



**EFEK PEMBERIAN KOPI ROBUSTA TERHADAP EKSPRESI
MATRIX METALLOPROTEINASE-9 (MMP-9) PADA
ARTERI KORONER TIKUS YANG DIINDUKSI
DIET TINGGI LEMAK**

SKRIPSI

Oleh

**Widy Jatmiko
NIM 151610101075**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**EFEK PEMBERIAN KOPI ROBUSTA TERHADAP EKSPRESI
MATRIX METALLOPROTEINASE-9 (MMP-9) PADA
ARTERI KORONER TIKUS YANG DIINDUKSI
DIET TINGGI LEMAK**

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

**Widy Jatmiko
NIM 151610101075**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda tercinta Sukatin yang menjadi alasan untuk segera menyelesaikan skripsi ini;
2. Adikku tercinta Dwi Anggraini;
3. Dosen pembimbingku drg. Nadie Fatimatuzzahro.,M.D.Sc., drg. Rendra Chriestedy Prasetya.,M.D.Sc;
4. Dosen pembimbing akademik drg. Winny Adriatmoko.,M.Kes;
5. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTO

Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.
(terjemahan Surat *Al-Mujadalah* ayat 11)^{*)}¹

Siapapun yang tidak pernah berbuat kesalahan, maka tidak akan pernah menemukan sesuatu yang baru.
(Albert Einstein)^{**)}

Setiap orang adalah jenius, tapi jika kamu menilai seekor ikan dari kemampuannya memanjat pohon, maka seumur hidupnya dia akan mempercayai kalau dia bodoh.
(Albert Einstein)^{**)}

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo

^{**)} Calaprice. 1996. *The Quotable Einstein*. New Jersey: Princeton University Press

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Widy Jatmiko

NIM : 151610101075

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Pemberian Kopi Robusta Terhadap Ekspresi *Matrix Metalloproteinase-9* (MMP-9) pada Arteri Koroner Tikus yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak” 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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 10 April 2019

Yang menyatakan

Widy Jatmiko

NIM 151610101075

SKRIPSI

**EFEK PEMBERIAN KOPI ROBUSTA TERHADAP EKSPRESI *MATRIX*
METALLOPROTEINASE-9 (MMP-9) PADA
ARTERI KORONER TIKUS YANG DIINDUKSI
DIET TINGGI LEMAK**

Oleh

Widy Jatmiko
NIM 151610101075

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Nadie Fatimatuzzahro., M.D.Sc.

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Rendra Chriestedy Prasetya., M.D.Sc.

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Kopi Robusta Terhadap Ekspresi *Matrix Metalloproteinase-9* (MMP-9) pada Arteri Koroner Tikus yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak” karya Widy Jatmiko telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 10 April 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua

Penguji Anggota

Prof. Dr. drg. I.D.A Ratna Dewanti.,M.Si.
NIP 196705021997022001

drg. Zahara Meilawaty., M.Kes.
NIP 198005272008122002

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

drg. Nadie Fatimatuzzahro.,M.D.Sc.
NIP 198204242008012022

drg. Rendra Chriestedy rasetya.,M.D.Sc.
NIP 198305312008011003

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

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

RINGKASAN

Efek Pemberian Kopi Robusta Terhadap Ekspresi *Matrix Metalloproteinase-9* (MMP-9) pada Arteri Koroner Tikus yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak.

Widy Jatmiko, 151610101075; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Angka kematian akibat PJK di Indonesia mengalami peningkatan dari 11,06% pada tahun 2011 menjadi 42,3% pada tahun 2013. Penyebab utama PJK adalah aterosklerosis yang dipicu oleh kondisi hiperlipidemia yang ditandai dengan akumulasi LDL pada dinding pembuluh darah sehingga memicu stres oksidatif. Hal ini akan meningkatkan *reactive oxygen species* (ROS) dan menyebabkan LDL teroksidasi membentuk oxLDL yang direpson sebagai benda asing. Kondisi ini memicu makrofag untuk memfagositosis oxLDL sehingga membentuk *foam cell*. Selain itu, makrofag dan sel endotel mensekresikan *matrix metalloproteinase-9* (MMP-9) yang berfungsi sebagai pendegradasi kolagen pada lesi ateroma sehingga menyebabkan ruptur. Oleh karena itu dibutuhkan suatu bahan yang dapat menghambat ekspresi MMP-9 salah satunya kopi robusta. Kopi robusta mengandung kafein yang berperan dalam reendotelisasi, *ferulic acid* sebagai antioksidan, *chlorogenic acid* (CGAs) dan *dihydrocaffeic acid* (DHCA) yang berperan sebagai inhibitor MMP-9.

Jenis penelitian ini adalah *tru experimental* dengan rancangan penelitian *randomized post test only control group design*. Sampel yang digunakan dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok hiperlipidemia, dan kelompok perlakuan kopi. Pakan hiperlipid dibuat dengan mencampurkan 3 gram lemak babi dan 2 gram kuning telur sedangkan seduhan kopi diberikan sebanyak 3,6 ml secara sondase. Pada hari ke-29 hewan coba dikorbankan untuk diambil organ jantung yang selanjutnya dilakukan pemrosesan jaringan secara histologi dan immunohistokimia. Pengamatan ekspresi MMP-9 yang dilakukan oleh tiga orang pengamat dan pengukuran ekspresi MMP-9 menggunakan *histo score*.

Gambaran immunohistokimia menunjukkan ekspresi MMP-9 lebih kuat pada kelompok hiperlipidemia yang ditandai dengan intensitas warna coklat yang

lebih kuat dibandingkan dengan kelompok kontrol dan perlakuan kopi. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna. Selanjutnya, hasil uji *post hoc* LSD menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) pada semua kelompok.

Penurunan ekspresi MMP-9 pada kelompok perlakuan kopi diduga karena pada kopi terdapat senyawa fitofarmaka seperti kafein, CGAs, DHCA, dan *ferulic acid*. CGAs dapat berperan sebagai antioksidan terhadap oksidasi LDL. Kafein, CGAs, dan DHCA dapat menghambat jalur persinyalan *protein kinase-D* (PKD), *I kinase-K* (IKK), *Nuclear Factor Kappa-β* (NF-κβ) sehingga menghambat sitokin pro inflamasi yaitu *interleukin-8* (IL-8) melalui pengikatan ROS intraselular. *Ferulic acid* menghambat MMP-9 melalui beberapa mekanisme antara lain penghambatan langsung ROS melalui mekanisme *radical scavenging*, donor hidrogen, inhibisi enzim oksidatif, pengikatan logam yang merubah O₂ dan H₂O menjadi radikal bebas, serta memperbaiki komponen sel yang rusak. Berdasarkan uraian tersebut dapat disimpulkan pemberian seduhan kopi dapat menurunkan ekspresi MMP-9 pada sel endotel tunika intima arteri koroner tikus yang diinduksi diet tinggi lemak.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Kopi Robusta Terhadap Ekspresi *Matrix Metalloproteinase-9* (MMP-9) pada Arteri Koroner Tikus yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. Nadie Fatimatuzzahro., M.D.Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama, drg. Rendra Chriestedy Prasetya., M.D.Sc., selaku Dosen Pembimbing Pendamping, yang telah membagikan ilmu, waktu dan pengalamannya dalam proses penyelesaian skripsi penulis;
2. Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti., M.Si., selaku Penguji Ketua, drg. Zahara Meilawaty., M.Kes., selaku Penguji Anggota, yang telah bersedia meluangkan waktu untuk membaca, memberikan kritik dan memberikan saran pada skripsi penulis;
3. drg. Winny Adriatmoko., M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Ibu Sukatin dan adikku Dwi Anggraini yang telah memberikan dorongan dan doanya demi terselesaikannya skripsi ini;
5. Teman-teman satu proyek penelitian Moch. Bahrul Ulum dan Falah Yudana; dan
6. 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, April 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
 BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan	4
1.4. Manfaat	4
 BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Arteri Koroner	5
2.2. Aterosklerosis	6
2.2.1. Definisi	6
2.2.2. Faktor Risiko	7
2.2.3. Patogenesis	8
2.3. <i>Matrix Metalloproteinase-9</i> (MMP-9)	9
2.4. Kopi	11
2.5. Kerangka Konseptual	16
2.6. Hipotesis Penelitian	17

BAB 3. METODE PENELITIAN

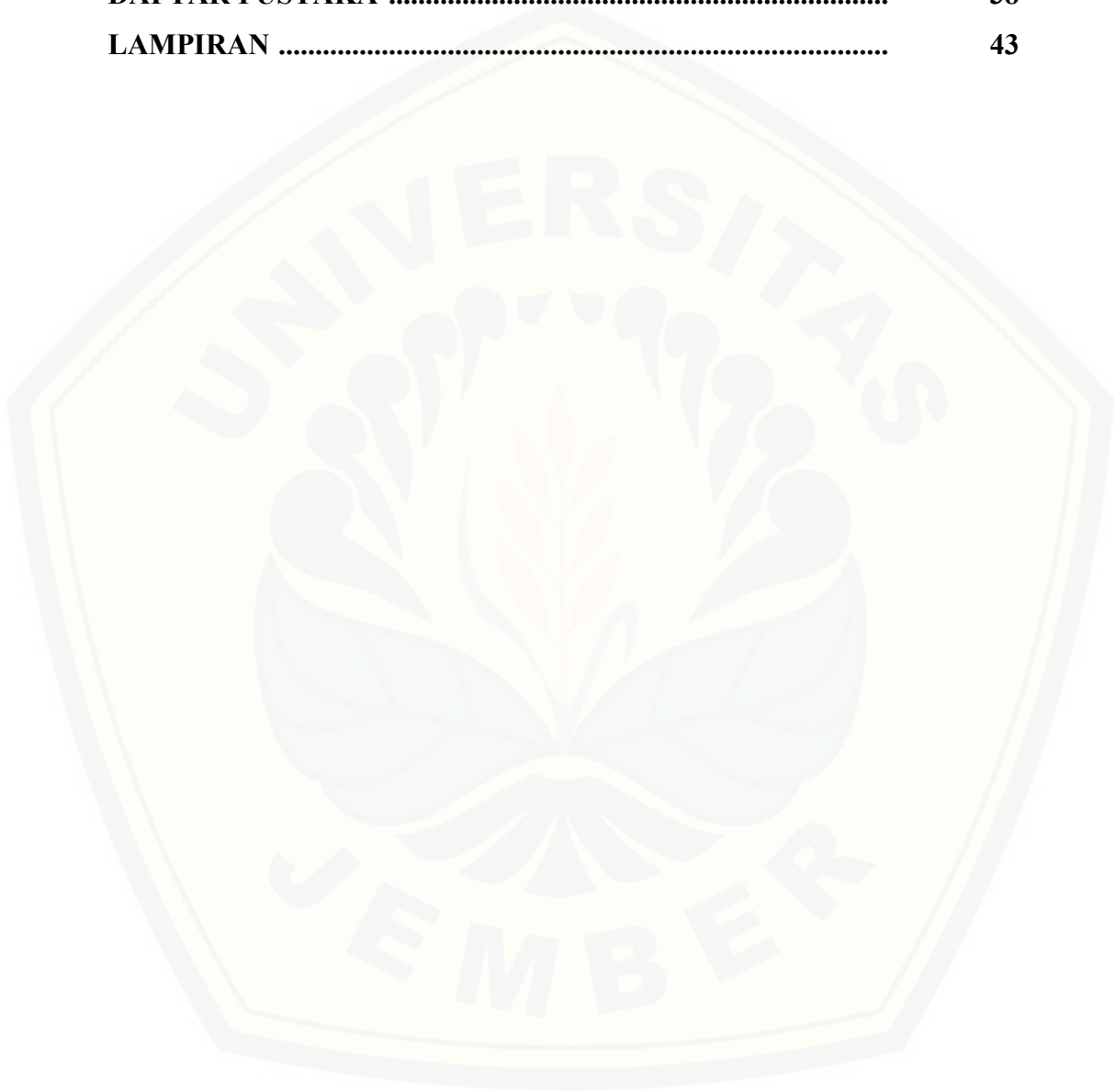
3.1.	Jenis dan Rancangan Penelitian	18
3.2.	Waktu dan Tempat Penelitian	19
	3.2.1. Waktu Penelitian	19
	3.2.2. Tempat Penelitian	19
3.3.	Populasi dan Sampel	19
3.4.	Variabel Penelitian	20
	3.4.1. Variabel Bebas	20
	3.4.2. Variabel Terikat	20
	3.4.3. Variabel Terkendali	20
3.5.	Definisi Operasional	21
	3.5.1. Diet Tinggi Lemak	21
	3.5.2. Seduhan Kopi Robusta	21
	3.5.3. MMP-9	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. Uji Kelayakan Etik (<i>Ethical Clearance</i>)	22
	3.7.2. Adaptasi dan Perawatan Hewan Coba	23
	3.7.3. Pembuatan Larutan Perlakuan	23
	3.7.4. Perlakuan pada Kelompok Hewan Coba.....	23
	3.7.5. Pengambilan Arteri Koroner	24
	3.7.6. Pemrosesan Jaringan (Arteri Koroner)	24
3.8.	Pengamatan	27
3.9.	Analisis Data	27
3.10.	Alur Penelitian	28

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1.	Hasil Penelitian	29
4.2.	Analisis Data	31
4.3.	Pembahasan	32

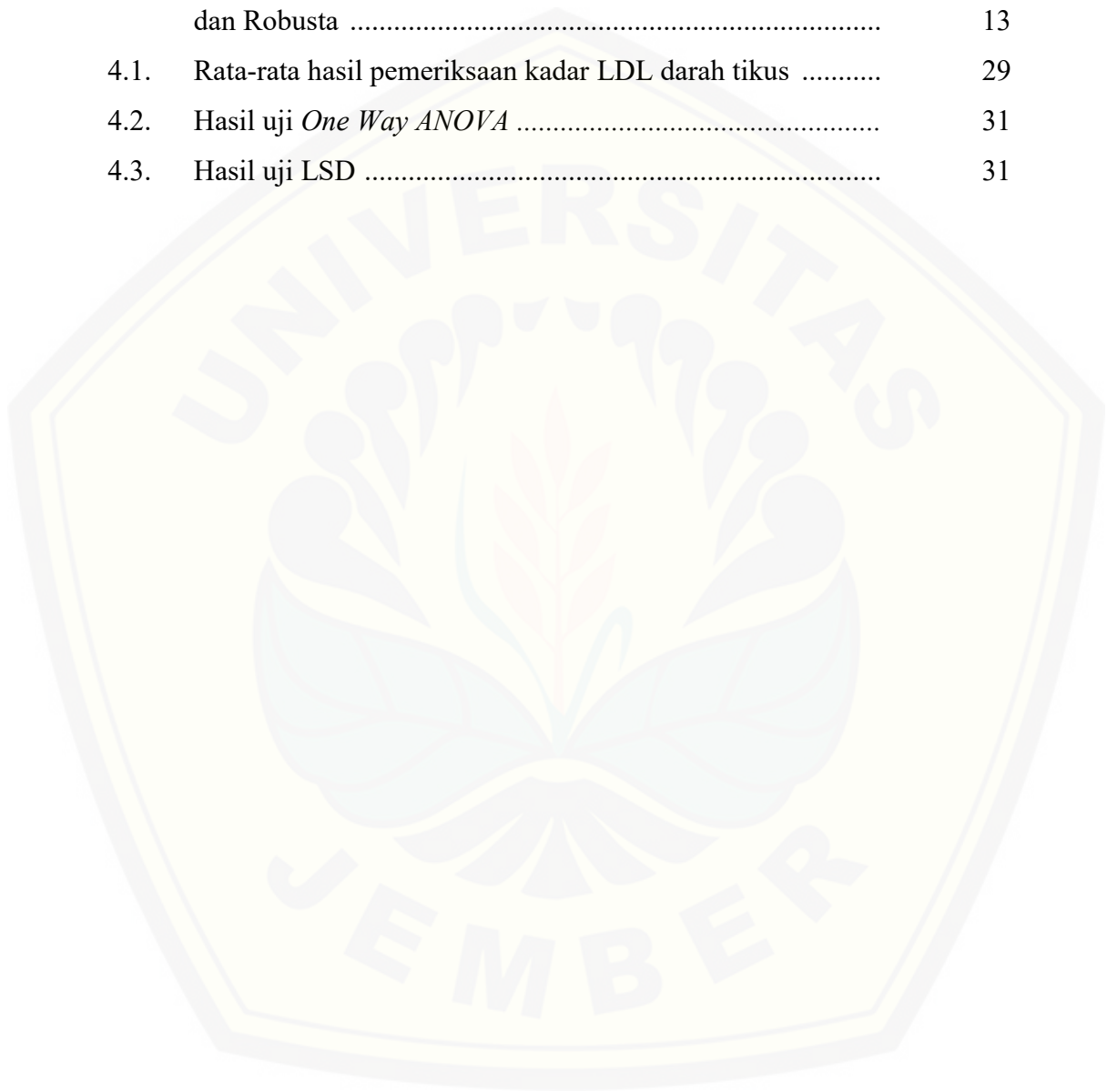
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan	37
5.2. Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	43



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1. Perbedaan kandungan kimia pada biji kopi Arabika dan Robusta	13
4.1. Rata-rata hasil pemeriksaan kadar LDL darah tikus	29
4.2. Hasil uji <i>One Way ANOVA</i>	31
4.3. Hasil uji LSD	31

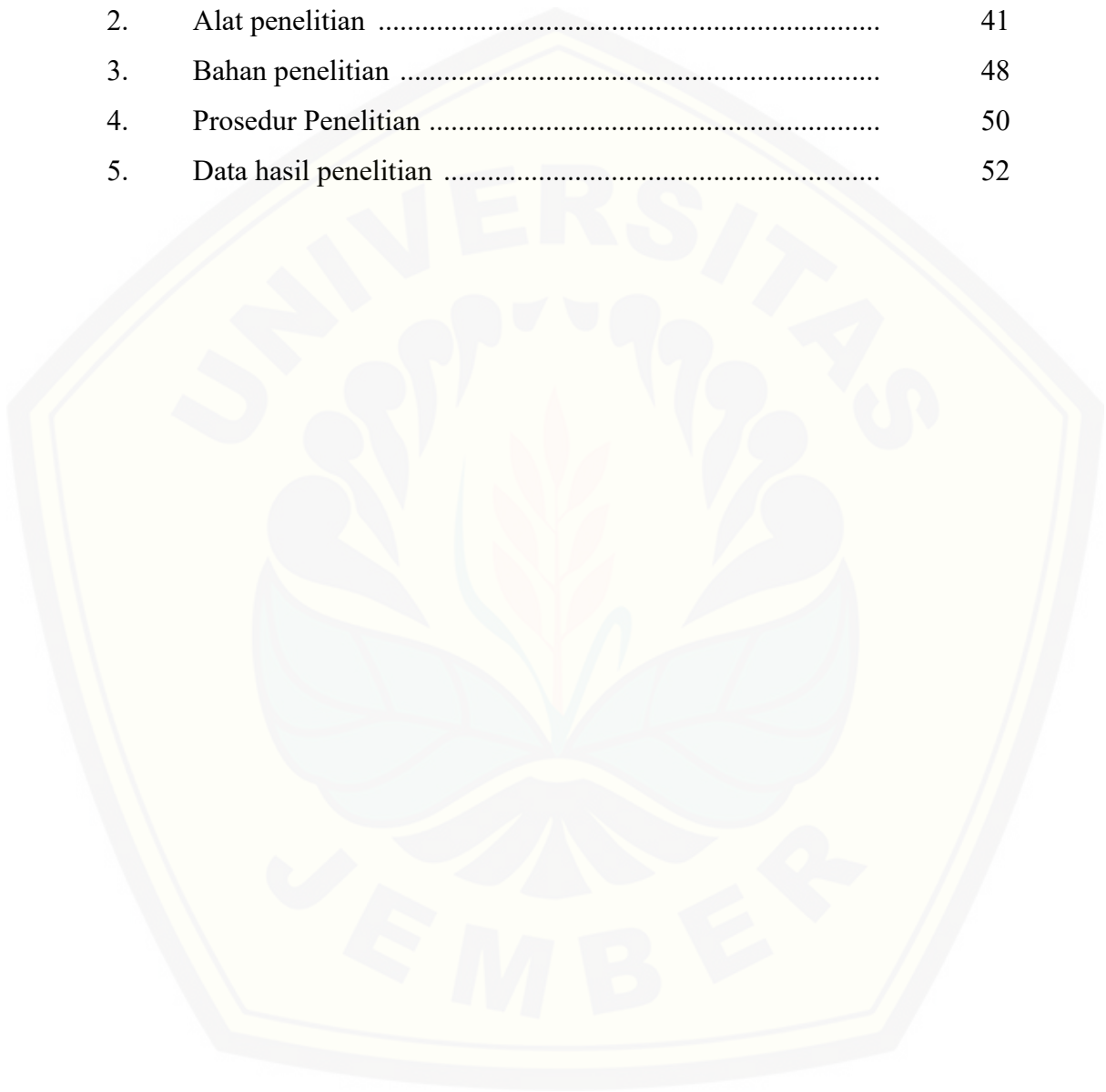


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. Anatomi arteri koroner	5
2.2. Penampang histologi arteri koroner	6
2.3. Mekanisme pemebntukan ateroma (plak aterosklerosis)	9
2.4. Struktur kimia MMPs.....	10
2.5. Peran MMPs dalam ruptur ateroma	11
2.6. Struktur kimia kafein	14
2.7. Struktur kimia <i>Chlorogenic acid</i> (CGAs)	14
2.8. Struktur kimia <i>dihydrocaffeic acid</i> (DHCA)	15
2.9. Struktur kimia <i>ferulic acid</i>	15
2.10. Kerangka konseptual penelitian	16
3.1. Rancangan Penelitian	18
3.2. Prosedur pengambilan bagian arteri koroner	24
3.3. Alur Penelitian	28
4.1. Gambaran histologi arteri koroner tikus dengan pewarnaan immunohistokimia (IHC)	30
4.2. Mekanisme oksidasi LDL dan pembentukan <i>foam cell</i>	33
4.3. Mekanism penghambatan jalur PKD, IKK, NF-kB dan IL-8 dalam menghambat ekspresi MMP-9 yang diperantarai oleh Chlorogenic acid dan kafein	35
4.4. Mekanisme <i>ferulic acid</i> dalam menghambat radikal bebas.....	36

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. <i>Ethical clearance</i>	40
2. Alat penelitian	41
3. Bahan penelitian	48
4. Prosedur Penelitian	50
5. Data hasil penelitian	52



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit jantung koroner (PJK) merupakan salah satu jenis penyakit kardiovaskuler yang menjadi penyebab kematian terbanyak di Dunia. Secara global angka kematian PJK pada tahun 2015 adalah 20 juta jiwa dan di tahun 2030 diprediksi akan meningkat kembali dengan pencapaian angka 23, 6 juta jiwa penduduk (WHO, 2015). Di Indonesia angka kematian akibat PJK mengalami peningkatan dari 11,06% pada tahun 2011 menjadi 42,3% pada tahun 2013 (Kemenkes, 2013). Hal ini menunjukkan bahwa PJK merupakan salah satu masalah kesehatan di Indonesia.

PJK memiliki keterkaitan dengan penyakit jaringn periodontal seperti periodontitis. Periodontitis terjadi karena infeksi bakteri yang menyebabkan peradangan pada jaringan periodontal sehingga menyebabkan kerusakan progresif dan disertai dengan pembentukan poket (Ticoalu *et al.*, 2016; Newman *et al.*, 2012). Bakteri penyebab periodontitis akan menjadi *focal infection* melalui mekanisme bakterimia sehingga akan masuk ke pembuluh darah dan memicu pemebntukan plak aterosklerosis yang merupakan penyebab utama PJK (Sariningsih, 2014)

Aterosklerosis merupakan penebalan dan hilangnya elastisitas dinding arteri oleh karena respon inflamasi yang dipicu oleh kondisi hiperlipidemia (Kumar *et al.*, 2007). Pada kondisi dislipidemia terjadi penurunan kadar *high density lipoprotein* (HDL), dan peningkatan kadar kolesterol, trigliserida, serta *low density lipoprotein* (LDL) (Anthony *et al.*, 2012). Peningkatan kadar kolesterol, trigliserida, dan LDL disebut sebagai hiperlipidemia. Beberapa penelitian *in-vivo* menunjukkan pemberian diet tinggi lemak dapat meningkatkan kadar kolesterol, LDL, dan trigliserid serta menurunkan kadar HDL secara bermakna pada tikus wistar (Harsa, 2017). Terdapat beberapa jenis dislipidemia berdasarkan klasifikasi lipoprotein salah satunya dislipidemia aterogenik. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kiran (2010), dislipidemia aterogenik merupakan jenis dislipidemia yang paling berbahaya. Pada dislipidemia

aterogenik akan terjadi akumulasi dari LDL yang menyebabkan disfungsi endotel. LDL merupakan salah satu jenis dari lipoprotein yang paling banyak mengangkut kolesterol di dalam tubuh. LDL bersifat aterogenik karena memiliki kemampuan mudah melekat pada dinding tunika intima pembuluh darah (Sanhia *et al.*, 2015). Hal ini menyebabkan akumulasi LDL pada dinding pembuluh darah dan memicu stres oksidatif.

Stres oksidatif akan menurunkan bioavailabilitas *Nitric Oxide* (NO) dan meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Kondisi ini menyebabkan endotel mengalami disfungsi dan permeabilitasnya meningkat sehingga terjadi penetrasi LDL yang akan terakumulasi pada tunika intima dan mengalami proses oksidasi (ox-LDL). LDL yang teroksidasi akan direspon sebagai benda asing sehingga menginduksi sel endotel untuk mensekresikan sitokin pro-inflamasi (TNF- α dan IL-1 β) secara lokal. Sitokin tersebut akan menginduksi migrasi monosit ke intima menjadi makrofag. Selanjutnya, makrofag akan melakukan proses fagositosis ox-LDL sehingga membentuk *foam cell*. Akumulasi *foam cell* akan membentuk *fibrofatty lesion* dan mengalami maturasi sehingga terbentuk plak aterosklerosis matur (*fibrous cap*). *Fibrous cap* terdiri dari dua komponen utama yaitu inti yang kaya lipid dan matriks ekstraselular yang mengandung kolagen serta protein (Bentzon *et al.*, 2014).

Proses inflamasi yang berjalan terus menerus menyebabkan makrofag dan sel endotel melepas enzim *metalloproteinase* (MMPs). Enzim ini berfungsi untuk mendegradasi matrik ekstraselular yang merupakan salah satu komponen *fibrous cap* (Fonseca *et al.*, 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Yabluchanskiy *et al.* (2013), menunjukkan terjadi peningkatan ekspresi *matrix metalloproteinase-9* (MMP-9) pada tepi dan inti (*core*) *fibrous cap*. MMP-9 berperan dalam mendegradasi kolagen dan elastin, stimulasi respon imun pada awal patogenesis dan progresi penyakit, aktivasi sitokin inflamasi dan kemokin. Peningkatan MMP-9 akan menyebabkan komponen matriks ekstraselular (kolagen) pada *fibrous cap* mengalami penipisan, sehingga menyebabkan *fibrous cap* menjadi tidak stabil dan ruptur (Newby, 2015). Hal ini dapat menimbulkan berbagai komplikasi seperti

PJK jika ruptur terjadi pada arteri koroner sehingga dibutuhkan suatu bahan antiinflamasi dan antioksidan salah satunya berasal dari kopi.

Kopi merupakan salah satu komoditi perkebunan yang terdapat di Indonesia. Terdapat beberapa jenis kopi di Indonesia salah satunya kopi robusta (*Coffea canephora*). Kopi banyak dimanfaatkan utamanya sebagai minuman penyegar dalam bentuk seduhan. Tingkat konsumsi kopi masyarakat Indonesia mengalami peningkatan dari 0,80 kg/kapita/tahun pada tahun 2010 menjadi 1,15 kg/kapita/tahun pada tahun 2016 (AEKI, 2017). Berdasarkan penelitian epidemiologi menunjukkan konsumsi kopi berkorelasi positif terhadap peningkatan tekanan darah yang akan berdampak pada peningkatan resiko PJK (Bistara & Kartini, 2018). Disisi lain, kopi mengandung senyawa fitofarmaka yang berpotensi sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Kopi robusta memiliki kandungan senyawa fitofarmaka lebih tinggi dibandingkan jenis kopi lainnya (Farah, 2012). Berbagai penelitian menunjukkan komponen bioaktif pada kopi robusta dapat digunakan sebagai bahan anti-bakteri, anti-oksidan, dan anti-inflamasi yang poten. Kopi robusta mengandung berbagai senyawa alkaloid dan polifenol. Alkaloid yang ditemukan pada kopi robusta berupa kafein memiliki efek anti-inflamasi (Buscemi *et al.*, 2014). Kafein juga berperan dalam meningkatkan migrasi sel endotel dan re-endotelisasi, melalui protein AMP kinase. Mekanisme ini menunjukkan peran kafein dalam perbaikan endotel (Spyridopoulo *et al.*, 2008). Polifenol yang ditemukan pada kopi terdiri dari *chlorogenic acid* (CGAs), *ferulic acid*, dan *caffeic acid* (Hall *et al.*, 2015; Buscemi *et al.*, 2014). Kopi robusta mengandung CGAs sebesar 90% lebih banyak dibandingkan jenis kopi lain (Shibata *et al.*, 2010). Senyawa CGAs yang diekstrak dari tanaman semak api (*Euonymus alatus*) memainkan peranan sebagai anti-tumor dan inhibitor MMP-9 (Buscemi *et al.*, 2014). Penelitian lainnya, menunjukkan senyawa *dihydrocaffeic acid* (DHCA) sebagai inhibitor MMP-2 dan MMP-9 pada model tikus serebral iskemik (Lee *et al.*, 2015).

Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti bertujuan untuk mengetahui efek pemberian kopi robusta terhadap ekspresi MMP-9 pada model tikus yang diinduksi diet tinggi lemak. Penelitian ini menggunakan kopi sebagai upaya untuk

mencegah terjadinya penyakit jantung koroner. Kopi yang digunakan dalam penelitian ini berupa seduhan. Hal ini dipilih karena untuk membuktikan bahwa mengonsumsi kopi dalam bentuk seduhan dapat bermanfaat bagi kesehatan khususnya dalam pencegahan penyakit jantung koroner.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang tersebut, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana efek pemberian kopi robusta terhadap ekspresi *matrix metaloproteinase-9* (MMP-9) pada tikus wistar jantan yang diinduksi diet tinggi lemak

1.3 Tujuan

Penelitian ini memiliki tujuan, yaitu untuk mengetahui efektivitas pemberian kopi robusta sebagai inhibitor MMP-9 dengan indikator ekspresi MMP-9 pada arteri koroner.

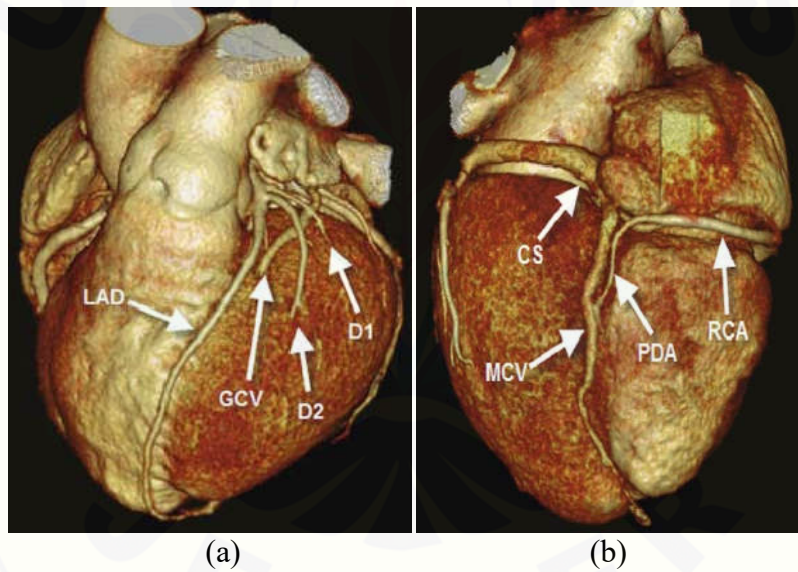
1.4 Manfaat

1. Menambah informasi ilmiah dalam bidang farmakologi mengenai efektivitas kopi sebagai inhibitor MMP-9 sehingga diharapkan ada pengembangan senyawa fitofarmaka sebagai modalitas terapi aterosklerosis.
2. Hasil penelitian ini dapat menjadi landasan ilmiah dalam menggunakan kopi sebagai bahan herbal untuk modalitas terapi aterosklerosis.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Arteri Koroner

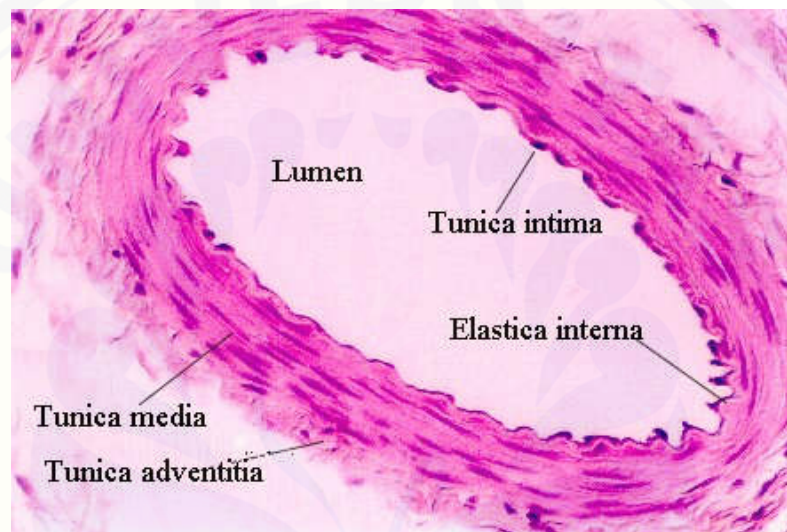
Arteri koroner merupakan arteri yang mensuplai darah ke jantung (Gambar 2.1). Arteri koroner kanan berasal dari sinus aorta anterior, melewati diantara trunkus pulmonalis dan apendiks atrium kanan, turun ke lekukan A-V kanan sampai mencapai lekukan interventrikuler posterior. Arteri berlanjut sebagai arteri posterior desenden/ *posterior descendens artery* (PDA) disebut dominan kanan. Arteri koroner kiri berasal dari sinus aorta posterior kiri dan terbagi menjadi arteri anterior desenden kiri/ *left anterior descenden* (LAD) interventrikuler dan sirkumfleksi. LAD turun di anterior dan inferior ke apeks jantung (Bastarrika *et al.*, 2008; Badshah *et al.*, 2015).



Gambar 2.1 Anatomi arteri koroner (a) *left anterior descenden* (LAD) *posterior descendens artery* (PDA) (Sumber: Bastarika,2008)

Arteri koroner tersusun atas komponen serat kolagen (tipe I, II, dan III), serta elastin, dan sel otot polos. Arteri koroner terdiri dari tiga lapisan utama yaitu tunika intima, tunika media, dan tunika adventisia. Tunika intima merupakan lapisan dalam yang terdiri atas sel endotel. Di bawah lapisan endotel terdapat jaringan ikat tipis yang disebut lamina subendotel yang tersusun atas serabut elastin. Pada batas antara tunika intima dan tunika media susunan serabut elastin

lebih jelas, sirkuler, dan tebal sehingga disebut sebagai membran elastin internal. Lapisan kedua pada arteri koroner adalah tunika media. Tunika media merupakan lapisan serabut otot polos yang mempunyai arah sirkuler. Diantara susunan serabut otot polos tersebut terdapat serabut elastin. Tunika media lebih tebal dari pada tunika intima. Lapisan terluar pada arteri koroner adalah tunika adventisia yang tersusun atas jaringan ikat fibroelastik yang lebih tipis dari tunika media (Eroschenko, 2008). Gambaran arteri koroner secara histologi terlihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Penampang histologi arteri koroner (Sumber: Child, 2014)

2.2. Aterosklerosis

2.2.1. Definisi

Aterosklerosis merupakan penebalan dan hilangnya elastisitas dinding arteri yang disebabkan oleh karena respon peradangan. Aterosklerosis ditandai dengan adanya lesi ateroma pada tunika intima pembuluh darah. Munculnya ateroma akan menimbulkan berbagai komplikasi seperti penyakit jantung koroner (PJK) dan *Cerebrovaskuler Accident* (CVA). PJK merupakan salah satu kelainan pada sistem kardiovaskuler yang menjadi penyebab kematian terbanyak di dunia. Gejala aterosklerosis bersifat simptomatik dan sering terjadi pada arteri koroner (Kumar *et al.*, 2007).

2.2.2. Faktor Risiko

Faktor risiko aterosklerosis secara umum terdiri dari:

1. Umur

Aterosklerosis merupakan penyakit yang mengikuti penambahan umur. *Fatty streak* muncul di aorta pada akhir dekade awal umur seseorang dan terdapat progresi pengerasan dari aterosklerosis pada sebagian besar arteri dengan bertambahnya umur (Kumar *et al.*, 2007). Risiko aterosklerosis meningkat setelah usia 45 pada pria dan setelah usia 55 tahun pada wanita. Perempuan dengan umur 65 tahun atau lebih tua memiliki risiko penyakit kardiovaskular yang sama dengan laki-laki dari usia yang sama (NHLBI, 2015).

2. Jenis Kelamin

Penyakit aterosklerosis secara umum sedikit terjadi pada perempuan, namun perbedaan tersebut menjadi sedikit menonjol pada dekade akhir terutama masa menopause. Hal ini dimungkinkan karena hormon estrogen bersifat sebagai pelindung. Terdapat beberapa teori yang menerangkan perbedaan metabolisme lemak pada laki-laki dan perempuan seperti tingginya kadar kolesterol HDL dan besarnya aktifitas lipoprotein lipase pada perempuan (Spence *et al.*, 2012).

3. Dislipidemia

Dislipidemia adalah suatu kelainan metabolisme lipid yang ditandai oleh adanya suatu kenaikan maupun penurunan fraksi lipid dalam plasma. Kelainan fraksi lipid yang utama adalah kenaikan kadar kolesterol total, trigliserid, kolesterol LDL, dan penurunan kadar kolesterol HDL. Dislipidemia dapat diklasifikasikan berdasarkan lipoproteinya yaitu kilomikron, *very low density lipoprotein* (VLDL), *intermediate density lipoprotein* (IDL), *low density lipoprotein* (LDL) atau dislipidemia aterogenik, dan *high density lipoprotein* (HDL) (Hendromartono *et al.*, 2007). Klasifikasi dislipidemia yang lain dapat berdasarkan atas primer yang tidak jelas suatu etiologinya dan sekunder yang memiliki penyakit dasar seperti pada sindroma nefrotik, diabetes melitus, hipotiroidisme (Hasan, 2009; Adi, 2009).

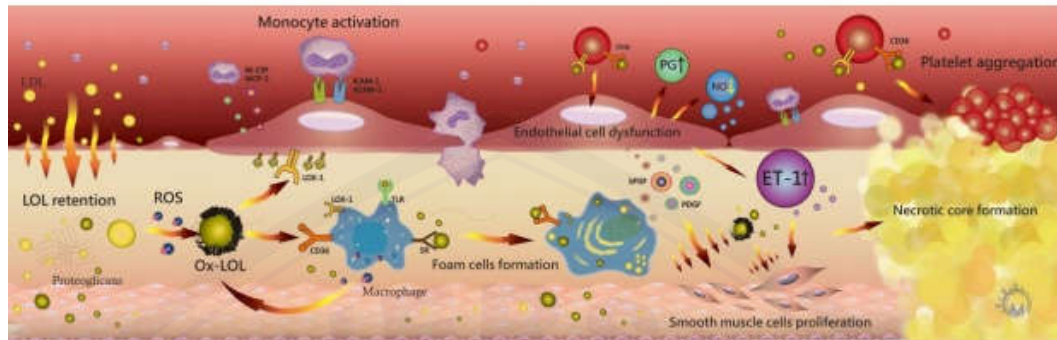
2.2.3. Patogenesis

Low-density lipoprotein (LDL) merupakan salah satu faktor penyebab utama terjadinya aterosklerosis. Peningkatan serum LDL dan konsentrasi trigliserid bertanggung jawab pada pembentukan lesi aterosklerosis (Wu *et al.*, 2017). Peran metabolisme lipid dan modifikasi LDL penting pada perkembangan aterosklerosis. Metabolisme lipid terjadi melalui jalur *exogenous* dan *endogenous* (Nguyen *et al.*, 2008). Aktifitas pada jalur tersebut menyebabkan terjadinya retensi LDL pada dinding pembuluh darah dan akan memicu stres oksidatif yang merupakan tahap awal pada patogenesis aterosklerosis (Wisniewska *et al.*, 2017).

Stres oksidatif akan menurunkan bioavailabilitas *Nitric Oxide* (NO) dan meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Kondisi ini menyebabkan endotel mengalami disfungsi dan permeabilitasnya meningkat sehingga terjadi penetrasi LDL yang akan terakumulasi pada tunika intima dan mengalami proses oksidasi (ox-LDL) yang akan menginduksi sitokin pro-inflamasi. Oksidasi LDL akan memicu proses inflamasi yang diawali dengan peningkatan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) dan *vascular-cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) sehingga meningkatkan adhesi monosit pada endotel tunika intima. Secara bersamaan, ox-LDL menstimulasi sel endotel dan sel otot polos untuk mensekresi *monocyte recruitment protein-1* (MCP-1) dan *monocyte colony stimulating factor* (M-CSF). Kedua faktor tersebut akan menginduksi monosit berdiferensiasi menjadi makrofag dan mengekspresikan berbagai reseptor salah satunya *scavenger receptors* (SRs). Interaksi antara ox-LDL dengan reseptornya akan mengaktifasi makrofag untuk memfagositosis ox-LDL sehingga membentuk *foam cell* (Wu *et al.*, 2017). Secara bersamaan, sel-sel otot polos berproliferasi dan membentuk *fibrofatty lesion* yang akan mengalami maturasi menjadi *fibrous cap* (Bentzon *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2011). *Fibrous cap* terdiri dari dua komponen utama yaitu inti yang kaya lipid dan matriks ekstraselular yang mengandung kolagen serta protein (Bentzon *et al.*, 2014).

Proses inflamasi yang berjalan terus menerus menyebabkan makrofag dan sel endotel melepas enzim *metalloproteinase* (MMPs) yang akan mendegradasi komponen matriks ekstraselular pada *fibrous cap* sehingga menyebabkan ruptur

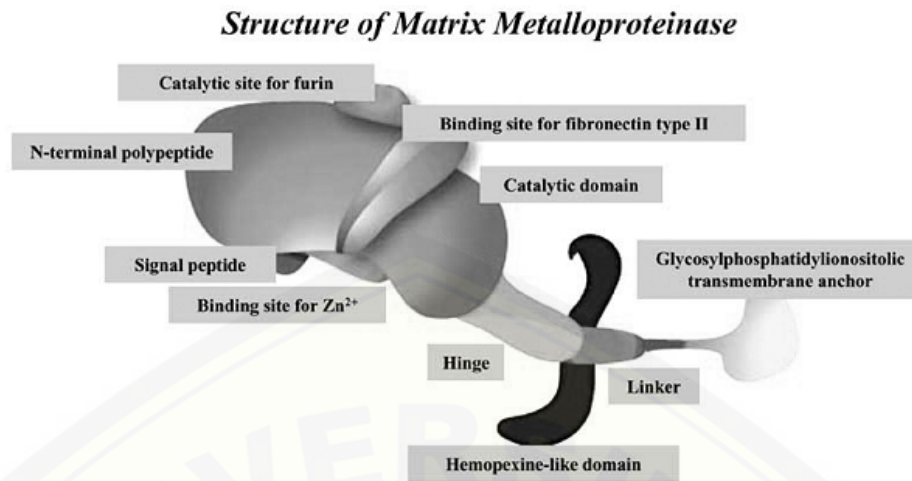
dan menimbulkan berbagai komplikasi seperti penyakit jantung koroner (PJK). Mekanisme patogenesis aterosklerosis dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Mekanisme pembentukan ateroma (plak aterosklerosis)
(Sumber : Wu *et al.*, 2017)

2.3. *Matrix Metalloproteinase - 9 (MMP-9)*

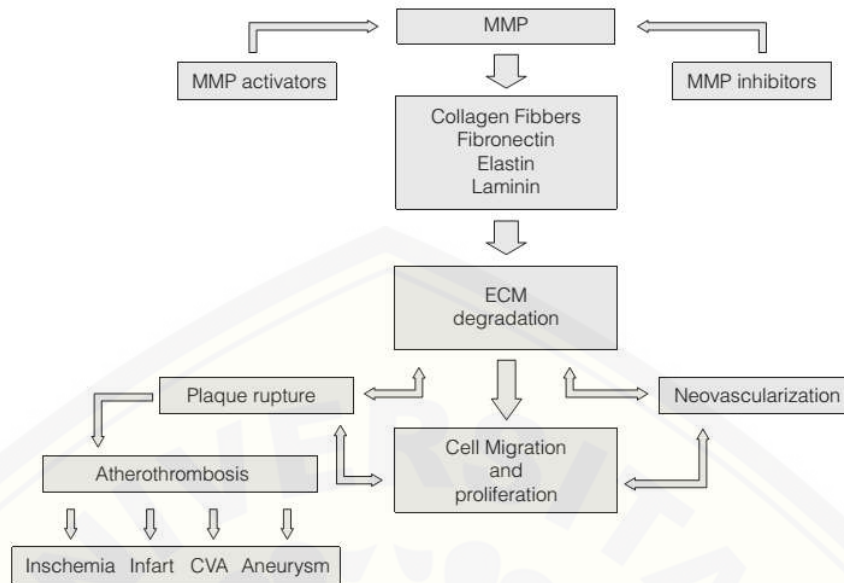
Matrix metalloproteinase (MMPs) atau *matrixins* merupakan kelompok besar dari *zinc-dependent protease* yang berperan dalam degradasi jaringan ikat seperti kolagen, elastin, gelatin, dan kasein. MMPs ditemukan pada invertebrata, vertebrata, dan tumbuhan. Struktur kimia MMPs terbagi menjadi tiga bagian utama yaitu *N-terminal propeptide*, *catalytic*, dan *c-terminal* (Gambar 2.4). *N-terminal propeptide* mengandung kurang lebih 80 asam amino. Asam amino fungsional yang paling penting dalam propeptida N-terminal adalah sistein, yang berinteraksi dengan ion seng katalitik melalui gugus tiol dan merupakan pertukaran sistein. Bagian *C-terminal* atau *hemopexin-like domain* merupakan struktur yang sama dengan protein kelompok *hemopexin*. Bagian ini memiliki permukaan yang paling besar untuk interaksi protein-protein seperti reseptor membran. Domain *catalytic* mengandung lima β -sheets, tiga α -helix, dan *connecting loops*. Terdapat 170 asam amino dan mengandung *zinc-binding motif* yang berhubungan dengan metionin. MMPs merupakan protein homolog yang dapat diklasifikasikan menjadi enam kelompok yaitu, kolagenase, *stromelysins*, *matrilysins*, *gelatinase*, *membran-associated MMPs*, dan MMPs lainnya (Zitka *et al.*, 2010).



Gambar 2.4 Struktur kimia MMPs (Sumber: Zitka *et al.*, 2010)

MMPs memiliki peran penting dalam perkembangan proses inflamasi. Peranan MMPs dimulai setelah inisiasi proses inflamasi untuk pembentukan plak aterosklerotik, ketika sel inflamasi (khususnya monosit dan sel busa) sudah berada dalam intima. Sel-sel ini mulai melepaskan sitokin dan ROS yang mengaktifkan MMPs, termasuk kolagenase yang mempengaruhi integritas plak. Ekspresi MMP dan aktivasi dalam plak aterosklerotik menyebabkan ketidakstabilan plak dan agregasi trombosit. Peningkatan konsentrasi plasma C-reaktif protein (CRP) merupakan penentu ketidakstabilan plak aterosklerotik dan berkorelasi dengan peningkatan kolagenase lokal (MMP-8 dan MMP-9). MMP-9 memainkan peran penting untuk degradasi matriks pada plak aterosklerotik dan ekspresinya lebih banyak pada plak yang tidak stabil dibandingkan dengan yang stabil (Gambar 2.5) (Fonseca *et al.*, 2014).

MMP-9 menginduksi respon inflamasi pada *smooth muscle cell* (SMCs) dan makrofag tikus (Newby, 2015). MMP-9 meningkat pada plak aterosklerotik pasien aterosklerosis (Newby, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Yabluchanskiy *et al* (2013), menunjukkan sel-sel inflamasi pada tepi dan inti (*core*) *fibrous cap* akan melepaskan MMP, pada area ini terjadi peningkatan ekspresi MMP-9. MMP-9 berperan dalam degradasi kolagen dan elastin, stimulasi respon imun pada awal patogenesis dan progresi penyakit, aktivasi sitokin pro-inflamasi (Fonseca *et al.*, 2014).



Gambar 2.5 Peran MMPs dalam ruptur ateroma (Sumber: Fonseca *et al.*, 2014)

2.4. Kopi

Kopi merupakan komoditas tropis utama yang diperdagangkan di seluruh dunia dengan kontribusi setengah dari total ekspor komoditas tropis. Popularitas dan daya tarik dunia terhadap kopi, utamanya dikarenakan rasanya yang unik serta didukung oleh faktor sejarah, tradisi, sosial dan kepentingan ekonomi (Ayelign *et al.*, 2013). Selain itu, kopi adalah salah satu sumber alami kafein zat yang memiliki efek antioksidan, antiinflamasi, antimikroba dan dapat meningkatkan kewaspadaan serta mengurangi kelelahan (Nawrot *et al.*, 2013). Kopi merupakan salah satu tanaman yang termasuk dalam familia *Rubiceae* yang banyak dibudidayakan di negara tropis. Jenis kopi yang pertama kali dibudidayakan di Indonesia adalah kopi arabika (Prastowo *et al.*, 2010). Pada saat ini kopi robusta banyak dibudidayakan di daerah dataran tinggi di Bali, Sulawesi, Sumatera Utara, dan beberapa tempat di Jawa Timur salah satunya kabupaten Jember. Sebagai salah satu famili *Rubiceae*, jumlah spesies kopi mencapai lebih dari 70 spesies, namun terdapat 2 (dua) spesies utama yang paling banyak diperdagangkan yaitu *Coffea arabica* L (64%) dan *C. canephora* (35%) (Pohlan & Janssens, 2010). Klasifikasi kopi menurut Charrier (2014), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i> (Tanaman)
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i> (Tanaman berpembuluh)
Superdivision	: <i>Spermatophyta</i> (Tanaman berbiji)
Division	: <i>Magnoliophyta</i> (Tanaman berbunga)
Class	: <i>Magnoliopsida</i> (Dikotiledon)
Subclass	: <i>Asteridae</i>
Ordo	: <i>Rubiales</i>
Family	: <i>Rubiaceae</i>
Genus	: <i>Coffea</i> L

Kopi secara luas dikonsumsi oleh masyarakat sebagai bahan baku minuman. Konsumsi kopi dapat menurunkan resiko penyakit yang berhubungan dengan stres oksidatif seperti kanker, kardiovaskular, penuaan dan penyakit neurodegeneratif (Ong *et al.*, 2013). Hal ini disebabkan terdapat kandungan senyawa fitofarmaka pada kopi seperti kafein, *chlorogenic acid* (CGAs), *dihydrocaffeic acid* (DHCA), dan *ferulic acid* (Huang *et al.*, 2004; Ong *et al.*, 2010; Farah, 2012). Kopi juga mengandung berbagai mineral seperti Ca, K, Fe, P, Ni, Mg, dan Cr (Oliveira *et al.*, 2012). Kandungan senyawa fitofarmaka pada setiap jenis kopi berbeda. Kandungan kafein dan CGAs pada *green coffea* robusta dua kali lipat dari pada *green coffea* arabika sedangkan pada *roasted coffea* robusta tiga kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan *roasted coffea* pada arabika (Tabel 2.1). Perbedaan kandungan tersebut disebabkan oleh beberapa faktor seperti faktor herediter kopi dan pemanasan atau penyangraian biji kopi hijau atau disebut juga *roasted coffee*. Selama proses pemanggangan atau penyangraian kopi terjadi perubahan secara fisik ataupun kimia, begitupun dengan kandungan didalam biji kopi. Proses penyangraian pada suhu diatas 180-200°C dapat menyebabkan perubahan besar dalam komposisi kimia dan bioaktivitas kopi (Farah, 2012).

Tabel 2.1 Perbedaan kandungan kimia pada biji kopi Arabika dan Robusta

Komponen	Kopi Arabika (g/100g)		Kopi Robusta (g/100g)	
	Green Coffea	Roasted Coffea	Green Coffea	Roasted Coffea
Sukrosa	6,0 – 9,0	4,2	0,9 – 4,0	1,6
Gula Pereduksi	0,1	0,3	0,4	0,3
Polisakarida	34,0 – 44,0	31,0 – 33,0	48,0 – 55,0	37,0
Lignin	3,0	3,0	3,0	3,0
Pectin	2,0	2,0	2,0	2,0
Protein	10,0 – 11,0	7,5 – 10,0	10,0 – 11,0	7,5 – 10,0
Asam Amino Bebas	0,5	-	0,8 – 1,0	-
Kafein	0,9 – 1,3	1,1 – 1,3	1,5 – 2,5	2,4 – 2,5
Trigonelline	0,6 – 2,0	0,2 – 1,2	0,6 – 0,7	0,3 – 0,7
Asam Nikotik	-	0,016 – 0,026	-	0,014 – 0,025
Minyak Kopi	15,0 – 17,0	17,0	7,0 – 10,0	11,0
Diterpen	0,5 – 1,2	0,9	0,2 – 0,8	0,2
Mineral	3,0 – 4,2	4,5	4,4 – 4,5	47,0
Asal Klorogenat	4,1 – 7,9	1,9 – 2,5	6,1 – 11,3	3,3 – 3,8
Asam Alifatik	1,0	1,6	1,0	1,6
Asma Quinic	0,4	0,8	0,4	1,0
Melanoidins	-	25,0	-	25,0

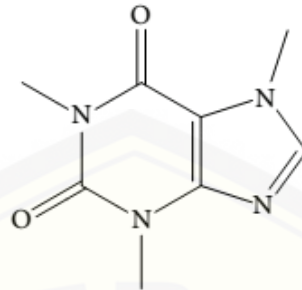
Sumber : Farah, (2012)

Komponen aktif pada kopi pada umumnya dibagi menjadi dua kelompok besar yaitu polifenol dan alkaloid yang terdiri dari:

1. Kafein ($C_8H_{10}N_4O_2$)

Kafein merupakan golongan alkaloid yang secara kimia dikenal sebagai *1,3,7-trimethylxanthine* atau *1,3,7-trimethyl-1H-purine-2, 6(3H,7H)-dione*. Struktur kimia kafein tersusun atas dua cincin yang menyatu (Gambar 2.6) yang berhubungan dengan purin (Amaresh *et al.*, 2011). Konsumsi kafein menunjukkan beberapa efek positif pada berbagai penelitian manusia dan hewan. Kafein memiliki bioaktivitas sebagai antiinflamasi melalui mekanisme perbaikan sel endotel sehingga sel endotel tidak mensekresikan sitokin pro-inflmasi. Selain itu, kafein juga dapat menghambat enzim *cyclooxygenase-2* (COX-2) lebih baik dari pada aspirin (Chen *et al.*, 2012). Penelitian lainnya menunjukkan pada model tikus, kafein kasar dapat menurunkan akumulasi dari β -amyloid peptides pada

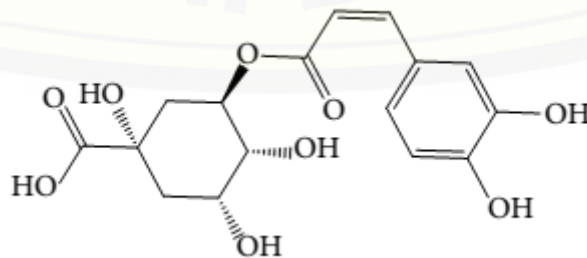
parkinson's diseases dan memiliki aktifitas sebagai antioksidan hidrofilik serta lipofilik (Chu *et al.*, 2012).



Gambar 2.6 Struktur kimia kafein (Sumber: Nuhu, 2014)

2. *Chlorogenic Acid* (CGAs)

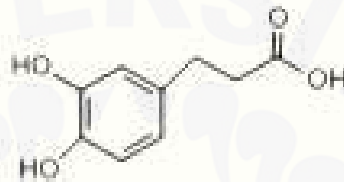
Chlorogenic acid (CGAs) merupakan suatu senyawa polifenol yang sering ditemukan pada berbagai tumbuhan (Upadhyay & Rao, 2013). CGAs memiliki nama kimia sebagai *5-caffeoylquinic acid* (5-CQA) (Narita, 2013). Struktur kimia dari CGAs terlihat pada gambar 2.7. CGAs berperan dalam memberikan rasa pada kopi. Terdapat beberapa efek positif yang dikaitkan dengan CGAs, seperti efek hipolipidemia yang sudah dibuktikan pada penelitian laboratoris menggunakan tikus (Ong *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2010). CGAs juga berperan sebagai antioksidan yang ditunjukkan pada proteksi terhadap kerusakan makromolekul seperti DNA, lipid, dan protein (Sato *et al.*, 2011). Penelitian lain menunjukkan efek CGAs sebagai agen neuroprotektif pada tikus (Kwon *et al.*, 2010). Dalam hal antimikroorganisme, CGAs dapat menghambat virus hepatitis-B dan H1N1, bakteri, dan jamur dengan *minimum inhibitory concentrations* (MIC) sebesar 20 – 80 $\mu\text{g/ml}$ (Wang *et al.*, 2009; Urushisaki *et al.*, 2011).



Gambar 2.7 Struktur kimia *Chlorogenic acid* (CGAs) (Sumber: Nuhu, 2014)

3. *Dihydrocaffeic acid* (DHCA)

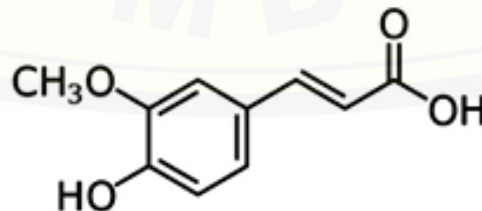
Dihydrocaffeic acid merupakan derivat atau turunan dari CGAs yang memiliki efek antioksidan poten. Struktur kimia DHCA terlihat pada gambar 2.8. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Lee *et al.*, (2015) menunjukkan DHCA dapat menghambat produksi MMP-2 dan MMP-9 pada model tikus serebral iskemik. Mekanisme penghambatan tersebut terjadi karena efek antiinflamasi DHCA sehingga terjadi penurunan sekresi sitokin pro-inflamasi yang menyebabkan sekresi MMP-9 dihambat.



Gambar 2.8 Struktur kimia *dihydrocaffeic acid* (DHCA)
(Sumber: Huang *et al.*, 2004)

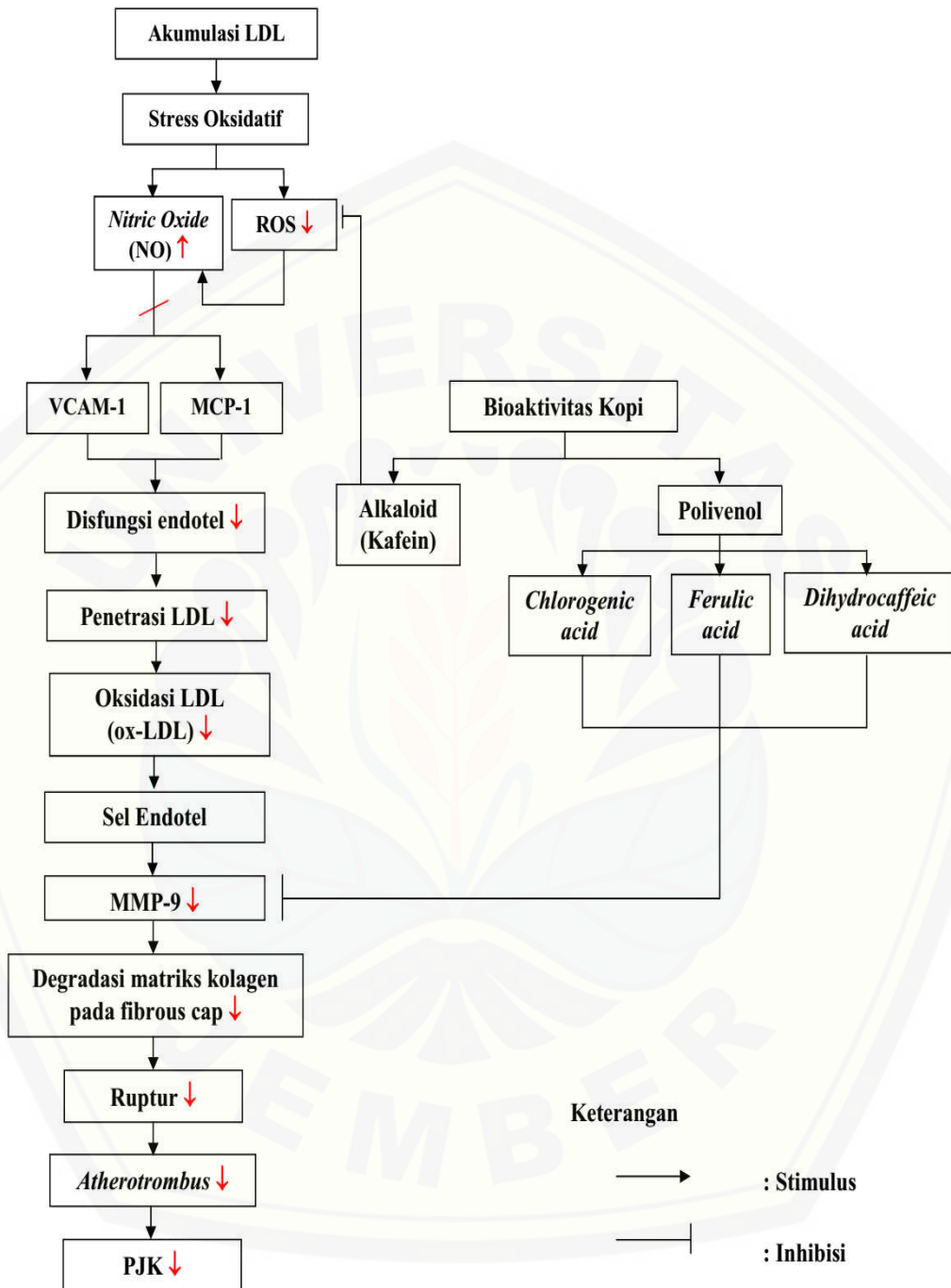
4. *Ferulic Acid*

Ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) merupakan salah satu senyawa yang melimpah di alam dan merupakan senyawa penting serta merupakan komponen dinding sel tumbuhan (Gambar 2.9) (Paiva *et al.*, 2013). *Ferulic acid* memiliki bioaktivitas sebagai antiinflamasi yang poten dengan mekanisme penurunan kadar mediator inflamasi melalui inhibisi *Cyclooxygenase* (COX) dan *nuclear factor kappa beta* (NFκβ) (Itagaki *et al.*, 2009; Doss *et al.*, 2016). Selain itu, *ferulic acid* juga menurunkan kadar IL-6 dan IL-8 (Lampiasi *et al.*, 2016).



Gambar 2.9 Struktur kimia *ferulic acid*
(Sumber: Paiva *et al.*, 2013)

2.5. Kerangka Konseptual



Gambar 2.10 Kerangka konseptual penelitian

Keterangan Kerangka Konsep:

Akumulasi LDL terjadi jika LDL yang memiliki sifat aterogenik melekat dan terakumulasi pada tunika intima serta mengalami oksidasi. Hal itu akan meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan menurunkan bioavailabilitas *Nitric Oxide* (NO). Kondisi ini akan menstimulasi monosit untuk mengeluarkan *Vascular Cellular Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) dan *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) yang merupakan molekul adhesi pada dinding sel endotel. Peningkatan VCAM-1 dan ICAM-1 akan menyebabkan disfungsi endotel dan secara bersamaan terjadi peningkatan penetrasi LDL pada tunika intima. LDL yang terakumulasi akan teroksidasi menjadi ox-LDL sehingga direspon oleh tubuh sebagai benda asing dan akan difagositosis oleh makrofag sehingga terbentuk plak aterosklerosis pada dinding pembuluh darah. Inflamasi yang berjalan terus menerus akan menstimulasi sel endotel untuk mensekresikan MMP-9 yang akan mendegradasi kolagen pada *fibrous cap* plak aterosklerosis dan menyebabkan ruptur. Pemberian kopi yang memiliki senyawa fitofarmaka berupa *chlorogenic acid*, *ferulic acid*, dan *dihydrocaffeic acid* diharapkan dapat menghambat MMP-9 melalui aktivitas antioksidan sehingga degradasi matriks kolagen pada *fibrous cap* dapat dicegah dan tidak akan terjadi ruptur pada plak aterosklerosis. Selain itu, kafein yang memiliki antioksidan berperan dalam menghambat pembentukan radikal bebas (ROS) sehingga dapat meningkatkan bioavailabilitas NO dan diharapkan dapat memperbaiki kondisi endotel yang mengalami disfungsi.

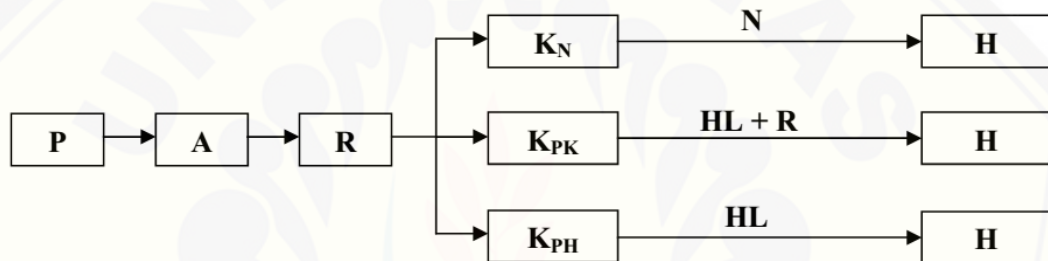
2.6. Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah terjadi penurunan ekspresi MMP-9 pada sel endotel tunika intima arteri koroner pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak setelah pemberian seduhan kopi robusta.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *true experimental*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *randomized post test only control group design* yaitu dengan pemilihan kelompok dilakukan secara acak dan terdapat 3 kelompok. Setiap kelompok dilakukan pengamatan dan pengukuran setelah perlakuan. Hasil penelitian dibandingkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (Nasir *et al.*, 2011). Secara sistematis rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

Keterangan :

- P : Populasi
- A : Adaptasi hewan coba
- R : Randomisasi
- KN : Kelompok kontrol
- KPK : Kelompok perlakuan kopi
- KPH : Kelompok hiperlipidemia
- HL : Diet tinggi lemak, campuran lemak babi dan kuning telur bebek
- R : Kopi robusta 10 gram
- H : Ekspresi MMP-9 pada sel endotel
- N : Diet nstandar

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan bulan Agustus – Oktober 2018

3.2.2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan diberbagai laboratorium yaitu:

1. Laboratorium Fisiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk perlakuan terhadap hewan coba,
2. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk *processing* jaringan dan pembuatan preparat histologi,
3. Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk pengecatan (*immunostaining*) dan pengamatan.

3.3. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar.

Terdapat kriteria inklusi yang bertujuan untuk menentukan dapat tidaknya sampel tersebut digunakan. Kriteria inklusi sampel penelitian meliputi:

1. tikus wistar jantan,
2. tikus dalam keadaan sehat (gerak aktif),
3. usia 2 – 3 bulan dengan berat 180 – 200 gram.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini diambil dengan teknik random sederhana (*simple random sampling*) dari populasi tikus yang kemudian akan dibagi menjadi 3 kelompok. Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan rumus sebagai berikut (Daniel, 2005).

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

Keterangan :

n : besar sampel tiap kelompok

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

σ : standar deviasi sampel

d : kesalahan yang masih dapat di toleransi

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

$$\frac{n \geq (1,96)^2}{d^2} \times \sigma^2$$
$$n \geq 3,84$$
$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, besar sampel untuk masing-masing kelompok pada penelitian ini minimal 4 ekor. Jadi sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 12 ekor tikus yang terbagi menjadi 3 kelompok dengan jumlah sama besar.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Bebas

1. Diet tinggi lemak yaitu campuran lemak babi dan kuning telur bebek
2. Seduhan kopi robusta

3.4.2. Variabel Terikat

Ekspresi *matrix* MMP-9 pada sel endotel arteri koroner.

3.4.3. Variabel Terkendali

1. Kriteria Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Rattus norvegicus strain* Wistar dengan berat badan 180 – 200 gram, berumur 2 – 3 bulan, dan kondisi umum baik.

2. Pakan dan Minum Tikus

Semua kelompok diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*. Kemudian ditambah dengan pemberian pakan tinggi lemak pada kelompok hipierlipid dan kelompok perlakuan kopi.

3. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari dua tahap yaitu adaptasi selama 1 minggu dan tahap perlakuan selama 4 minggu.

4. Dosis Diet Tinggi Lemak

Dosis diet tinggi lemak yang diberikan adalah 3 gram lemak babi dan 2 gram kuning telur bebek diberikan satu kali sehari pada pagi hari secara sondase.

5. Dosis Seduhan Kopi Robusta

Dosis seduhan kopi robusta diberikan sebanyak 3,6 ml/hari diberikan satu kali sehari pada sore hari secara sondase.

3.5. Definisi Operasional

3.5.1. Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak merupakan pakan yang diberikan pada sampel penelitian untuk mendapatkan kondisi hiperlipidemia. Pada penelitian ini digunakan campuran lemak babi dan kuning telur dengan perbandingan 3 : 2.

3.5.2. Seduhan Kopi Robusta

Merupakan hasil pelarutan bubuk kopi robusta (*C. canephora*) merek Gunung Ijen produksi PTPN XII Jember dengan air mendidih. Konsumsi seduhan kopi robusta diberikan sebanyak 3,6 ml/hari satu kali sehari pada sore hari secara sondase.

3.5.3. MMP-9

Pengamatan MMP-9 dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 400x dengan melihat ekspresi MMP-9 yang berwarna coklat pada sitoplasma sel endotel prepat arteri koroner yang dilakukan *immunostaining*.

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kandang tikus, tempat makan dan minum tikus, sonde lambung, timbangan digital, *scalpel*, label identitas, pisau mikrotom, pinset, *deck glass* atau kaca penutup, *object glass* atau kaca objek, rak pengecatan, *disposable syringe*, mikroskop cahaya, dan optilab. Penelitian ini menggunakan bahan berupa pakan standart hewan coba dan air minum, kuning telur bebek, minyak babi, kopi robusta merek Gunung Ijen, irisan arteri koroner, akuades steril, hidrogen peroksida 3% (H₂O₂) atau metanol, antibodi primer anti MMP-9 (Santa Cruz), antibodi sekunder Biotinilated (Santa Cruz), kit immunohistokimia (IHC) merek Santa Cruz, Diamono Benzidin (DAB)

kromogen merek Santa Cruz, xylene , *mayer's hematoksin*, kapas, cotton roll, *phospat buffered saline* (PBS)

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. Uji Kelayakan Etik (*Ethical Clearance*)

Sebelum dilakukan penelitian, hewan coba dan prosedur penelitian dilakukan pengurusan *ethical clearance* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.7.2. Adaptasi dan Perawatan Hewan Coba

Hewan coba diadaptasikan dalam kandang selama 1 minggu. Alas kandang, tempat pakan, tempat minum, sisa pakan, dan kotoran tikus dibersihkan setiap 3 hari sekali untuk menghindari timbulnya penyakit.

3.7.3. Pembuatan Larutan Perlakuan

1. Diet Tinggi Lemak

Dosis lemak babi dan kuning telur bebek pada manusia masing-masing sebesar 150 gram/hari dan 100 gram/hari. Setelah dilakukan konversi ke tikus menjadi ($150 \times 0,018 = 2,7 \text{ gram} = 3 \text{ gram/ekor/hari}$) untuk lemak babi dan ($100 \times 0,018 = 1,8 \text{ gram} = 2 \text{ gram/ekor/hari}$) untuk kuning telur bebek. Jadi pembuatan diet tinggi lemak dilakukan dengan cara mencampurkan 3 gram lemak babi dan 2 gram kuning telur bebek atau dengan perbandingan 3 : 2 (Harsa, 2014).

2. Seduhan Kopi Robusta

Dosis kopi pada manusia yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10 gram (Asiah *et al.*, 2017). Setelah dilakukan konversi ke tikus dosis kopi menjadi $10 \text{ gram} \times 0,018 = 0,18 \text{ gram /ekor/hari}$. Bubuk kopi sebanyak 0,18 gram dilarutkan dalam 3,6 ml air mendidih (100°C) dengan rumus pelarutan sebagai berikut:

$$\frac{10 \text{ gram}}{200 \text{ ml}} = \frac{0,18 \text{ gram}}{x}$$
$$x = 3,6 \text{ ml}$$

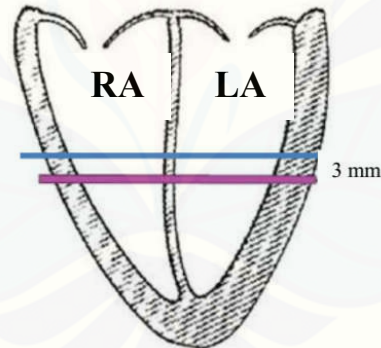
Seduhan kopi ditunggu hingga suhunya turun menjadi 37°C untuk dilakukan sondase sebanyak 3,6 ml.

3.7.4. Perlakuan pada Kelompok Hewan Coba



Hewan coba dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok hiperlipidemia, dan kelompok perlakuan kopi. Kelompok hiperlipidemia dan kelompok perlakuan kopi diberikan diet tinggi lemak sebanyak 3 gram lemak babi dan 2 gram kuning telur bebek setiap pagi hari secara sondase. Selanjutnya, kelompok perlakuan kopi diberikan seduhan kopi sebanyak 3,6 ml/hari setiap sore secara sondase.

3.7.5. Pengambilan Arteri Koroner

Setelah perlakuan selama 28 hari, pada hari ke-29 hewan coba dikorbankan dengan cara melakukan anestesi dengan eter dosis letal. Selanjutnya, dilakukan pengambilan arteri koroner dengan cara pembedahan organ jantung. Proses pengambilan bagian arteri koroner dilakukan dengan mengambil potongan longitudinal dibawah 3 mm dari perbatasan atrium dan ventrikel Gambar 3.2 (Eckman *et al.*, 2013).



Keterangan :

-  : Batas atrium dan ventrikel
-  : Pemotongan untuk pengamatan arteri koroner
- RA : *Right Atrium*
- LA : *Left Atrium*

Gambar 3.2 Prosedur Pengambilan Bagian Arteri Koroner
(Sumber: Eckman *et al.*, 2013)

3.7.6. Pemrosesan Jaringan (Arteri Koroner)

1. Pembuatan Sediaan Histologi

Tahapan pembuatan sediaan histologi arteri koroner dilakukan sesuai protokol penggunaan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yaitu:

a. Fiksasi

Proses fiksasi dilakukan dengan cara sampel dimasukkan ke dalam larutan *Phospat Buffered Saline* (PBS) selama 24 jam

b. Dehidrasi

Dehidrasi adalah proses penarikan air dari potongan organ dengan cara direndam pada larutan alkohol dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi.

Berikut tahapan dehidrasi:

- 1) Alkohol 70% selama 15 menit
- 2) Alkohol 80% selama 1 jam
- 3) Alkohol 95% selama 2 jam
- 4) Alkohol 95% selama 1 jam
- 5) Alkohol *absolute* I (100%) selama 1 jam
- 6) Alkohol *absolute* II (100%) selama 1 jam
- 7) Alkohol *absolute* III (100%) selama 1 jam

c. *Clearing*

Clearing adalah proses penjernihan potongan organ dengan menggunakan bahan penjernih. Jaringan direndam dalam larutan *xylol* sebanyak tiga kali, masing-masing 1 jam.

d. Infiltrasi (Impregnasi)

Impregnasi merupakan proses infiltrasi bahan parafin dalam jaringan pada suhu 50° C – 60° C. Jaringan diletakkan pada *cassette tissue* yang sudah diberi label sebagai identitas sampel, kemudian dimasukkan ke dalam parafin cair selama 2 jam dan diulang sebanyak tiga kali.

e. *Embedding*

Proses *embedding* merupakan penanaman jaringan ke dalam parafin cair pada alat cetak blok parafin. Tahap pertama adalah alat cetak dipersiapkan dan

diletakkan pada permukaan yang rata, parafin cair dituangkan ke dalam alat cetak blok, kemudian masukkan jaringan yang telah diimpregnasi ke dalamnya. Selanjutnya, sampel diberi identitas dan ditunggu beberapa menit sampai parafin membeku.

f. *Sectioning*

Pemotongan jaringan dilakukan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 – 6 mikron. Berikut tahapan *sectioning* jaringan :

- 1) Blok parafin diletakkan pada mikrotom.
- 2) Pisau mikrotom harus dalam keadaan bersih, kemudian memasang pisau mikrotom pada posisinya.
- 3) Mengatur ketebalan sayatan 4 – 6 mikron.
- 4) Memindahkan hasil potongan berupa pita tipis menggunakan kuas ke atas permukaan air dalam *waterbath* dengan temperatur tetap 56°C – 58°C agar sayatan jaringan dapat mengembang dengan baik.
- 5) Hasil sayatan diseleksi dan dipindahkan di atas *object glass* yang telah diolesi *poly l-lysin* serta diberi label sesuai dengan label jaringan yang dipotong.
- 6) Sediaan jaringan dibiarkan kering selama minimal 12 jam dan selanjutnya dilakukan tahap pengecatan.

2. Pengecatan (*Immunostaining*)

Teknik pengecatan Immunohistokimia yang dilakukan adalah sesuai dengan protokol standar, yaitu:

- a. Preparat direndam dalam aquades selama 10 menit
- b. Preparat dibilas dalam larutan PBS selama 5 menit
- c. Preparat diberi H₂O₂ selama 10 menit
- d. Bilas dengan larutan PBS 3 x 5 menit
- e. Preparat diberi antibody primer *anti mouse* MMP-9 1 : 200[®] Santa Cruz dan didiamkan selama satu malam dalam suhu 4°C
- f. Setelah satu malam dikeluarkan dari suhu 4°C dan ditunggu sampai mencapai suhu kamar
- g. Bilas dengan larutan PBS 3 x 5 menit

- h. Preparat diberi antibodi sekunder *anti mouse* Biotinilated [®]Santa Cruz selama 60 menit
- i. Bilas dengan larutan PBS 3 x 5 menit
- j. Preparat dilakukan pewarnaan Diamono Benzidin (DAB) dalam substrate *buffer* selama 20 menit
- k. Bilas dengan larutan PBS 3 x 5 menit
- l. Bilas dengan akuades 10 menit
- m. Preparat dilakukan pengecatan Mayer's Hematoxilin selama 45 detik
- n. Bilas dengan air 10 menit
- o. Mounting menggunakan cairan gliserin lalu ditutup dengan *cover glass*.

3.8. Pengamatan

Pengamatan ekspresi MMP-9 dengan mikroskop Olympus CX 21 dengan perbesaran 400x dengan menggunakan metode *blinding* oleh 3 orang pengamat. Pengukuran *histo score* (*H-score*) menggunakan rumus berikut:

$$Skor = (IN \times \%IN) + (IL \times \%IL) + (IS \times \%IS) + (IK \times \%IK)$$

Keterangan :

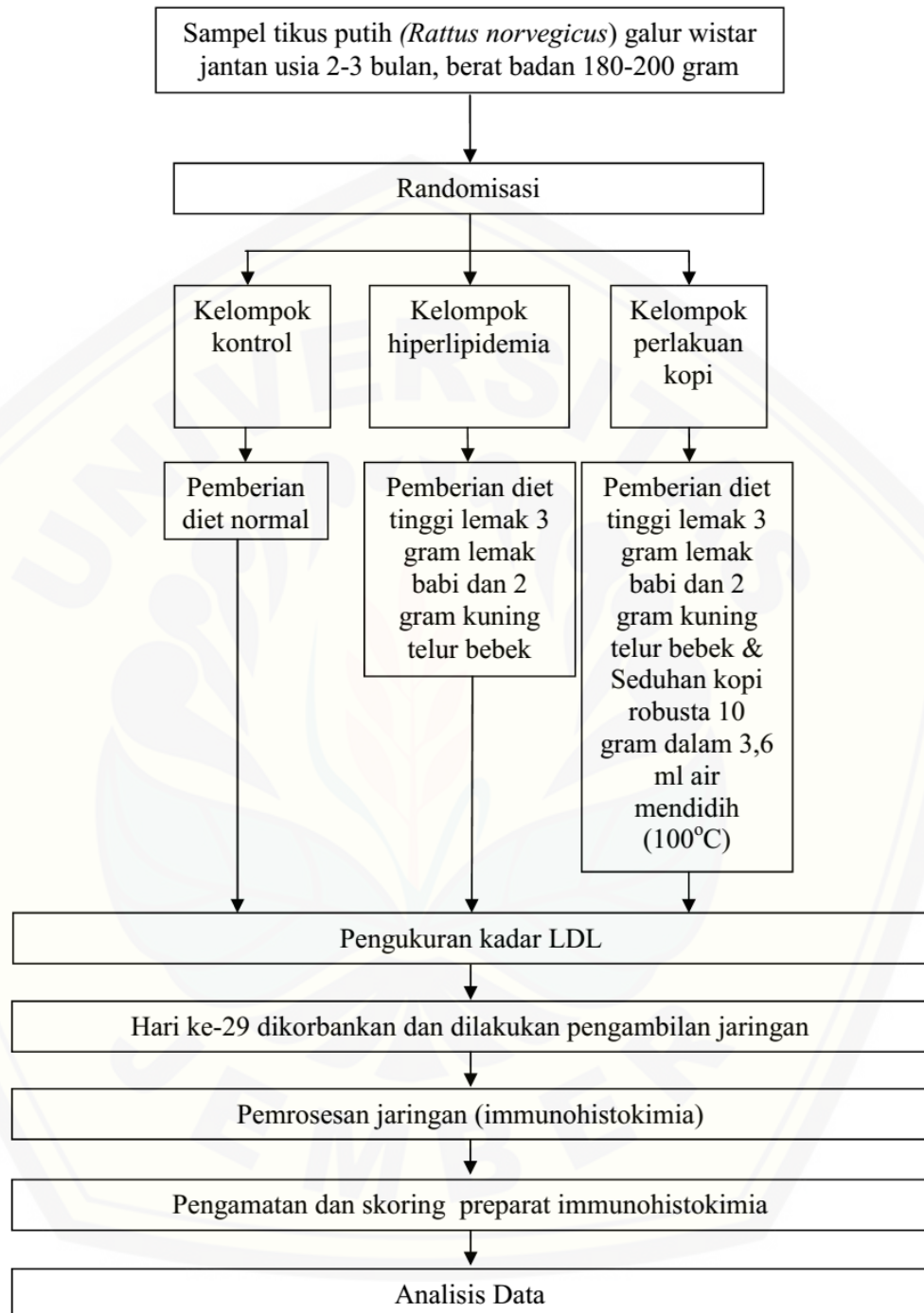
IN : Intensitas normal IL : Intensitas lemah
 IS : Intensitas sedang IK : Intensitas kuat

Persentasi (%) didapat dari jumlah sel yang mengekspresikan MMP-9 per seluruh jumlah sel tersebut dikali 100% (Stanger, 2015).

3.9. Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah uji normalitas dan uji homogenitas sehingga didapatkan data berdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$). Uji beda *One Way ANOVA* digunakan untuk melihat perbedaan ekspresi MMP-9 pada seluruh kelompok. Penelitian ini menggunakan uji lanjutan *Post Hoc* LSD untuk menilai perbedaan yang bermakna pada tiap kelompok.

3.10. Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian seduhan kopi robusta 10 gram dapat menurunkan ekspresi MMP-9 pada sel endotel arteri koroner yang diinduksi diet tinggi lemak.

5.2. Saran

Saran yang dapat diberikan berkaitan dengan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan variasi konsentrasi seduhan kopi robusta untuk mendapatkan konsentrasi efektif dalam menghambat MMP-9 yang diinduksi diet tinggi lemak.
2. Peneliti lain yang berminat dalam penelitian sejenis, disarankan untuk meneliti ekstrak kopi berupa CGAs, *ferulic acid*, dan DHCA terhadap ekspresi MMP-9 yang diinduksi diet tinggi lemak dengan metode ELISA dan immunohistokimia.
3. Berdasarkan hasil penelitian, kopi dapat dikonsumsi sebagai upaya preventif dalam mencegah pembentukan lesi aterosklerosis dan degradasi matriks kolagen pada arteri koroner sehingga PJK dapat dicegah.
4. Masyarakat disarankan mengonsumsi seduhan kopi 10 gram satu kali sehari sebagai upaya pencegahan penyakit jantung koroner.

DAFTAR PUSTAKA

- Adi, P.R. 2014. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi 6. Jakarta: Interna Publishing
- AEKI (Asosiasi Eksportir Kopi Indonesia). Tingkat konsumsi kopi masyarakat Indonesia. <http://www.aeki-aice.org/>. [Diakses pada 20 April 2018].
- Amaresh, A.N., Mullaicharam, R., El-Khider, M.A. 2011. Chemistry and pharmacology of caffeine in different types of tea leaves. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 1(2): 110–115.
- Anthony, S.F., Dennis, L.K., Longo, L., Eugene, B., Stephen, L.H., J. Jameson, L. 2012. *Harrison's Principles of Internal Medicine Volume II*. 18th Ed. United States of America: McGraw-Hill.
- Asiah, N., Septiyana, F., Saptono, U., Cempaka, L., Sari, D.A. 2017. Identifikasi cita rasa sajian tubruk kopi robusta cibulao pada berbagai suhu dan tingkat kehalusan penyeduhan. *Barometer*. 2(2): 52 – 56.
- Ayalign, A., Sabally, K. 2013. Determination of chlorogenic acids (cga) in coffee beans using HPLC. *American Journal of Research Communication*. 1(2): 78 – 91.
- Badshah, M., Qadir, M., Hasnain, J., Soames, R., Iqbal, Z. 2015. Anatomy of human coronary circulation. *J. Med. Sci.* 23(2): 62 – 65.
- Baran, K., Rodrigueaz, D., Green, D. 2013. The DNA damage response mediates apoptosis and tumor suppression. *Journal of Cell Death: Mechanism and Disease*; 2(11): 135 – 164.
- Bastarrika, A.G., Burgos, A., Agüero, P.M.A., et al. 2008. Normal anatomy, anatomical variants, and anomalies of the origin and course of the coronary arteries on multislice CT. *Radiologia*. 50(3): 197–206.
- Bentzon, J.F., Otsuka, F., Virmani, R., Falk, E. 2014. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation Research*. 114 (12): 1852 – 1866.
- Bistara, D.N., Kartini, Y. 2018. Hubungan kebiasaan mengonsumsi kopi dengan tekanan darah pada manusia dewasa. *Jurnal Kesehatan Vokasional*; 3(1): 23 – 28.
- Buscemi, S., Galvano, F., Volti, G.L., Grosso, G. 2014. Coffee components and cardiovascular risk: Beneficial and detrimental effects. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 65 (8): 1 – 12.
- Chen, Y., Brown, P.H. 2012. Bioactivities of crude caffeine: antioxidant activity, cyclooxygenase-2 inhibition, and enhanced glucose uptake. *Food Chemistry*. 131(2): 564–568.
- Child, G.V. 2014. Histology of artery. <http://microanatomy.net> . [Diakses pada 20 April 2018].

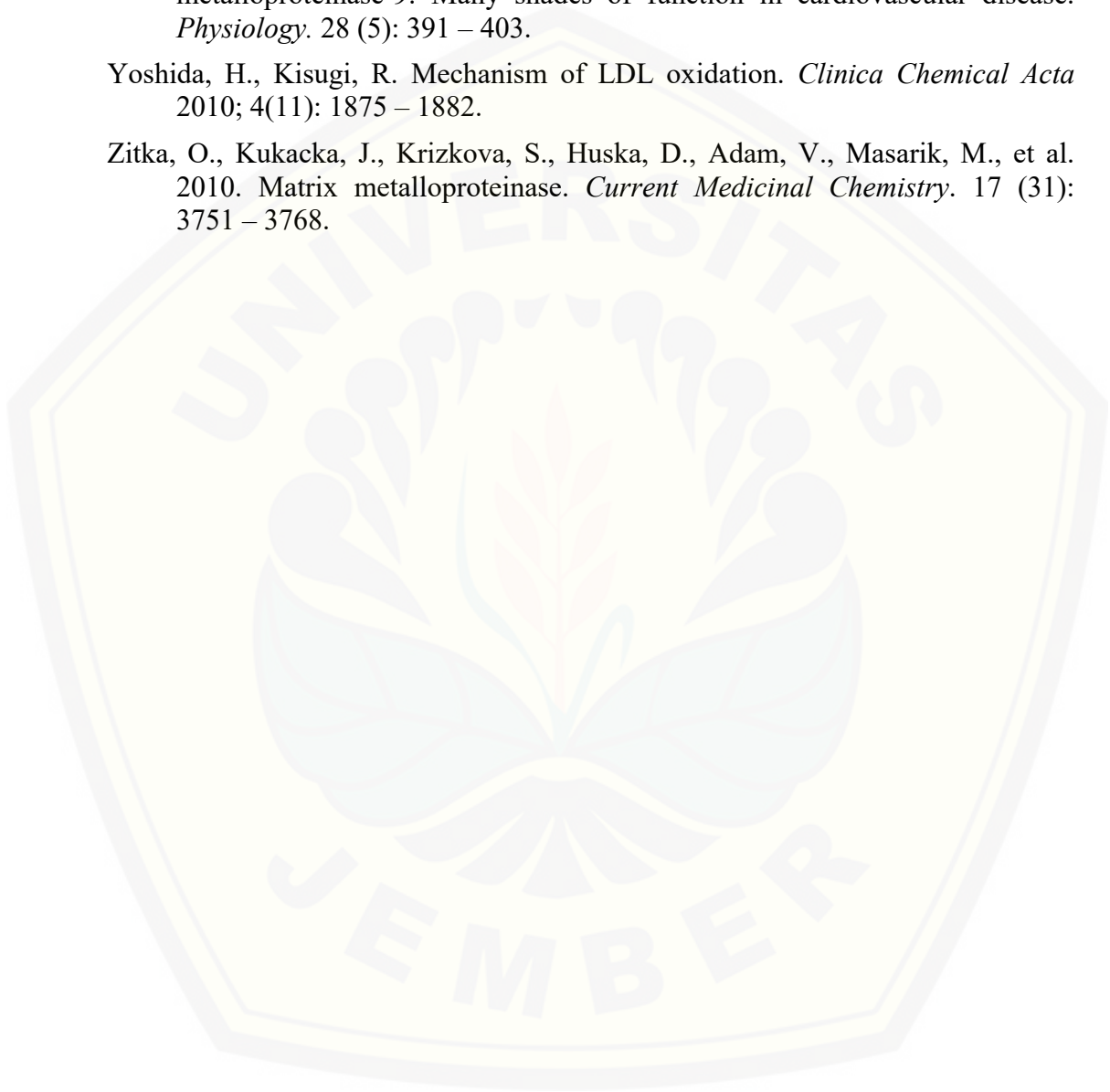
- Chrrier, A., Berthaud, J. 2014. Botanical Classification of Coffea. https://www.researchgate.net/publication/32986463_Botanical_Classification_of_Coffee/download. [Diakses pada 20 April 2018]
- Cho, A.S., Jeon, S.M., Kim, M.J. 2010. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*. 48(3):937–943.
- Chu, Y.F., Chang, W.H., Black, R.M. 2014. Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid β 1—42 levels in an Alzheimer's mouse model. *Food Chemistry*. 135(3): 2095–2102.
- Daniel, W. 2005. *Biostatic Foundation for Analysis in The Health Sciemce*. 8th Ed. Georgia: Willey
- Doss, H.M., Dey, C., Sudandiradoss, C., Rasool, M.K. 2016. Targeting inflammatory mediators with ferulic acid, a dietary polyphenol, for the suppression of monosodium urate crystal-induced inflammation in rats. *Life Sci* 148(2): 01–10.
- Eckman, D.M., Stacey, R.B., Rowe, R., D'Agostino, R.J., Kock, N.D., Sane, D.C., et al. 2013. Weekly doxorubicin increases coronary arteriolar walland adventitial thickness. *Plos One*. 8(2): 1 – 6.
- Eroschenko, V.P. 2008. *Difiore's Atlas of Histology with The Function Correlation*. 11th Ed. Philedelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Farah, A. 2012. Coffee: Emerging health effects and disease prevention. Oxford: Wiley- Blackwell.
- Fonseca, A.L., Lima, F.2., Couto, R.D. 2014. The action of metaloproteinase in atherosclerosis diseases. *ABCS Health Science*. 39 (3): 186 – 193.
- 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 Internastional*. 76: 626 – 636.
- Harsa, I.M.S. 2014. Efek Pemberian Diet Tinggi Lemak terhadap Profil Lemak Darah Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*). *Jurnal Ilmiah Kedokteran*. 3(1): 21-28
- Hasan, I. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I: Perlemakan hati Non Alkoholik*. Edisi ke-5. Jakarta: Balai penerbit FKUI.
- Hendromartono, Tjokroprawiro, A., Sutjahjo, A., Pranoto, A., Murtiwi, S., Adi, S. 2007. Dislipidemia. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Huang, J., de Paulis, T., May, J.M. 2004. Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA hy926 endothelial cells. *J Nutr Biochem*. 15(2): 722–729.
- Jannah, L.R., Suyuti, H., Dewi, N.A., Refa, S. 2013. Efek pemberian matrix metalloproteinase-9 (MMP- 9) RNA interference terhadap ekspresi MMP-9 pada kultur sel endotel vaskular. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*; 22(2): 51 – 57

- Jin, U.H., Lee, J.Y., Kang, S.K., *et al.* 2005. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci.* 77(9): 60 – 67.
- Kementerian Kesehatan (Kemenkes). 2013. Riset Kesehatan Dasar. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
- Kiran, M. 2010. Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention. *Lipids.* 45(10): 907 – 914.
- Krakauer T. 2002. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 24(9): 113 – 120.
- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., 2007. *Buku Ajar Patologi Volume 2.* Edisi 7. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kwon, S.H., Lee, H.K., Kim, J.K. 2010. Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European Journal of Pharmacology.* 649(1): 210–217.
- Lampiasi, N., Montana, G. 2016. The molecular events behind ferulic acid mediated modulation of IL-6 expression in LPS-activated Raw 264.7 cells. *Immunobiology* 221(4): 86–93.
- Lee, K., Lee, B.J., Bu, Y. 2015. Protective effect of dihydrocaffeic acid, a coffee component metabolite, on a focal cerebral ischemia rat model. *Molecules* 119 (20): 30 – 40.
- Marco, L.M., Fischer, S., Henle, T. 2011. High molecular weight coffee melanoidins are inhibitors for matrix metalloproteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 12(59): 417 – 423.
- Moore, K.J., Tabas, I. 2011. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 145: 341–355.
- Narita , Y., Inouye, K. 2013. Degradation kinetics of chlorogenic acid at various pH values and effects of ascorbic acid and epigallocatechin gallate on its stability under alkaline conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry;* 61(4): 966–972.
- Nasir, A., Muhith, A., Ideputri, M.E. 2011. *Buku Ajar: Metodologi Penelitian Kesehatan.* Yogyakarta: Nuha Medika
- National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI). 2015. Atherosclerosis: Also known as Arteriosclerosis, Hardening of arteries. <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/atherosclerosis>. [Diakses pada 28 April 2018].
- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., Feeley, M. 2013. Effects of caffeine on human health. *Food Additives and Contaminants.* 20(1): 1 – 30.

- Newby, A.C. 2015. Role of metalloproteinase in plaque rupture. *International Journal of Gerontology*. 1(3): 103 – 111.
- Newman, M.G., Caranza, F.A., Takei, H.H., Klokkevold, P.R., 2012, *Carranza's Clinical Periodontology*, 11th ed, Saunders Elsevier, China.
- Nguyen, P., Leray, V., Diez, M., Serisier, S., Siliart, B., Dumon, H. 2008. Liver lipid metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92: 272–283.
- Nuhu, A.A. 2014. Bioactive Micronutrients in Coffee: Recent Analytical Approaches for Characterization and Quantification. *ISRN Nutrition*. 38(11): 1 – 13
- Oliveira, M., Casal, S., Morais, S., Alves, C., Dias, F., Ramos, S., et al. 2012. Intra- and interspecific mineral composition variability of commercial coffees and coffee substitutes: Contribution to mineral intake. *Food Chemistry*. 130(13): 702–709.
- Ong, Khang, W., Annie, H., Kwong, H.T. 2013. Anti-diabetic and Anti-Lipidemic Effects of Chlorogenic Acid are Mediated by AMPK Activation. *Biochemical Pharmacology*. 85(11): 1341-1351
- Paiva, L.B., Goldbeck, R., Santos, W.D., Squina, F.M. 2013. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. 49 (3): 395 – 411.
- Pohlan, H.A.J., Janssens, M.J.J. 2010. *Growth and Production of Coffee*. Nottingham: EOLSS Publishers.
- Prastowo, B., Karmawati, E., Rubijo., Siswanto., Chandra, I., S. Munarso, J.S. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Sanhia, A.M., Pangemanan, D.H.C., Engka, J.N.A., 2015. Gambaran kadar kolesterol low density lipoprotein (LDL) pada masyarakat perokok di pesisir pantai. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*. 3 (1): 460 – 465.
- Sariningsih. 2014. *Gigi busuk dan Periodontal sebagai Fokus Infeksi*. Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T. 2011. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. 403(1): 136– 138.
- Shibata, H., Sakamoto, M.Y., Oka, Kono, Y. 2010. Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. *Departement of Life Science and Biotechnology Faculty of Life and Environmental Science Shimane University*. Japan. 30 – 32.
- Shin, H.S., Satsu, H., Bae, M.J., Totsuka, M., Shimizu, M. Catechol Groups Enable Reactive Oxygen Species Scavenging-Mediated Suppression of PKD-NFkappaB-IL-8 Signaling Pathway by Chlorogenic and Caffeic Acids in Human Intestinal Cells. *Journal of Nutrient* 2017; 9(2): 66 – 72.

- Silva, E.O., Batista, R. Ferulic acid and naturally occurring compounds bearing a feruloyl moiety: a review on their structures, occurrence, and potential health benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2017; 16(2): 580 – 616.
- Smith, A. 2002. Effects of caffeine on human behavior. *Food and Chemical Toxicology*. 40(8): 1243-1255.
- Spence, J.D., Pilote, L. 2015. Importance of sex and gender in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 241(27): 208 – 210.
- Spyridopoulo, I., Fichtlschere, S., Popp, R. 2008. Caffeine enhances endothelial repair by an AMPK-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28 (19): 67 – 74.
- Stenger, M. 2015. Calculating H-Score. <http://www.ascopost.com/issues/april-10-2015/calculating-h-score/> . [Diakses pada 27 April 2018].
- Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S, editors. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jakarta: Interna Publishing, 2010; p.1984-1992.
- 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.
- Ticoalu, J.P., Kepel, B.J., Mintjelungan, C.N. 2016. Hubungan periodontitis dengan penyakit jantung koroner pada pasien di RSUP Prof. Dr. R.D. Kandou Manado. *Jurnal e-Gigi*. 4(2): 277 – 281.
- Upadhyay, R., Rao, L.J.M. 2013. An outlook on chlorogenic acids—occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53(9): 968–984.
- Urushisaki, T., Takemura, T., Tazawa, S. 2011. Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in brazilian green propolis water extract. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 254914: 7.
- Wang, G.F., Shi, L.P., Ren, Y.D. 2009. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. *Antiviral Research*. 83(2): 186–190.
- Wisniewska, A., Olszanecki, R., Zuranska, J.T., Kus, K., Stachowicz, A., Suski, M., et al. 2017. Anti-atherosclerotic action of
- World Health Organization (WHO). 2015. Cardiovascular Disease Fact Sheets. [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). [Diakses pada 8 April 2018].
- Wu, M.Y., Li, C.J., Hou, M.F., Chu, P.Y. 2017. New insight into the role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 18: 1 – 18.

- Wulandari, L.R., Suyut, H., Dewi, N.A., Refa, S. 2016. Efek pemberian *matrix metalloproteinase-9 (MMP- 9) RNA interference* terhadap ekspresi MMP-9 pada kultur sel endotel vaskular. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 22(6): 50 – 57.
- Yabluchanskiy, A., Ma, Y., Iye, R.P., Hall , M.E., Lindsey, M.L. 2012. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology*. 28 (5): 391 – 403.
- Yoshida, H., Kisugi, R. Mechanism of LDL oxidation. *Clinica Chemical Acta* 2010; 4(11): 1875 – 1882.
- Zitka, O., Kukacka, J., Krizkova, S., Huska, D., Adam, V., Masarik, M., et al. 2010. Matrix metalloproteinase. *Current Medicinal Chemistry*. 17 (31): 3751 – 3768.



Lampiran 1. *Ethical Clearance*

The image shows a formal ethical clearance certificate from Universitas Jember. It features a decorative border and a central header box containing the university's logo and the name of the committee: 'KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)'. The main title is 'ETHIC COMMITTEE APPROVAL' with reference number 'No.256/UN25.8/KEPK/DL/2019'. A list of details follows, including the research title, approved document, principal investigator (Widy Jatmiko), date of approval (December 12th, 2018), and the research location. A statement of approval is provided, followed by the date 'Jember, January 9th, 2019'. Two signatures are present: the Dean of the Faculty of Dentistry (Prof. B. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros) and the Chair of the Research Ethics Committee (Prof. Dr. Endang Ayu Ratna Dewanti, M.Si).

 KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER
(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH
FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)

ETHIC COMMITTEE APPROVAL
No.256/UN25.8/KEPK/DL/2019

Title of research protocol : "Effect Of Robusta Coffee On Expression-9 (MMP-9) On Coronary Artery Rat In Induced Hyperlipid"
Document Approved : Research Protocol
Principal investigator : Widy Jatmiko
Member of research : -
Responsible Physician : Widy Jatmiko
Date of approval : December 12th, 2018
Place of research : Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

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.

Jember, January 9th, 2019

Dean of Faculty of Dentistry
Universitas Jember

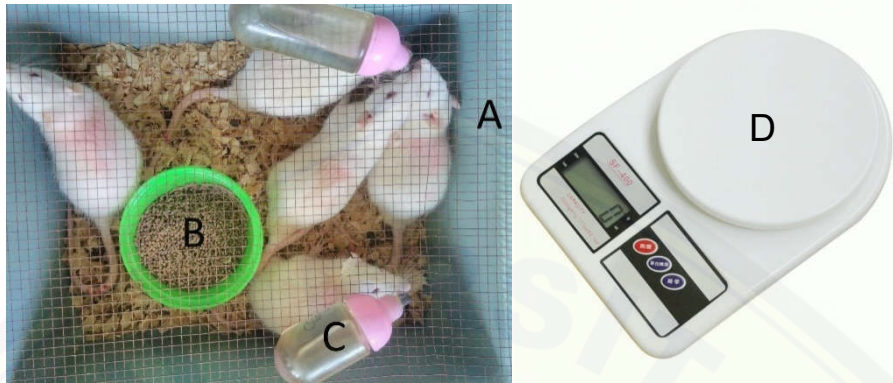
(Prof. B. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)

Chair of Research Ethics Committee
Faculty of Dentistry Universitas Jember

(Prof. Dr. Endang Ayu Ratna Dewanti, M.Si)

Lampiran 2. Alat Penelitian

1. Alat Pemeliharaan Hewan Coba



Keterangan :

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

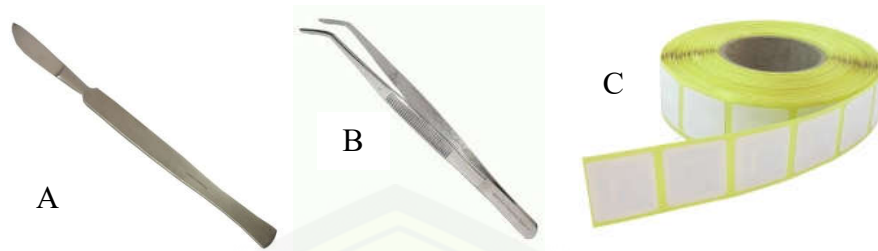
2. Alat Pemberian Diet Tinggi Lemak



Keterangan :

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

3. Alat Bedah



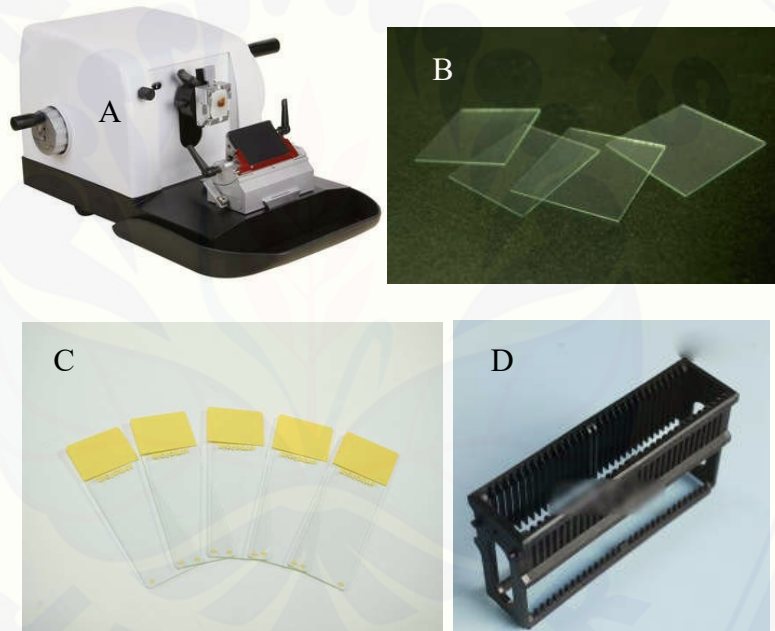
Keterangan :

A : Scalpel

B : Pinset

C : Label identitas

4. Alat Proses Jaringan



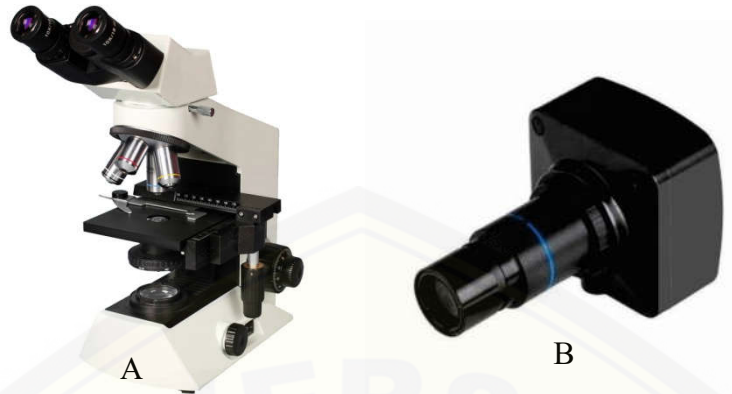
Keterangan :

A : Mikrotom

B : *Deck glass*C : Glas objek *poly-l-lysine*

D : Rak pengecatan

5. Alat Pengamatan Jaringan



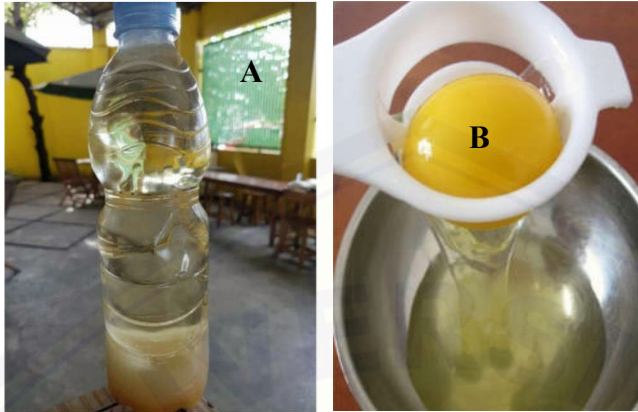
Keterangan :

A : Mikroskop

B : Optilab

Lampiran 3. Bahan Penelitian

1. Bahan pembuatan larutan diet tinggi lemak



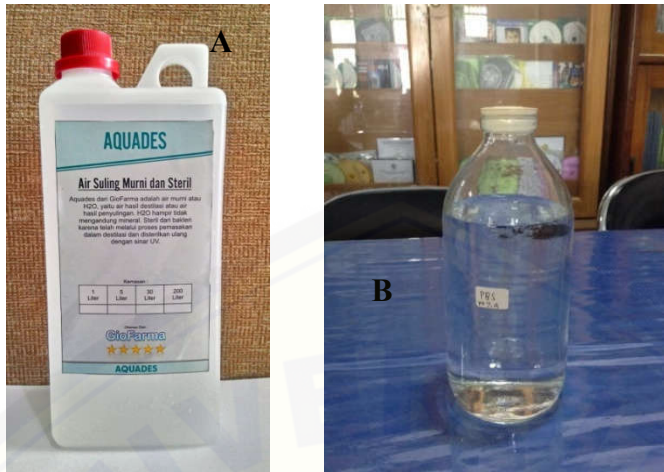
Keterangan :

- A : Lemak babi
B : Kuning telur bebek

2. Bahan pembuatan larutan kopi (Kopi bubuk robusta merk Gunung Ijen)



3. Bahan processing jaringan arteri koroner



Keterangan :

- A : Akuades steril
 B : PBS (*Phosphat Buffer Salin*)

4. Bahan *immunostaining*

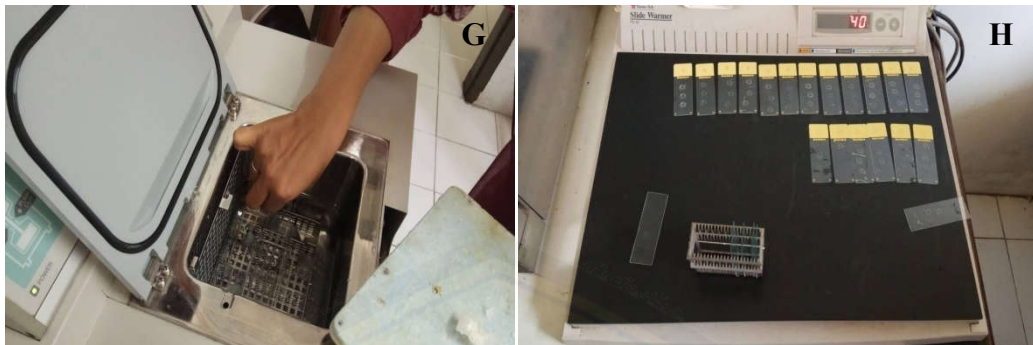
Keterangan :

- A : Hidrogen peroksida 3%
 B : Antibodi skunder, DAB kromagen, xylene, dan Mayer's hematoksilin
 C : Antibodi primer (anti MMP-9)

Lampiran 4. Prosedur Penelitian

Keterangan :

- A : Adaptasi hewan coba
- B : Pemberian diet tinggi lemak (kuning telur dan lemak babi)
- C : Pemberian seduhan kopi
- D : Pengambilan darah secara infraorbital
- E : Sampel darah untuk pengujian kadar LDL
- F : Pengujian kadar LDL



Keterangan :

G : Impregnasi

H : Immunostaining



Lampiran 5. Data Hasil Penelitian

Uji Normalitas

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MMP9 Kelompok Kontrol	.269	4	.	.900	4	.433
Kelompok Hiperlipidemia	.250	4	.	.878	4	.329
Kelompok Perlakuan Kopi	.260	4	.	.952	4	.731

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

MMP9

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.574	2	9	.131

Hasil Uji Beda *One Way ANOVA*

ANOVA

MMP9	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	140122.167	2	70061.083	3.673E4	.000
Within Groups	17.169	9	1.908		
Total	140139.336	11			

Hasil Uji Lanjut *Least Significant Difference (LSD)***Multiple Comparisons**

MMP9

LSD

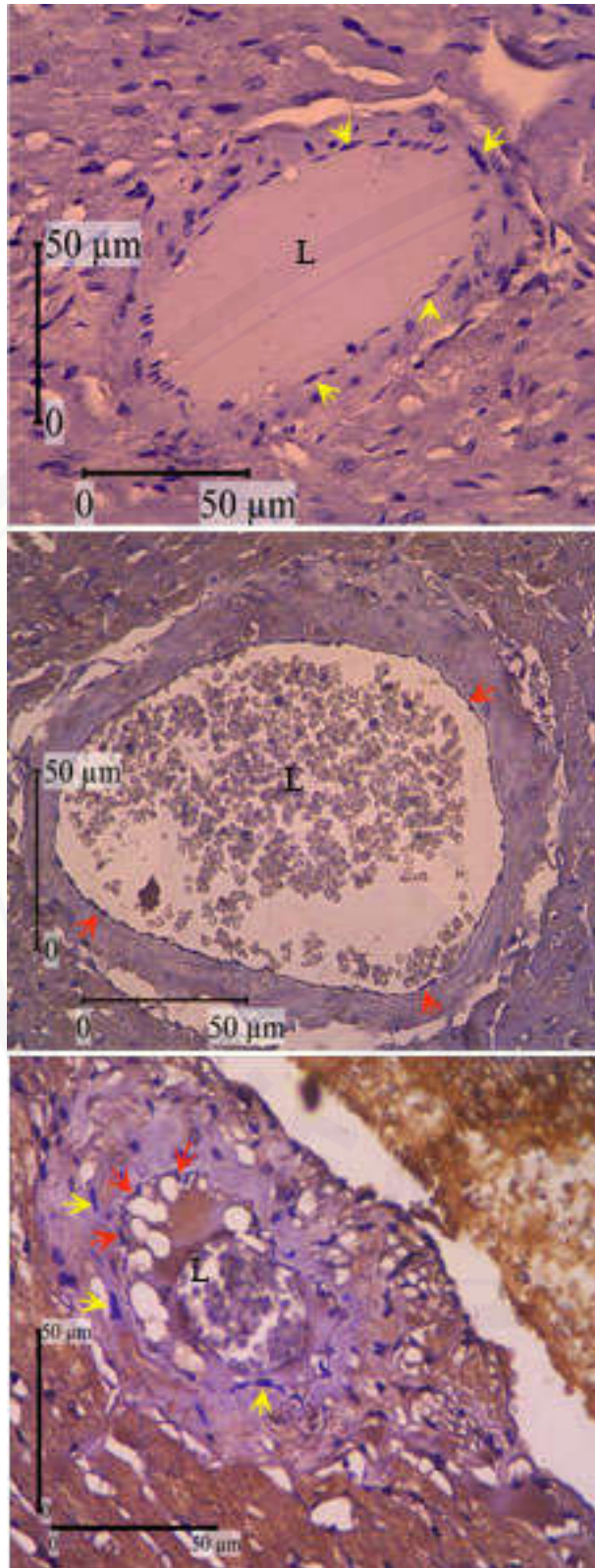
(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok Kontrol	Kelompok Hiperlipidemia	-262.47000*	.97664	.000	-264.6793	-260.2607
	Kelompok Perlakuan Kopi	-101.60500*	.97664	.000	-103.8143	-99.3957
Kelompok Hiperlipidemia	Kelompok Kontrol	262.47000*	.97664	.000	260.2607	264.6793
	Kelompok Perlakuan Kopi	160.86500*	.97664	.000	158.6557	163.0743
Kelompok Perlakuan Kopi 10 Gram	Kelompok Kontrol	101.60500*	.97664	.000	99.3957	103.8143
	Kelompok Hiperlipidemia	-160.86500*	.97664	.000	-163.0743	-158.6557

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

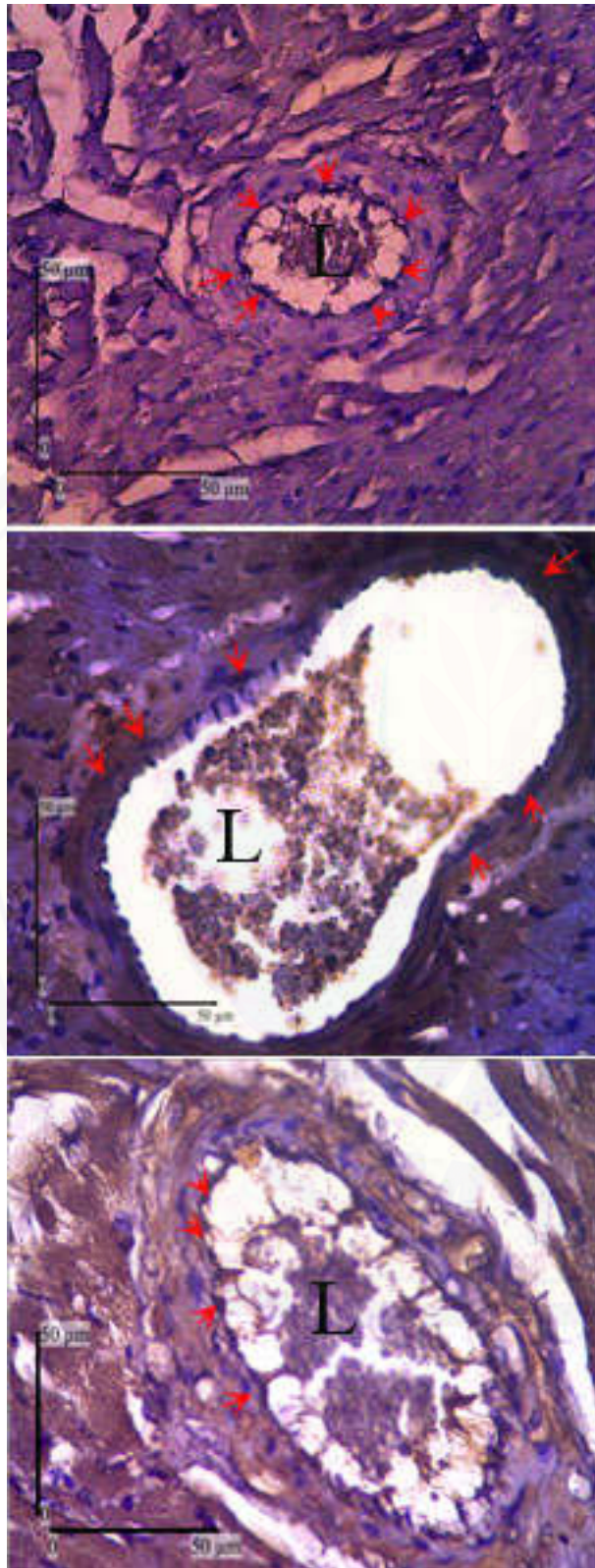
Deskripsi Data

Descriptives

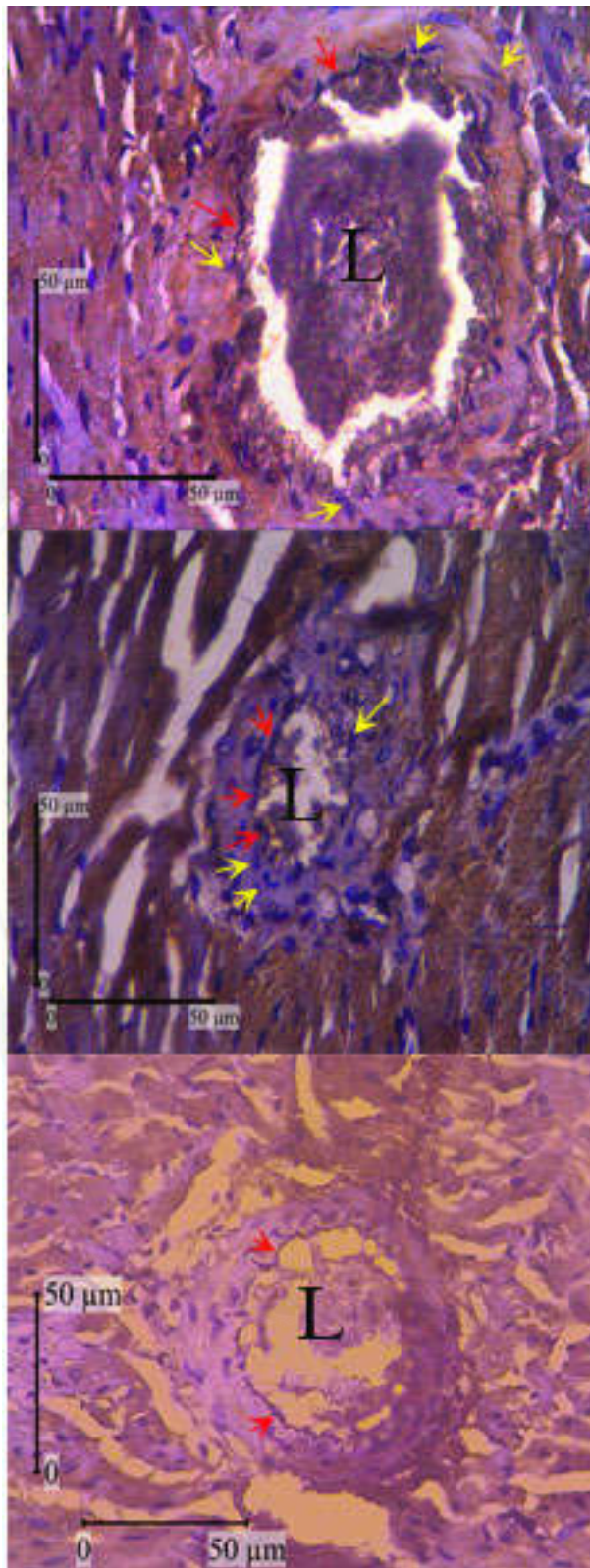
MMP9	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kelompok Kontrol	4	15.0900	.48956	.24478	14.3110	15.8690	14.48	15.52
Kelompok Hiperlipidemia	4	2.7756E2	2.10895	1.05447	274.2042	280.9158	274.65	279.24
Kelompok Perlakuan Kopi	4	1.1670E2	1.01763	.50881	115.0757	118.3143	115.63	118.07
Total	12	1.3645E2	112.87134	32.58315	64.7333	208.1634	14.48	279.24

Kelompok Kontrol dengan Perbesaran 400x**Keterangan**

- L : Lumen
- Panah kuning : Sel endotel normal
- Panah merah : Sel endotel mengekspresikan MMP-9

Kelompok Hiperlipidemia dengan Perbesaran 400x**Keterangan**

- L : Lumen
- Panah kuning : Sel endotel normal
- Panah merah : Sel endotel mengekspresikan MMP-9

Kelompok Perlakuan Kopi dengan Perbesaran 400x**Keterangan**

- L : Lumen
- Panah kuning : Sel endotel normal
- Panah merah : Sel endotel mengekspresikan MMP-9

Tabel 1. Hasil pengamatan ekspresi MMP-9 tiga pengamat

Kelompok	Pengamat 1					Pengamat 2					Pengamat 3				
	1	2	3	4	N	1	2	3	4	N	1	2	3	4	N
Kelompok kontrol sampel D	65	8	1	0	74	66	8	1	0	75	68	9	1	1	79
Kelompok kontrol sampel D1	63	9	1	0	73	63	9	1	0	73	65	7	1	1	74
Kelompok kontrol sampel D2	63	8	0	0	71	62	9	0	1	72	61	9	1	0	71
Kelompok kontrol sampel D3	66	6	0	0	72	62	8	1	1	72	64	8	2	1	75
Kelompok perlakuan kopi T1	49	20	4	29	102	49	20	7	33	109	53	20	6	30	109
Kelompok perlakuan kopi V	50	23	5	30	108	52	19	5	33	109	49	21	5	32	107
Kelompok perlakuan kopi C	51	19	6	33	109	50	21	8	30	109	50	20	6	29	105
Kelompok perlakuan kopi T	51	21	6	35	113	52	19	5	31	107	53	19	7	33	112
Kelompok hiperlipidemia S	0	0	16	58	74	1	1	14	58	74	0	1	13	59	73
Kelompok hiperlipidemia S1	0	2	12	57	71	1	2	13	55	71	1	2	11	57	71
Kelompok hiperlipidemia E	1	1	11	58	71	1	0	10	59	70	1	1	10	59	71
Kelompok hiperlipidemia E1	1	1	11	60	73	1	1	10	57	69	1	0	11	60	72

N : Jumlah sel endotel tunika intima arteri koroner

1 : Intensitas normal

2 : Intensitas lemah

3 : Intensitas sedang

4 : Intensitas kuat

Tabel 2. Rata-Rata dan skoring data ekspresi MMP-9

Kelompok	Rata-Rata					%				IN	IL	IS	IK	SKOR	Rata-Rata
	1	2	3	4	N	1	2	3	4						
Kelompok kontrol sampel D	66,3	8,3	1	0,3	76	87,3	11	1,32	0,44	0	11	2,6	1,32	14,912	15,09448
Kelompok kontrol sampel D1	63,7	8,3	1	0,3	73	86,8	11,4	1,36	0,45	0	11,4	2,7	1,36	15,455	
Kelompok kontrol sampel D2	62	8,7	0,33	0,3	71	86,9	12,1	0,47	0,47	0	12,1	0,9	1,4	14,486	
Kelompok kontrol sampel D3	64	7,3	1	0,7	73	87,7	10	1,37	0,91	0	10	2,7	2,74	15,525	
Kelompok perlakuan kopi T1	50,3	20	5,67	31	107	47,2	18,8	5,31	28,8	0	18,8	11	86,3	115,63	116,6932
Kelompok perlakuan kopi V	50,3	21	5	32	108	46,6	19,4	4,63	29,3	0	19,4	9,3	88	116,67	
Kelompok perlakuan kopi C	50,3	20	6,67	31	108	46,7	18,6	6,19	28,5	0	18,6	12	85,4	116,41	
Kelompok perlakuan kopi T	52	20	6	33	111	47	17,8	5,42	29,8	0	17,8	11	89,5	118,07	
Kelompok hiperlipidemia S	0,33	0,7	14,3	58	74	0,45	0,9	19,5	79,2	0	0,9	39	238	277,38	277,5602
Kelompok hiperlipidemia S1	0,67	2	12	56	71	0,94	2,82	16,9	79,3	0	2,82	34	238	274,65	
Kelompok hiperlipidemia E	1	0,7	10,3	59	71	1,42	0,94	14,6	83	0	0,94	29	249	279,25	
Kelompok hiperlipidemia E1	1	0,7	10,7	59	71	1,4	0,93	15	82,7	0	0,93	30	248	278,97	

N : Jumlah sel endotel tunika intima arteri koroner
 1 : Intensitas normal (tidak mengekspresikan MMP-9)
 2 : Intensitas lemah
 3 : Intensitas sedang
 4 : Intensitas kuat
 % : Prosentase

IN : Skor intensitas normal (0)
 IL : Skor intensitas lemah (1)
 IS : Skor intensitas sedang (2)
 IK : Skor intensitas kuat (3)