian dilarutkan ke dalam 2 ml larutan Na CMC 0,5% yang didapat dari perhitungan standart pemberian sondase dengan berat badan per 1 g/BB yaitu 0,01 ml, sehingga apabila tikus dengan berat badan 200 g/BB didapat 2 ml larutan yang dicampurkan. Jadi, konsentrasi sediaan yang dibuat adalah 4 mg/2 ml = 2 mg/ml.

d. Pembuatan Suspensi Ibuprofen

Ibuprofen ditimbang sesuai perhitungan diatas kemudian disuspensi dengan larutan Na CMC 0,5% sedikit demi sedikit. Serbuk Na CMC ditimbang sebanyak 500 mg, kemudian dilarutkan dalam sebagian aquadest hangat, diaduk dan ditambah aquadest sambil terus diaduk. Setelah larut semua sisa aquadest ditambahkan sampai didapatkan volume larutan Na CMC 100 mL.

3.7.4 Tahap Perlakuan

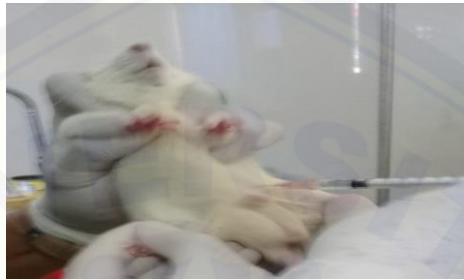
a. Sebelum diinduksi *Staphylococcus aureus*, tikus dipuaskan (tidak diberi pakan) selama 8 jam, tetapi tetap diberi air secara *ad libitum* (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Adaptasi hewan coba

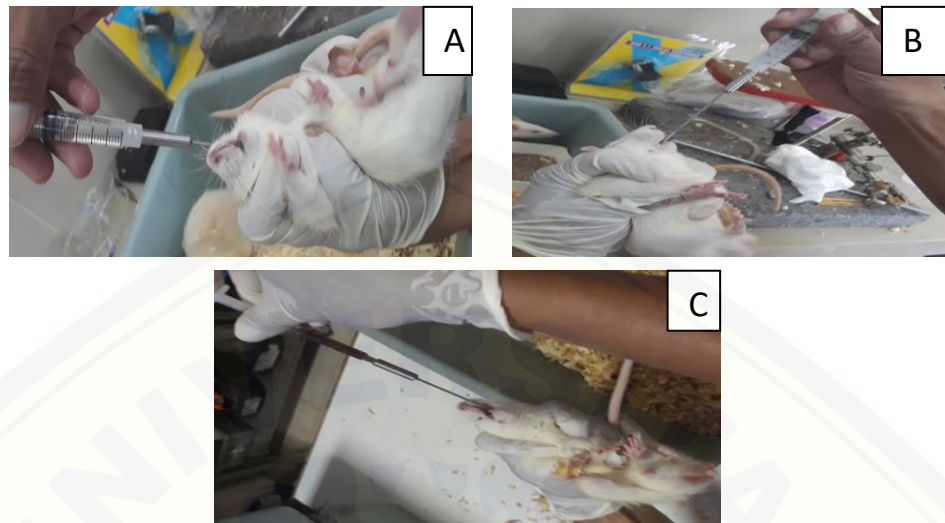
b. Masing-masing tikus diinjeksi *Staphylococcus aureus* dengan dosis 0,09 cc/100 gr BB tikus secara intraperitoneal yaitu dilakukan pada bagian bagian

posterior abdomen. Tikus dipegang pada bagian punggungnya, jarum diinjeksikan di posisi bawah lekukan lutut, kiri atau kanan dari garis tengah. Hindari melakukan injeksi pada garis tengah untuk mencegah penetrasi ke dalam kandung kemih. Sudut kemiringan jarum sekitar 45° ke tubuh (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 Injeksi bakteri *Staphylococcus aureus* secara intraperitoneal

- c. Tikus yang sudah diinjeksi suspensi *Staphylococcus aureus* dikelompokkan menjadi 3 kelompok secara acak, yaitu :
1. Kelompok 1
Terdiri dari 4 ekor tikus, merupakan kelompok kontrol (-) yang disondase aquades 2 ml
 2. Kelompok 2
Terdiri dari 4 ekor tikus, merupakan kelompok kontrol (+) yang disondase ibuprofen sebanyak 2 mg/ml untuk 200 g/BB tikus.
 3. Kelompok 3
Terdiri dari 4 ekor tikus, merupakan kelompok yang disondase seduhan biji kopi sebanyak 0,6 ml.
- d. Tikus diletakkan dalam kandang dan ditunggu 2 x 24 jam untuk proses pembentukan inflamasi.
- e. Seduhan biji kopi robusta dan ibuprofen diberikan 1 kali sehari selama 7 hari setelah terjadinya infeksi pada pagi hari (jam 7 pagi) setelah perlakuan dengan dosis 0,6 ml/hari untuk seduhan kopi dan 2 mg/ml ibuprofen untuk 200 g/BB tikus (Gambar 3.3).



Gambar 3.3 Tahap perlakuan hewan coba. (A) Pemberian sondase akuades 2 ml (B) Pemberian sondase obat ibuprofen 2 ml, (C) Pemberian sondase seduhan kopi robusta 0,6 ml

f. Pemeriksaan hapusan darah dilakukan pada hari ke 3, 5, dan 7 setelah perlakuan.

3.7.5 Tahap Pengamatan

a. Pengambilan sampel darah

Sampel darah diambil pada hari ke 3, 5, dan 7 setelah perlakuan. Cara pengambilan sampel darah yaitu dengan memegang bagian tengkuk tikus dan menjepitnya dengan jari tangan, setelah itu tikus dikondisikan senyaman mungkin. *Microhematocrit* dimasukkan 1-2 mm pada ujung soket bagian tengah dibawah bola mata tikus dengan sudut 45° . Kemudian *microhematocrit* diputar sampai darah keluar, selanjutnya darah ditampung pada tabung *Eppendorf* (Gambar 3.4)



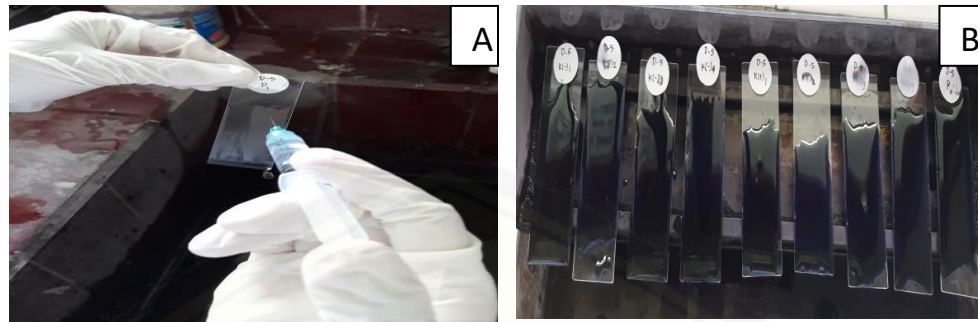
Gambar 3.4 Pengambilan darah melalui mata (*plexus retroorbitalis*)

- b. Pembuatan hapusan darah
1. Menyiapkan *object glass* dan *deck glass*.
 2. Memegang *object glass* yang telah ditetesi dengan darah kemudian memegang *deck glass* dengan sudut $\pm 30^\circ$.
 3. *Deck glass* diletakkan pada tetesan darah, sehingga menyentuh darah.
 4. Kemudian *deck glass* ditarik satu arah sehingga darah akan merata di atas *object glass* dan membentuk lapisan yang tipis.
 5. Kemudian hapusan darah dikeringkan dengan mengangin-anginkan di udara.
 6. *Object glass* siap untuk dilakukan pengecatan (Gambar 3.5).



Gambar 3.5 Sampel hapusan darah

- c. Pengecatan hapusan darah dengan *giemsa* (Wahyuni, 2015)
1. Letakkan *object glass* berisi hapusan darah yang sudah mengering diatas rak
 2. *object glass*.
 3. Hapusan darah difiksasi dengan cara meneteskan methanol 96% pada seluruh
 4. permukaan *object glass* selama 3-5 menit. Diletakkan dalam keadaan miring
 5. dan biarkan mengering.
 6. *Object glass* ditetesi dengan larutan *giemsa* dan biarkan selama 30 menit.
 7. Kemudian *object glass* disiram dengan air mengalir sampai bersih.
 8. Setelah bersih *object glass* diletakkan dalam keadaan miring dan dibiarkan
 9. mengering.
 10. Sediaan siap untuk dilakukan pengamatan (Gambar 3.6).



Gambar 3.6 Tahap pewarnaan hapusan darah. (A) Proses pemberian methanol 96%
(B) Proses pengecatan dengan *giemsa*

d. Penghitungan jumlah sel limfosit

Pewarnaan *giemsa* dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya sel limfosit. Bila pewarnaan telah dianggap baik, sediaan dikeringkan pada bagian bawah dengan menggunakan tisu, kemudian diberi label keterangan sesuai perlakuan, dan terakhir *object glass* ditutup dengan *deck glas*. Sebelum dilakukan pengamatan diberi 1 tetes minyak emersi pada sediaan yang akan diperiksa, kemudian dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 1000 kali (Zayyan *et al.*, 2016). Tabel 3.1 merupakan langkah penghitungan jumlah sel limfosit.

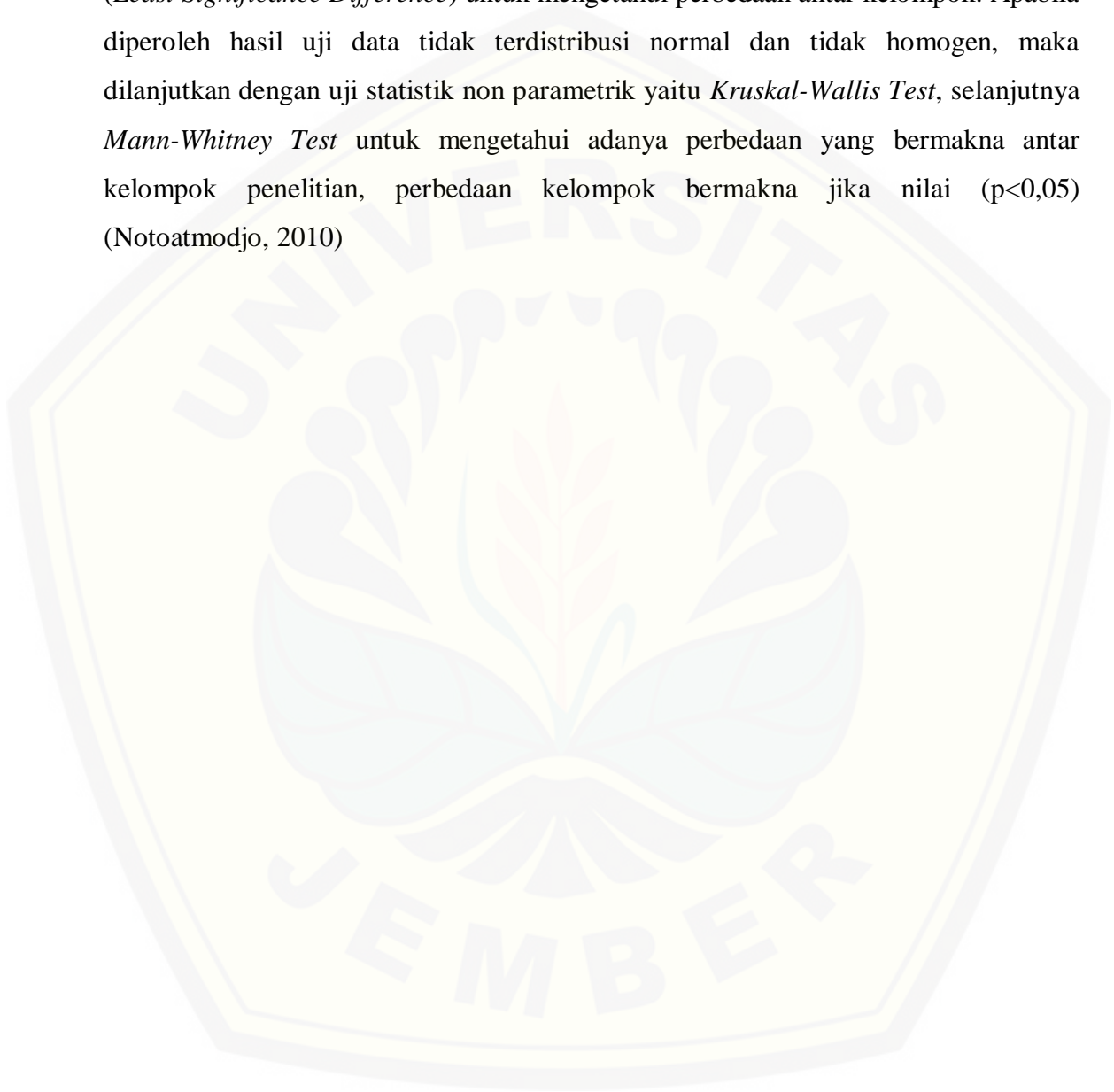
Tabel 3.1 Penghitungan jumlah sel limfosit

Jenis Leukosit	Jumlah Kolom ke										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Jumlah
Limfosit											

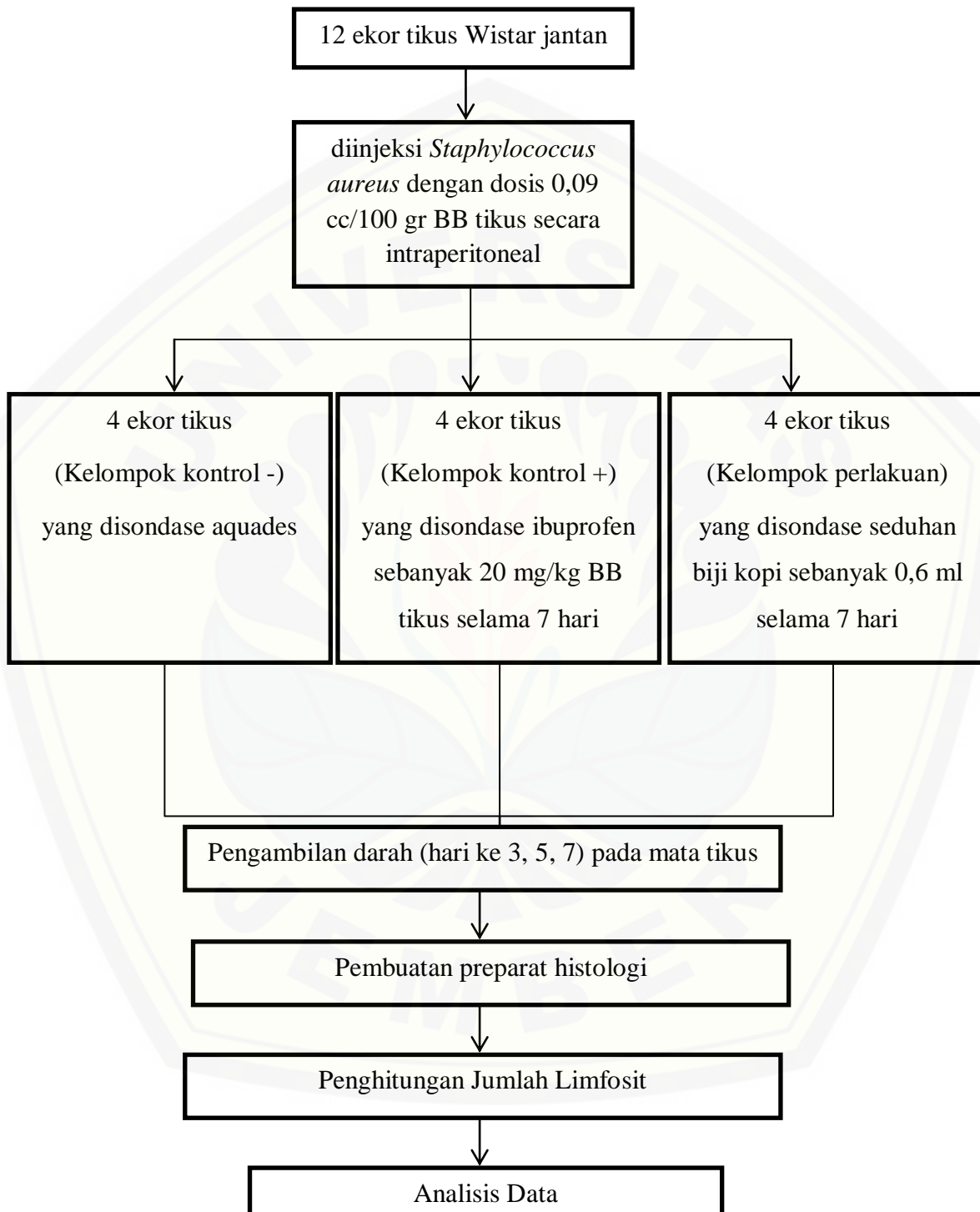
3.8 Analisa Data

Data yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk Test* untuk mengetahui distribusi data dan uji homogenitas data menggunakan *Levene Test*. Kedua uji tersebut dilakukan untuk mengetahui distribusi data dengan signifikansi ($p > 0,05$). Apabila diperoleh data

terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji parametrik dengan *One Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95% ($p < 0,05$), kemudian dilanjutkan uji LSD (*Least Significance Difference*) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Apabila diperoleh hasil uji data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik yaitu *Kruskal-Wallis Test*, selanjutnya *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok penelitian, perbedaan kelompok bermakna jika nilai ($p < 0,05$) (Notoatmodjo, 2010)



3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.7 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa seduhan biji kopi robusta (*Coffea canephora*) efektif menurunkan jumlah sel limfosit pada tikus wistar jantan yang diinduksi *Staphylococcus aureus*.

5.2 Saran

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

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap berbagai sel radang (monosit, neutrofil, eosinofil, dan basofil) pasca induksi *Staphylococcus aureus*.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) sebagai antiinflamasi pada tikus yang diinduksi bakteri lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, Umar Fahmi. 2006. *Imunisasi Mengapa Perlu?*. Jakarta: PT. Kompas Media Nusantara
- Bharath Nagur., Karibasappa Sowmya., Dhoom Singh Mehta. 2015. Determination of antibacterial activity of green coffee bean extract on periodontogenic bacteria like *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacteriumnucleatum* and *Aggregatibacteractinomycetemcomitans*: An *in vitro* study. *Contemporary Clinical Dentistry*. 6(2): 166-169.
- Chandra, Devi., R Hanung Ismono., Eka Kasymir. Prospek Perdagangan Kopi Robusta Indonesia di Pasar Internasional. *JIIA* 2013; 1(1).
- Chen, Y., Brown, P.H. 2012. Bioactivities of crude caffeine: antioxidant activity, cyclooxygenase-2 inhibitor, and enhanced glucose uptake. *Food Chemistry*. 131(2):564-568
- Corwin E.J. 2008. *Buku Saku Patofisiologi Corwin*. Edisi ke 3. EGC. Jakarta
- Daglia M, Rachi M, Papetti A, Lanni C, Govoni S, Gazzani G. 2000. In Vitro and Ex Vivo Antihydroxyl Radical Activity of Green and Roasted Coffee. *J Agric Food Chem*.
- Daly, J.W. (2007). Caffeine analogs: Biomedical impact. *Cell. Mol. Life Sci.*, 64(16), 2153–2169.
- Daniel, W. 2005. *Biostatistic Foundation for Analysis in The Health Science*. 8th Ed. Georgia: Willey
- Dewanti ,I Dewa A Ratna, Budirahardjo Roedy , EL Pujiana. *Robusta coffee beans decrease of inflammation in dental caries* . Competitive Research Grant. (2016).
- Ditjenbun. 2014. *Statistik Perkebunan Indonesia Komoditas Kopi 2013 - 2015*. Retrieved Februari 14, 2016, from Kementrian Pertanian Direktorat Jenderal Perkebunan: www.ditjenbun.pertanian.go.id
- Eichie, F.E., Arhewoh, I.M. & Ezeobi, O.C., 2009, In-Vitro Evaluation of the Pharmaceutical Quality of Some Ibuprofen Tablets Dispensed in Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 3(10): 491-495.

- Farah, Adriana. 2012. *Coffee :Emerging Health Effects and Disease Prevention, First Edition*. John Willey & Sons, Inc and Institute of Food Technologists (USA) : Wiley-Blackwell Publisng, Ltd
- Fawcett, D.W. 2002. *Buku Ajar Histologi*, penerjemah: Tambayong, A., judul buku asli: *A Textbook of Histology*. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta
- Frank U. 2003. Prevention and control of MRSA. In Fluit Ad C, and Franz-Josef Schitz (editors), *MRSA: Current perspectives*. Caister Academic Press, Norfolk England
- Gard, P. 2001. *Human Pharmacology*. New York: Taylor & Francis Inc.
- Garna, Herry. 2013. *Buku Ajar Divisi Infeksi dan Penyakit Tropis*. Jakarta: Sagung Seto.
- Gerin F., Erman H., Erboga M., Sener U., Yilmaz A., Seyhan H., Gurel A. 2016. The Effects of Ferulic Acid Against Oxidative Stress and Inflammation in Formaldehyde-Induced Hepatotoxicity. *Inflammation* : 39(4):1377-86
- Gjertsson I, Hultgren OH, Stenson M, Holmdahl R, Tarkowski A. Are B lymphocytes of importance in severe *Staphylococcus aureus* infections ? *Infect Immun*. 2000;68(5):2431–2434. doi: 10.1128/IAI.68.5.2431-2434.2000.
- Gunawan, Sulistia Gan. Setiabudy, Rianto. Nafrialdi. Elysabeth. 2007. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Jakarta: FKUI.
- Guyton, A.C., dan Hall, J.E. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 11. Jakarta: EGC
- Hall S, Desbrow B, Anoopkumar-Dukie S. 2015. A review of the bioactivity of coffee, caffeine, and key coffee constituents on inflammatory responses linked to depression. *Food Research International* 76: 626-636
- Handayani, V., Ahmad, A.R., Sudir, M. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga dan Daun Patikala (*Etilingera elatior*) Menggunakan Metode DPPH. *Journal*. ISSN 2407-2354: 86-93.
- Horrigan, L.A., Kelly, J.P., & Connor, T.J. (2004). Caffeine suppresses TNF- α production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Int. Immunopharmacol.*,4(10–11),1409–1417.

- Iwahashi, H. 1990. The effects of caffeic acid and its related catechols on hydroxyl radical formation by 3-hydroxyanthranilic acid, ferric chloride, and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 276: 242–247
- Jawetz, Melnick & Adelberg. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 25. Jakarta: Salemba Medika
- Junqueira L.C., J.Carneiro, R.O. Kelley. 2007. *Histologi Dasar*. Edisi ke-5. Tambayang J., penerjemah. Terjemahan dari Basic Histology. EGC: Jakarta.
- Kumar, V., Cotran, R.S., dan Robbins S.L. 2007. Buku Ajar Patologi. Edisi 7; ali Bahasa, Brahm U, Pendt ;editor Bahasa Indonesia, Huriawati Hartanto, Nurwany Darmaniah, Nanda Wulandari.-ed.7-Jakarta: EGC
- Kenisa Yorinta Putri ., Istiati., Wisnu Setyari J. 2012. Effect of Robusta coffee beans ointment on full thickness wound healing. Surabaya : *Department of Oral Biology* Faculty of Dentistry Airlangga University.
- Kusumastuti E., Handajani J., Susilowati H. 2014. *Ekspresi COX-2 dan Jumlah Neutrofil Fase Inflamasi pada Proses Penyembuhan Luka Setelah Pemberian Sistemik Ekstrak Etanolik Rosela (Hibiscus sabdariffa) (studi in vivo pada Tikus Wistar)*. Kediri : Fakultas Kedokteran Gigi Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata.
- Leeson, R.C., T.S. Leeson., A.A. Paparo. 1996. *Buku Ajar Histologi*. Edisi ke 5. Jakarta: EGC
- Llewelyn M., Cohen J., 2002. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect Dis.* 2:156–62.
- Lee Chen-Chen ., Ching-Chiung Wang., Huei-Mei Huang., Chu-Lun Lin., Sy-Jye Leu., Yueh-Lun Lee. 2015. Ferulic Acid Induces Th1 Responses by Modulating the Function of Dendritic Cells and Ameliorates Th2-Mediated Allergic Airway Inflammation in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* : 678487.
- Lou Z, Wang H, Zhu S, Ma C, Wang Z. 2011. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *Journal of Food Science*, 76(6):398-403


- Morgan, M., 2008, Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus and Animals: Zoonosis or Humanosis ?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 62: 1181-1187.
- Najiyati, S. dan Danarti. 2009. *Kopi: Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Neal, M.J. 2006. *At a Glance Farmakologi Medis*. Edisi 5, 70-71, Erlangga, Jakarta.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta : Rineka Cipta
- Oestreich-Janzen, S. 2010. *Chemistry of Coffee*. Hamburg Elsevier, Ltd
- Panggabean, E. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: Agro Media Pustaka.
- Pathak, L. Agrawal, Y., Dhir, A. 2013. Natural Polyphenols in the Management of Major Depression. *Expert Opin. Investing. Drugs*
- Prastowo, B., Elna K., Rubijo, Siswanto, Chandra I. dan S. Joni M. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Bogor : Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Price and Wilson. 2005. *Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit Edisi 6*. Vol.2. Jakarta : EGC.
- Rahardjo, Puji. 2012. *Panduan Budi Daya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. 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.
- Rosenbach, A. J. F. 1884. Mikro-organismen bel den Wund infectionskrankhelten des Menschen. JF Bergmann.
- Shen, W., Qi, R., Zhang, J., Wang, Z., Wang, H., Hu, C. 2012. Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. *Brain Res. Bull.*, 88(5), 487-494.
- Sherwood, Lauralee. 2001. *Fisiologi manusia : dari sel ke sistem*. Jakarta : EGC

- Susilawati IDA, Suryono, Ermawati T. 2014. Protective effect of coffee Against Coronary Atherosclerosis in Periodontitis Rat Model. *Journal of the Hongkong College of Cardiology*.
- Tagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito Y., Oikawa, S., Kobayashi, M. 2009. *In vitro and In vivo* antioxidant properties of ferulic acid: a comparative study with other natural oxidation inhibitors. *Food Chem.* 114(2):466-471
- Wahyuni, Sitti. 2015. *Manual Keterampilan Pengambilan Darah Tepi, Membuat Hapusan, Pewarnaan Giemsa dan Pemeriksaan Mikroskopik Hapusan Darah Tepi*. Bagian Parasitologi Universitas Hasanuddin.
- Xu, J.-G., Hu, Q. -P., & Liu, Y. 2012. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *J. Agric. Food Chem.*, 60(46), 11625-11630
- Zayyan, A. B., Nahzi, M. Y., & O, I. K. (2016). Pengaruh Ekstrak Kulit manggis (*Garcinia Mangostana L.*) Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Inflamasi Pulpa. *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi Vol.1 No.2*, 140-145.

Lampiran A. Surat *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</p>	
<p><u>No. 151/UN25.8/KEPK/DL/2018</u></p>	
Title of research protocol	<p>: "Efek Seduhan Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>) Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi <i>Staphylococcus aureus</i>"</p>
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Okta Fitri Nurhayati
Member of research	: -
Responsible Physician	: Okta Fitri Nurhayati
Date of approval	: September 3 rd , 2018
Place of research	: Laboratory of Physiology 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, September 5th, 2018</p>	
<p>Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>	<p>Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>
 <p>(drg. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)</p>	 <p>(drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si)</p>

Lampiran B. Surat Ijin Penelitian


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


Nomor : A90 / UN25.8.TL/2018
 Perihal : Ijin Penelitian 29 OCT 2018

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

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

1	Nama	: Okta Fitri Nurhayati
2	NIM	: 151610101048
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Perum Mastrip Blok F Nomor 7 Jember
6	Judul Penelitian	: Efek Seduhan Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>) Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi <i>Staphylococcus aureus</i>
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8	Data/alat yg dipinjam	: -
9	Waktu	: Oktober 2018 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Mengetahui Efek Pemberian Seduhan Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>) Terhadap Jumlah Sel Limfosit Pada Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi <i>Staphylococcus aureus</i>
11	Dosen Pembimbing	: 1. Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes, Sp.OF : 2. drg. Budi Yuwono, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih


 Pembantu Dekan I,
 Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
 NIP.196109031986022001

Lampiran C. Surat Identifikasi Tanaman Biji Kopi Robusta

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



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

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

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 56/PL17.3.1.02/LL/2018

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 4188/UN25.8/TL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Okta Fitri Nurhayati
NIM : 151610101048
Jur/Fak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

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

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 15 Nopember 2018

Ka. Laboratorium Tanaman



Ir. Lilik Mastuti, MP
NIP. 195808201987032001

Lampiran D. Surat Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

LABORATORIUM MIKROBIOLOGI
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER

SURAT KETERANGAN

No. 0160/MIKRO/S.KET/2019

Sehubungan dengan keperluan identifikasi mikroorganisme, maka kami menerangkan bahwa mahasiswa berikut:

Nama : Okta Fitri Nurhayati
NIM : 151610101048
Fakultas : Kedokteran Gigi
Keperluan : Penelitian

Telah melakukan uji identifikasi terhadap isolat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan hasil *coccus*, gram positif dan tidak terkontaminasi.

Jember, 08 April 2019

Mengetahui,

Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi

Penanggung Jawab Lab. Mikro

(drg. Amandia Dewi Permana Shita, M. Biomed)

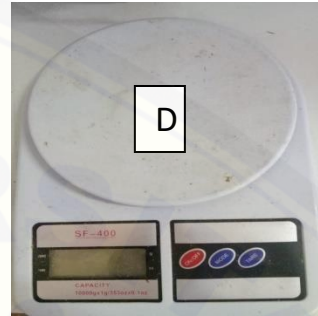
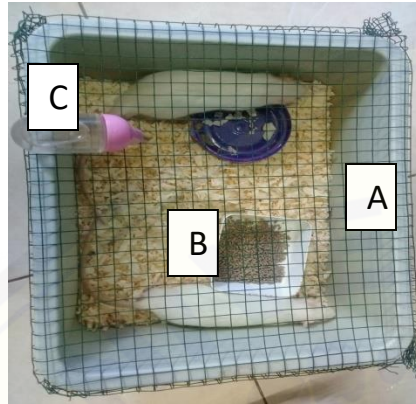
(drg. Pujana Endah Lestari, M. Kes)

NIP. 198006032006042002

NIP. 197608092005012002

Lampiran E. Alat Penelitian

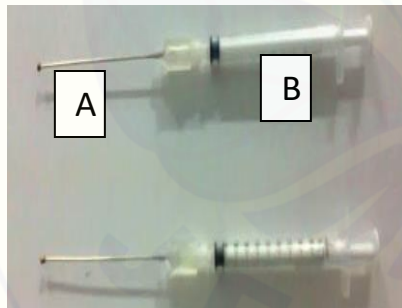
1. Alat Pemeliharaan hewan coba



Keterangan :

- A : Kandang tikus
- B : Tempat makan tikus
- C : Tempat minum tikus
- D : Timbangan digital

2. Alat sondase aquades, ibuprofen, dan seduhan kopi robusta



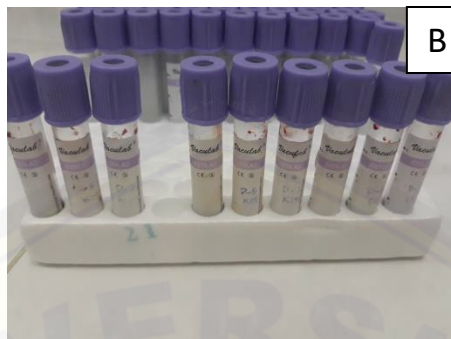
Keterangan :

- A : Sonde lambung tikus
- B : *Disposable syringe*

3. Alat pengambilan dan pengamatan darah tikus



A



B



C

Keterangan :

- A : Hematocrite
- B : tabung Eppendorf
- C : Mikroskop

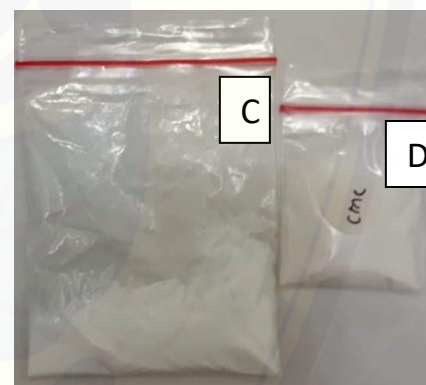
Lampiran F. Bahan Penelitian



A



B



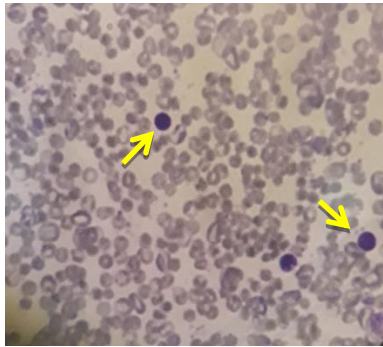
C

D

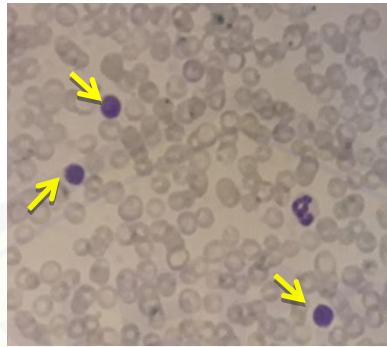
Keterangan :

- A : Kopi bubuk robusta murni
- B : Akuades
- C : Ibuprofen
- D : CMC-Na

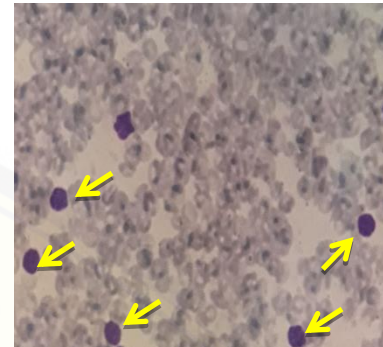
Lampiran G. Hasil Penelitian Jumlah Sel Limfosit Perbesaran 1000X



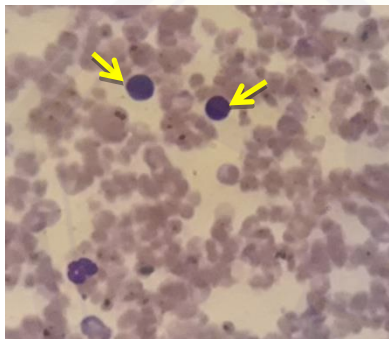
Kelompok K- hari ke-3



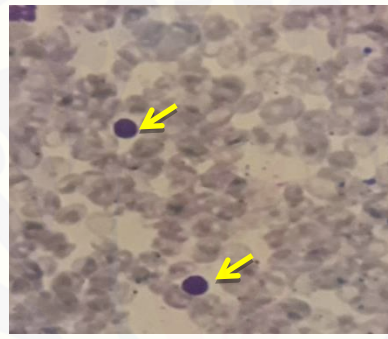
Kelompok K- hari ke-5



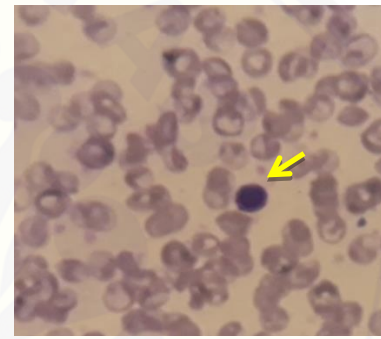
Kelompok K- hari ke-7



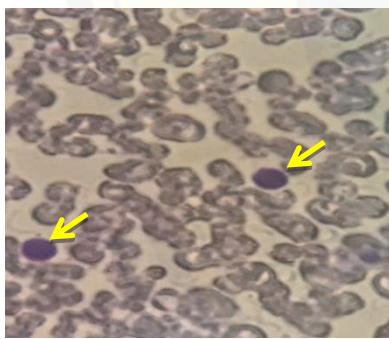
Kelompok K+ hari ke-3



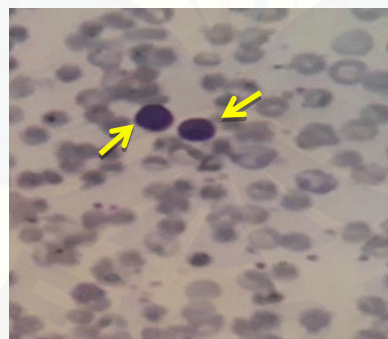
Kelompok K+ hari ke-5



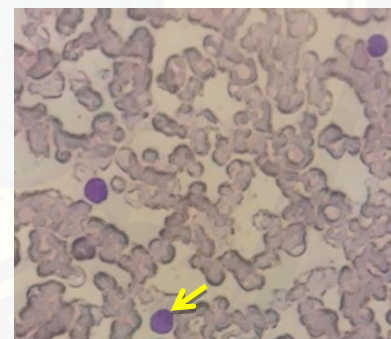
Kelompok K+ hari ke-7



Kelompok perlakuan kopi H-3



Kelompok perlakuan kopi H-5



Kelompok perlakuan kopi H-7

Lampiran H. Tabel perhitungan jumlah sel limfosit

Kelompok	Sampel	Jumlah Limfosit			Jumlah Total	Rata-rata
		Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3		
1	H3 K-1	20	19	24	63	21
	H3 K-2	24	26	25	75	25
	H3 K-3	29	32	29	90	30
	H3 K-4	29	33	30	93	31
2	H5 K-1	42	42	42	126	42
	H5 K-2	45	42	48	135	45
	H5 K-3	44	44	47	135	45
	H5 K-4	48	47	46	141	47
3	H7 K-1	59	51	55	165	55
	H7 K-2	55	49	58	162	54
	H7 K-3	63	59	62	183	61
	H7 K-4	61	58	58	177	59
4	H3 K+1	22	27	26	75	25
	H3 K+2	30	24	26	81	27
	H3 K+3	24	26	22	72	24
	H3 K+4	29	26	24	81	27
5	H5 K+1	19	17	18	54	18
	H5 K+2	20	22	18	60	20
	H5 K+3	16	20	15	51	17
	H5 K+4	23	19	24	66	22
6	H7 K+1	14	10	12	36	12
	H7 K+2	14	16	12	42	14
	H7 K+3	11	11	14	36	12
	H7 k+4	17	20	14	51	17
7	H3 P1	34	29	33	96	32
	H3 P2	27	31	32	90	30
	H3 P3	22	27	29	78	26
	H3 P4	27	30	33	90	30
8	H5 P1	27	21	24	72	24
	H5 P2	26	24	19	69	23
	H5 P3	18	22	20	60	20
	H5 P4	28	22	25	75	25
9	H7 P1	10	14	12	36	12
	H7 P2	13	9	11	33	11
	H7 P3	14	18	16	48	16
	H7 P4	22	18	20	60	20

Lampiran I. Hasil uji statistik

I1. Hasil Uji Normalitas dengan *Saphiro Wilk*

Tests of Normality

kelom pok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
jumlahlimfosit 1	.258	4	.	.917	4	.519
2	.298	4	.	.926	4	.572
3	.252	4	.	.916	4	.513
4	.298	4	.	.849	4	.224
5	.214	4	.	.963	4	.798
6	.271	4	.	.848	4	.220
7	.329	4	.	.895	4	.406
8	.250	4	.	.927	4	.577
9	.248	4	.	.925	4	.564

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

Jumlahlimfosit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	4	26.75	4.646	2.323	19.36	34.14	21	31
2	4	44.75	2.062	1.031	41.47	48.03	42	47
3	4	57.25	3.304	1.652	51.99	62.51	54	61
4	4	25.75	1.500	.750	23.36	28.14	24	27
5	4	19.25	2.217	1.109	15.72	22.78	17	22

6	4	13.75	2.363	1.181	9.99	17.51	12	17
7	4	29.50	2.517	1.258	25.50	33.50	26	32
8	4	23.00	2.160	1.080	19.56	26.44	20	25
9	4	14.75	4.113	2.056	8.21	21.29	11	20
Total	36	28.31	13.866	2.311	23.61	33.00	11	61

I2. Hasil Uji Homogenitas dengan *Levene Test*

Test of Homogeneity of Variances

jumlahlimfosit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.978	8	27	.089

I3. Hasil Uji Parametrik One Way Anova

ANOVA

jumlahlimfosit	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6497.389	8	812.174	94.418	.000
Within Groups	232.250	27	8.602		
Total	6729.639	35			

I4. Hasil Uji LSD (*Least Significance Difference*)

Multiple Comparisons

jumlahlimfosit

LSD

(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (-) hari ke 3	K(-) hari ke 5	-18.000*	2.074	.000	-22.26	-13.74
	K(-) hari ke 7	-30.500*	2.074	.000	-34.76	-26.24
	K(+) hari ke 3	1.000	2.074	.634	-3.26	5.26
	K(+) hari ke 5	7.500*	2.074	.001	3.24	11.76
	K(+) hari ke 7	13.000*	2.074	.000	8.74	17.26
	Perlakuan hari ke 3	-2.750	2.074	.196	-7.01	1.51
	Perlakuan hari ke 5	3.750	2.074	.082	-.51	8.01
	Perlakuan hari ke 7	12.000*	2.074	.000	7.74	16.26
K(-) hari ke 5	K (-) hari ke 3	18.000*	2.074	.000	13.74	22.26
	K(-) hari ke 7	-12.500*	2.074	.000	-16.76	-8.24
	K(+) hari ke 3	19.000*	2.074	.000	14.74	23.26
	K(+) hari ke 5	25.500*	2.074	.000	21.24	29.76
	K(+) hari ke 7	31.000*	2.074	.000	26.74	35.26
	Perlakuan hari ke 3	15.250*	2.074	.000	10.99	19.51
	Perlakuan hari ke 5	21.750*	2.074	.000	17.49	26.01
	Perlakuan hari ke 7	30.000*	2.074	.000	25.74	34.26
K(-) hari ke 7	K(-) hari ke 3	30.500*	2.074	.000	26.24	34.76
	K(-) hari ke 5	12.500*	2.074	.000	8.24	16.76
	K(+) hari ke 3	31.500*	2.074	.000	27.24	35.76
	K(+) hari ke 5	38.000*	2.074	.000	33.74	42.26
	K(+) hari ke 7	43.500*	2.074	.000	39.24	47.76
	Perlakuan hari ke 3	27.750*	2.074	.000	23.49	32.01

	Perlakuan hari ke 5	34.250*	2.074	.000	29.99	38.51
	Perlakuan hari ke 7	42.500*	2.074	.000	38.24	46.76
K(+) hari ke 3	K(-) hari ke 3	-1.000	2.074	.634	-5.26	3.26
	K(-) hari ke 5	-19.000*	2.074	.000	-23.26	-14.74
	K(-) hari ke 7	-31.500*	2.074	.000	-35.76	-27.24
	K(+) hari ke 5	6.500*	2.074	.004	2.24	10.76
	K(+) hari ke 7	12.000*	2.074	.000	7.74	16.26
	Perlakuan hari ke 3	-3.750	2.074	.082	-8.01	.51
	Perlakuan hari ke 5	2.750	2.074	.196	-1.51	7.01
	Perlakuan hari ke 7	11.000*	2.074	.000	6.74	15.26
	K(+) hari ke 5	K(-) hari ke 3	-7.500*	2.074	.001	-11.76
K(-) hari ke 5		-25.500*	2.074	.000	-29.76	-21.24
K(-) hari ke 7		-38.000*	2.074	.000	-42.26	-33.74
K(+) hari ke 3		-6.500*	2.074	.004	-10.76	-2.24
K(+) hari ke 7		5.500*	2.074	.013	1.24	9.76
Perlakuan hari ke 3		-10.250*	2.074	.000	-14.51	-5.99
Perlakuan hari ke 5		-3.750	2.074	.082	-8.01	.51
Perlakuan hari ke 7		4.500*	2.074	.039	.24	8.76
K(+) hari ke 7		K(-) hari ke 3	-13.000*	2.074	.000	-17.26
	K(-) hari ke 5	-31.000*	2.074	.000	-35.26	-26.74
	K(-) hari ke 7	-43.500*	2.074	.000	-47.76	-39.24
	K(+) hari ke 3	-12.000*	2.074	.000	-16.26	-7.74
	K(+) hari ke 5	-5.500*	2.074	.013	-9.76	-1.24
	Perlakuan hari ke 3	-15.750*	2.074	.000	-20.01	-11.49
	Perlakuan hari ke 5	-9.250*	2.074	.000	-13.51	-4.99
	Perlakuan hari ke 7	-1.000	2.074	.634	-5.26	3.26
	Perlakuan hari ke 3	K(-) hari ke 3	2.750	2.074	.196	-1.51
K(-) hari ke 5		-15.250*	2.074	.000	-19.51	-10.99
K(-) hari ke 7		-27.750*	2.074	.000	-32.01	-23.49

	K(+) hari ke 3	3.750	2.074	.082	-51	8.01
	K(+) hari ke 5	10.250*	2.074	.000	5.99	14.51
	K(+) hari ke 7	15.750*	2.074	.000	11.49	20.01
	Perlakuan hari ke 5	6.500*	2.074	.004	2.24	10.76
	Perlakuan hari ke 7	14.750*	2.074	.000	10.49	19.01
Perlakuan hari ke 5	K(-) hari ke 3	-3.750	2.074	.082	-8.01	.51
	K(-) hari ke 5	-21.750*	2.074	.000	-26.01	-17.49
	K(-) hari ke 7	-34.250*	2.074	.000	-38.51	-29.99
	K(+) hari ke 3	-2.750	2.074	.196	-7.01	1.51
	K(+) hari ke 5	3.750	2.074	.082	-51	8.01
	K(+) hari ke 7	9.250*	2.074	.000	4.99	13.51
	Perlakuan hari ke 3	-6.500*	2.074	.004	-10.76	-2.24
	Perlakuan hari ke 7	8.250*	2.074	.000	3.99	12.51
Perlakuan hari ke 7	K(-) hari ke 3	-12.000*	2.074	.000	-16.26	-7.74
	K(-) hari ke 5	-30.000*	2.074	.000	-34.26	-25.74
	K(-) hari ke 7	-42.500*	2.074	.000	-46.76	-38.24
	K(+) hari ke 3	-11.000*	2.074	.000	-15.26	-6.74
	K(+) hari ke 5	-4.500*	2.074	.039	-8.76	-.24
	K(+) hari ke 7	1.000	2.074	.634	-3.26	5.26
	Perlakuan hari ke 3	-14.750*	2.074	.000	-19.01	-10.49
	Perlakuan hari ke 5	-8.250*	2.074	.000	-12.51	-3.99

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