



**ANALISIS EFEK SEDUHAN *GREEN COFFEE* DAN *BLACK COFFEE*
TERHADAP EKSPRESI TNF- α PADA HUMAN MONOSIT
YANG DIPAPAR *Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Oleh:

Wenny Agestin H.

NIM 1516101015

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2019



**ANALISIS EFEK SEDUHAN *GREEN COFFEE* DAN *BLACK COFFEE*
TERHADAP EKSPRESI TNF- α PADA HUMAN MONOSIT
YANG DIPAPAR *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:

Wenny Agestin H.

NIM 151610101015

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2019

SKRIPSI

**ANALISIS EFEK SEDUHAN *GREEN COFFEE* DAN *BLACK COFFEE*
TERHADAP EKSPRESI TNF- α PADA HUMAN MONOSIT
YANG DIPAPAR *Staphylococcus aureus***

Oleh:

Wenny Agestin H.

NIM 151610101015

Dosen Pembimbing:

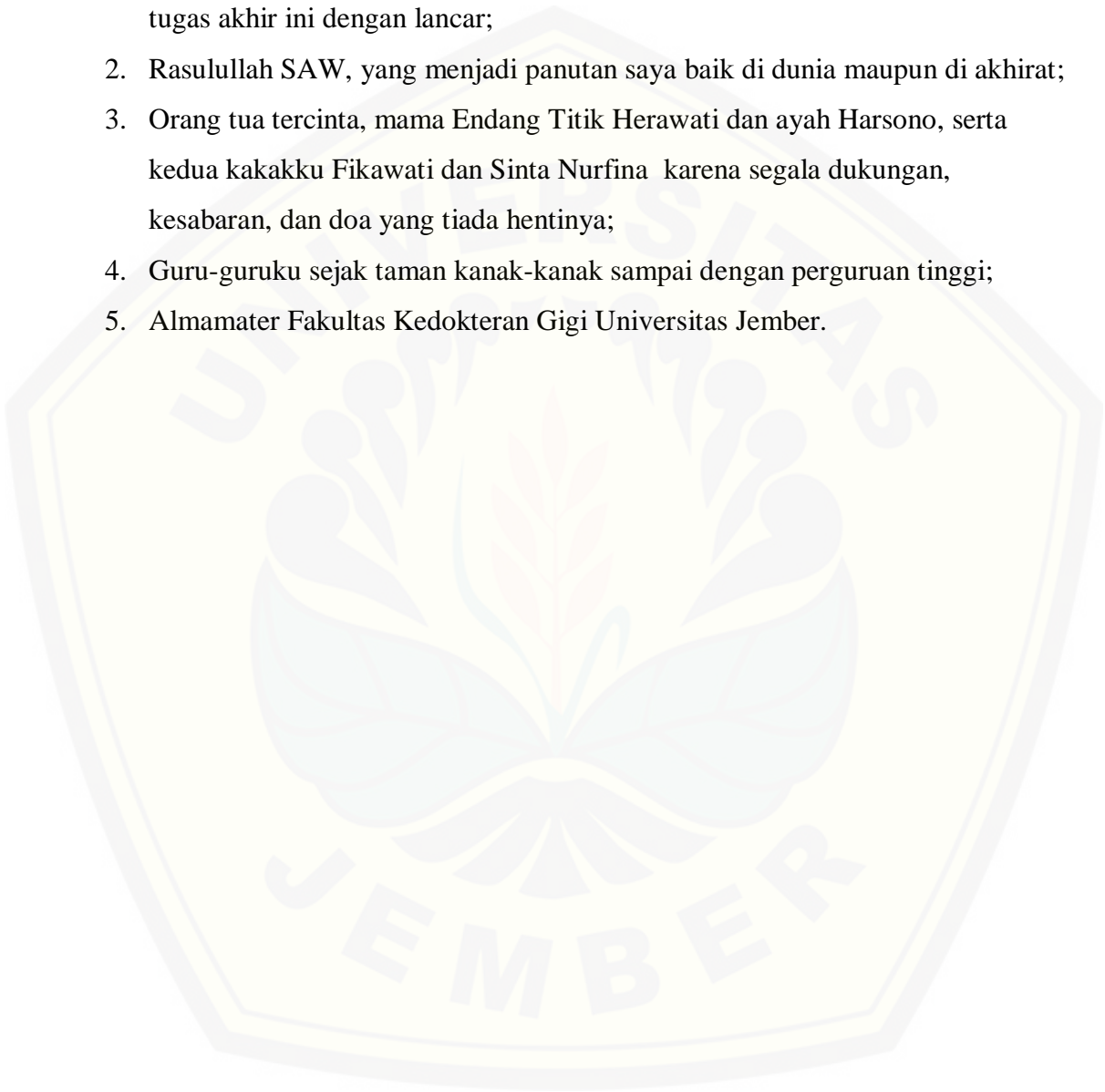
Dosen Pembimbing Utama : drg. Budi Yuwono, M.Kes

Dosen Pembimbing Pendamping : Prof. Dr.drg I D A Ratna Dewanti, M.Si

PERSEMBAHAN

Karya tulis ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT karena atas izin dan kehendak-Nya saya dapat menyelesaikan tugas akhir ini dengan lancar;
2. Rasulullah SAW, yang menjadi panutan saya baik di dunia maupun di akhirat;
3. Orang tua tercinta, mama Endang Titik Herawati dan ayah Harsono, serta kedua kakakku Fikawati dan Sinta Nurfini karena segala dukungan, kesabaran, dan doa yang tiada hentinya;
4. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



MOTTO

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.”

(terjemahan QS. Al Baqarah ayat 286)*)

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap”

(Q.S. Al Insyirah : 6-8)**)

“Barang siapa menelusuri jalan untuk mencari ilmu padanya, Allah akan memudahkan baginya jalan menuju surga.”

(HR. Muslim)***)

*) Mirchandani, D. 2004. *Al-Qur'anku Dengan Tajwid Blok Warna (Arab-Latin-Terjemahan)*. Jakarta : Lautan Lestari.

***) Mirchandani, D. 2004. *Al-Qur'anku Dengan Tajwid Blok Warna (Arab-Latin-Terjemahan)*. Jakarta : Lautan Lestari.

****) HR. Muslim dalam Baqi, M. F. A. 2010. *Kumpulan Hadits Shahih Bukhari Muslim*. Solo : Penerbit Insan Kamil.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Wenny Agestin H.

NIM : 151610101015

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Analisis Efek Seduhan *Green Coffee* dan *Black Coffee* Terhadap Ekspresi TNF- α pada Human Monosit yang Dipapar *Staphylococcus aureus*” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta 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, 9 Mei 2019

Yang menyatakan,

Wenny Agestin H.

NIM. 151610101015

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Analisis Efek Seduhan *Green Coffee* dan *Black Coffee* Terhadap Ekspresi TNF- α pada Human Monosit yang Dipapar *Staphylococcus aureus*” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Kamis, 9 Mei 2019

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

Dr. drg. I D A Susilawati, M.Kes.
NIP 196109031986022001

drg. Amandia Dewi P S, M.Biomed
NIP 198006032006042002

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

drg. Budi Yuwono, M.Kes
NIP 196709141999031002

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

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Analisis Efek Seduhan *Green Coffee* dan *Black Coffee* Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Human Monosit yang Dipapar *Staphylococcus aureus*; Wenny Agestin H.; 151610101015; 2019; 90 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Secara umum infeksi di dalam rongga mulut disebabkan oleh *Streptococcus* dan *Staphylococcus* serta mikroorganisme Gram negatif yang berbentuk batang dan anaerob. Monosit merupakan salah satu jenis leukosit yang berperan dalam pertahanan pertama terhadap serangan mikroorganisme yang dapat membahayakan tubuh dengan cara mengaktifkan faktor transkripsi genetik yaitu *nuclear factor κ B* (Nf- κ B) yang merupakan pengatur utama gen-gen inflamasi, antara lain gen yang berfungsi memproduksi TNF- α . TNF- α pada kadar yang tepat akan memberikan perlindungan dan penyembuhan, sedangkan pada kadar yang berlebih akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal. Oleh karena itu diperlukan suatu imunomodulator yang dapat meregulasi sistem imun tubuh. Salah satu tanaman yang berperan sebagai imunomodulator adalah kopi. Kandungan bioaktif seperti flavonoid, asam klorogenat, senyawa polifenol, dan protein pada biji kopi Robusta diduga bekerja sebagai anti inflamasi dalam menghambat sitokin yang dihasilkan oleh sel imunokompeten. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis efek seduhan *Green Coffee* dan *Black Coffee* terhadap ekspresi TNF- α pada *human monosit* yang dipapar *Staphylococcus aureus*.

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories*. Obyek penelitian ini adalah isolat monosit vena perifer manusia yang diberi perlakuan seduhan bubuk kopi robusta (*Coffea canephora*). Penelitian ini menggunakan metode uji Imunositokimia yaitu sebuah pemeriksaan yang bertujuan untuk mengidentifikasi selular atau jaringan yang mengandung antigen dengan cara melihat reaksi antigen dan antibodinya. Variabel bebas dari penelitian ini adalah seduhan *green coffee* dan *black coffee* kopi robusta. Metode seduhan kopi dibuat dengan perbandingan 3 gr dan 6 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquades mendidih 99,9°C.

Variabel terikat dari penelitian ini adalah ekspresi TNF- α pada monosit. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah isolat monosit yang diisolasi dari darah vena perifer sehingga didapatkan jenis dan jumlah sel yang sama dan dosis suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian ini dibagi menjadi enam kelompok yaitu P0 (isolat monosit, *Staphylococcus aureus*), P1 (isolat monosit, seduhan *green coffee* 3gr/200ml, *Staphylococcus aureus*), P2 (isolat monosit, seduhan *green coffee* 6 gr/200ml, *Staphylococcus aureus*), P3 (isolat monosit, seduhan *black coffee* 3gr/200ml, *Staphylococcus aureus*), P4 (isolat monosit, seduhan *black coffee* 3gr/200ml, *Staphylococcus aureus*), dan K (isolat monosit). Penghitungan ekspresi TNF- α pada monosit dilakukan dengan mengitung jumlah sel yang sitoplasma dan membran selnya berwarna coklat dalam 100 sel monosit.

Hasil penelitian rata-rata jumlah monosit yang mengekspresikan TNF- α dari yang tertinggi sampai dengan terendah yaitu kelompok P0 sebesar 84,22%, kelompok P4 sebesar 50,11%, kelompok P2 sebesar 45,33%, kelompok P3 sebesar 42%, kelompok P1 sebesar 22%, dan kelompok kontrol sebesar 10,67%. Hasil uji *One Way Anova* terhadap nilai rata-rata ekspresi TNF- α adalah terdapat perbedaan antar kelompok. Hasil uji LSD (*Least Significant Difference*) adalah terdapat perbedaan bermakna pada beberapa kelompok. Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa seduhan *green coffee* dan *black coffee* kopi robusta memiliki efek antiinflamasi dan imunomodulator yang memadai dalam mengurangi ekspresi TNF- α monosit yang dipapar *S.aureus*. Seduhan kopi yang paling efektif dalam mengurangi ekspresi TNF- α pada penelitian ini adalah *green coffee* dosis 3gr/200ml.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala anugrah dan rahmatnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis Efek Seduhan *Green Coffee* dan *Black Coffee* Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Human Monosit yang Dipapar *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 dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Allah SWT atas berkat rahmat-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini;
2. drg. Rahardyan Parnaadji, M. Kes. Sp. Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. drg. Budi Yuwono, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, saran, motivasi, meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan, serta melibatkan penulis dalam penelitiannya;
4. Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, saran, motivasi, meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
5. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes., selaku Dosen Penguji Ketua yang telah memberi kritik, saran dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
6. drg. Amandia Dewi P S, M.Biomed., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberi kritik, saran dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
7. drg. Dwi Kartika Apriyono, Sp.OF., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan, motivasi dan semangat selama saya berada di Fakultas Kedokteran Gigi;
8. Kedua orang tuaku tercinta, Ibunda Endang Titik Herawati, S.Pd., Ayahanda Drs. Harsono dan kedua kakakku tersayang Fikawati Harsono dan Sinta

Nurfina Harsono terimakasih atas untaian doa, nasihat, dukungan, perhatian, pengorbanan, serta kasih sayang yang teramat tulus selama ini;

9. Seluruh dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah mendidik dan memberikan ilmu yang bermanfaat selama di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
10. Seluruh staf di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang membantu dalam penyelesaian administrasi penulisan tugas akhir ini;
11. Seluruh teknisi Laboratorium Bioscience, Laboratorium Histologi, dan Laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Jember atas bantuannya selama penelitian ini;
12. Teman tim penelitian saya, Fiona Budi Amarta Domini terimakasih atas dukungan dan kerjasamanya yang luar biasa;
13. Sahabatku, Agis, Fiona, Ibana, Ditto, Luaily dan Alodia. Terimakasih sudah bersedia menjadi teman bertukar pikiran yang menyenangkan, memberi perhatian yang luar biasa, selalu mendukung, saling membantu serta mendoakan dalam kebaikan;
14. Teman Tutorial 2 dan Keluarga 2, Wifqi, Fitria, Mala, Nindya, April, Elma, Raziqa, Ayu, Dani, Fergy, Ibnu, Nadya, Hasna, Riri yang selalu memberi bantuan, motivasi dan semangat selama di FKG;
15. Seluruh teman-teman FKG 2015. Terimakasih atas kebersamaan, dukungan, bantuan, semangat dan doa yang diberikan selama ini;
16. Semua pihak yang turut terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, terimakasih atas dukungannya.

Penulis menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan tugas akhir ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan khususnya dibidang kesehatan.

Jember, 9 Mei 2019

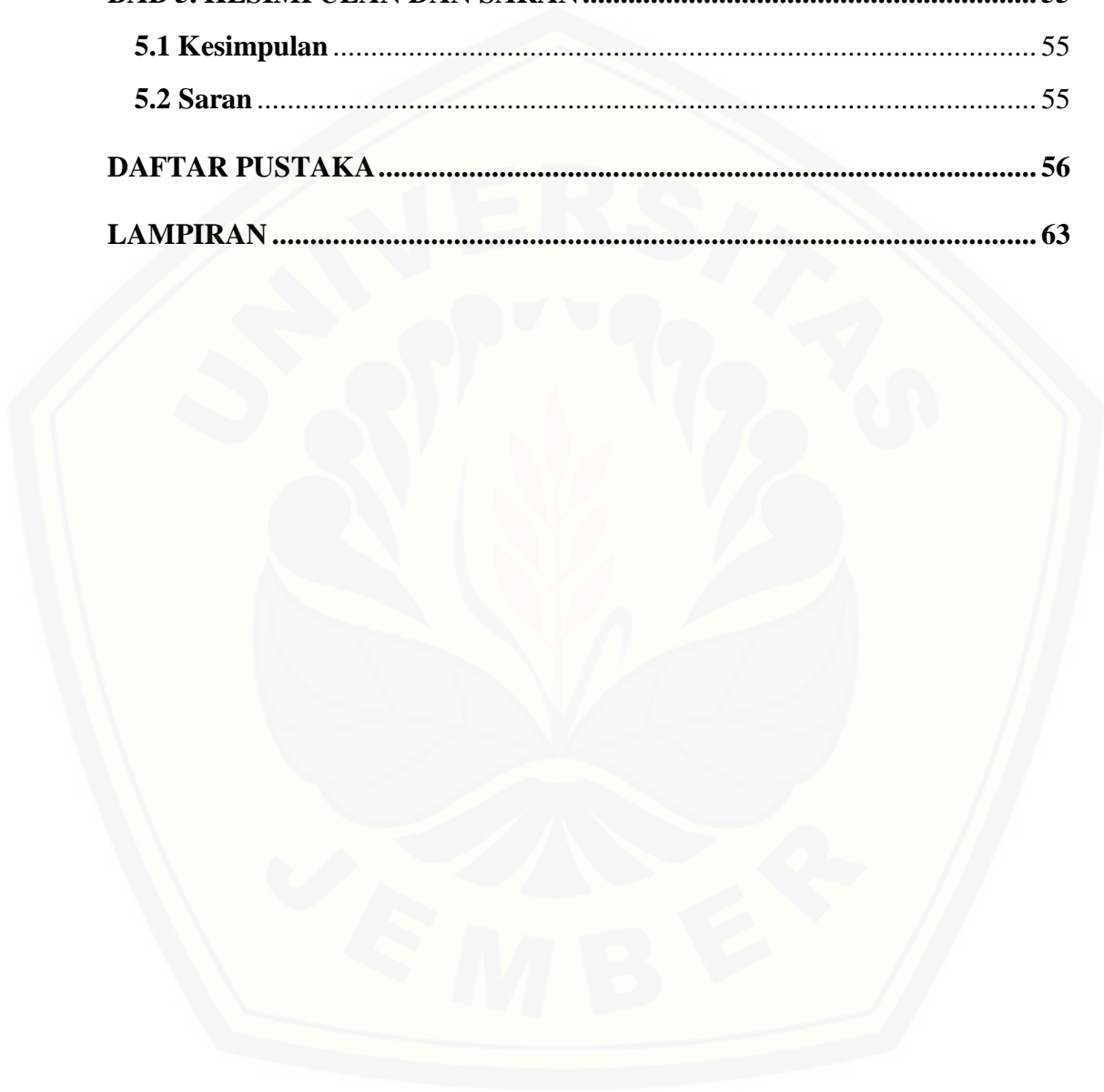
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERSEMBAHAN	iv
MOTTO	v
PERNYATAAN	vi
PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN.....	viii
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kopi Robusta (<i>Coffea robusta</i>).....	4
2.1.1 Taksonomi Kopi Robusta.....	5
2.1.2 Morfologi Kopi Robusta	6
2.1.3 Kandungan Biji Kopi Robusta.....	8
2.2.4 Manfaat Kopi Robusta	11
2.3 Monosit pada <i>Human Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>	12
2.4 Inflamasi	13
2.5 TNF-α (<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>).....	16
2.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	17

2.6.1 Taksonomi <i>S.aureus</i>	18
2.6.2 Morfologi <i>S.aureus</i>	18
2.6.3 Pertumbuhan dan Pembenihan <i>S.aureus</i>	19
2.6.4 Patogenesis dan Infeksi <i>S.aureus</i>	19
2.6.5 Respon Imun Terhadap <i>S.aureus</i>	20
2.7 Imunositokimia	24
2.7.1 Teknik Imunositokimia	24
2.8 Kerangka Konseptual	26
2.9 Hipotesis	28
BAB 3. METODE PENELITIAN	29
3.1 Jenis penelitian	29
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.3 Variabel penelitian	29
3.3.1 Variabel bebas	29
3.3.2 Variabel Terikat	29
3.3.3 Variabel Terkendali	29
3.4 Definisi Oprasional	30
3.4.1 Seduhan <i>Green Coffee</i> Kopi Robusta	30
3.4.2 Seduhan <i>Black Coffee</i> Kopi Robusta	30
3.4.3 Ekspresi TNF- α dengan Teknik Imunositokimia	30
3.4.4 Human Monosit	31
3.4.5 <i>S.aureus</i>	31
3.5 Sampel Penelitian	31
3.5.1 Kriteria Sampel	31
3.5.2 Pengulangan Sampel dan Pengelompokan Sampel Penelitian	31
3.6 Alat dan Bahan	33
3.6.1 Alat	33
3.6.2. Bahan	34
3.7 Prosedur Penelitian	35
3.7.1 Tahap Persiapan	36
3.7.2 Tahap Analisis Ekspresi TNF- α	38
3.8 Analisis Data	42
3.9 Alur Penelitian	43
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	44

4.1 Hasil Penelitian	44
4.2 Analisis Data Penelitian.....	47
4.3 Pembahasan	49
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	55
5.1 Kesimpulan	55
5.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	63



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Kopi robusta	4
Gambar 2.2 Ilustrasi penampang buah kopi.....	6
Gambar 2.3 Perubahan pada warna kopi.....	7
Gambar 2.4 <i>Green coffee bean</i>	9
Gambar 2.5 <i>Black coffee bean</i>	9
Gambar 2.6 Monosit	13
Gambar 2.7 Gambaran mikroskopis <i>S.aureus</i>	18
Gambar 2.8 Interaksi antara stress oksidatif dan inflamasi.....	22
Gambar 2.9 Respon imun terhadap <i>S.aureus</i>	23
Gambar 2.8 Kerangka konsep	26
Gambar 3.1 Prosedur penelitian	35
Gambar 3.2 Gambaran mikroskopis <i>S.aureus</i>	38
Gambar 3.3 Alur penelitian.....	43
Gambar 4.1 Isolat monosit	44
Gambar 4.2 Grafik Diagram batang rata-rata ekspresi TNF- α	45
Gambar 4.3 Gambaran mikroskopis monosit.....	46
Gambar 4.4 Mekanisme produksi TNF- α	50

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi Biji Kopi Robusta	10
Tabel 4.1 Rata-rata Jumlah Ekspresi TNF- α	45
Tabel 4.2 Hasil uji normalitas <i>Saphiro-Wilk</i>	47
Tabel 4.3 Hasil uji homogenitas <i>Levene test</i>	47
Tabel 4.4 Hasil uji <i>One Way Anova</i>	48
Tabel 4.5 Hasil uji LSD (<i>Least Significance Different</i>).....	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Izin Penelitian	63
Lampiran B. <i>Ethical Clearance</i>	65
Lampiran C. Surat Identifikasi Bakteri	66
Lampiran D. Lembar Persetujuan (<i>Informed Consent</i>).....	67
Lampiran E. Alat dan Bahan Penelitian	68
Lampiran F. Pembuatan Seduhan <i>Green Coffee</i> dan <i>Black Coffee</i>	73
Lampiran G. Pembuatan Suspensi <i>S.aureus</i>	75
Lampiran H. Isolasi Monosit	76
Lampiran I. Penempelan Sel dan Perlakuan	78
Lampiran J. Prosedur Imunositokimia	80
Lampiran K. Hasil Penelitian	83
Lampiran L. Analisis Data	86

BAB 1. PENDAHULUAN

1. 1 Latar Belakang

Infeksi di dalam rongga mulut sebagian besar bersifat campuran (polimikrobial). Secara umum infeksi di dalam rongga mulut disebabkan oleh *Streptococcus* dan *Staphylococcus* serta mikroorganisme Gram negatif yang berbentuk batang dan anaerob (Pedersen, 2013). *S.aureus* sebagai salah satu mikroflora normal yang berada di dalam mulut, bilamana dipengaruhi oleh faktor predisposisi dapat menyebabkan beberapa penyakit dalam rongga mulut seperti abses, gingivitis, *angular cheilitis*, parotitis, *staphylococcal mucositis* dan *denture stomatitis* (Syahrurachman *et al.*, 2010; Warbung *et al.*, 2015). Respon tubuh terhadap bakteri ini berupa inflamasi.

Inflamasi adalah satu dari respon utama mekanisme dari sistem pertahanan tubuh untuk melindungi dari suatu organisme, infeksi dan iritasi. Salah satu sel yang kompeten dalam mengatasi *S.aureus* adalah monosit. Monosit merupakan salah satu jenis leukosit yang berperan dalam pertahanan pertama terhadap serangan mikroorganisme yang dapat membahayakan tubuh dengan cara mengaktifkan faktor transkripsi genetik yaitu *nuclear factor κ B* (Nf- κ B) yang merupakan pengatur utama gen-gen inflamasi, salah satunya gen yang berfungsi memproduksi TNF- α . TNF- α pada kadar yang tepat akan memberikan perlindungan dan penyembuhan, sedangkan pada kadar yang berlebih akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal (Cavaillon, 2003). Saat fungsi dan jumlah sel imun kurang memadai, maka diperlukan pemberian imunomodulator sebagai upaya untuk meregulasi sistem imun tubuh. Imunomodulator merupakan cara untuk meningkatkan atau menghambat sistem imun tubuh dengan menggunakan bahan-bahan yang dapat meregulasi kerja sistem imun (Baratawidjaja dan Iris, 2012). Imunomodulator digunakan sebagai terapi tambahan untuk penyakit-penyakit yang disebabkan oleh organisme patogen, membantu meringankan gejala penyakit infeksi serta mempercepat

proses penyembuhan (Baratawidjaja dan Iris, 2012). Salah satu tanaman yang berperan sebagai imunomodulator adalah kopi.

Kopi merupakan komoditas utama dalam sektor perkebunan Indonesia (Chandra *et al.*, 2013). Jember merupakan kota perkebunan kopi dan juga penghasil kopi terbanyak terutama jenis robusta. Saat ini terdapat dua jenis kopi robusta yang dipasarkan, yaitu *green coffee* dan *black coffee*. Buah kopi hijau mengandung kafein, senyawa fenolik, dengan asam klorogenat (Isnindar *et al.*, 2017). Namun demikian manfaat dari *green coffee* belum banyak diteliti dan dibuktikan secara ilmiah. Diketahui bahwa kandungan asam khlorogenik pada *green coffee* lebih tinggi dibandingkan *black coffee*. *Black coffee* atau *roasted coffee* adalah biji hijau yang sudah disangrai dengan tingkat panas tertentu (Rahardjo, 2012). Proses *roasting* ini membuat perubahan pada komposisi kimia dan aktivitas biologi kopi. Banyaknya komponen kimia didalam kopi seperti flavonoid, xanthine, asam khlorogenik, alkaloid, dapat berfungsi sebagai antiinflamasi, antibakteri, dan agregasi platelet (Scalbert dan Williamson, 2000; Coralie *et al.*, 2006; Natela *et al.*, 2008; Dewanti *et al.*, 2017). Diduga komponen imunomodulator ini dapat dimanfaatkan untuk mengatasi infeksi di rongga mulut.

Penelitian sebelumnya oleh Ermawati (2016) menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak biji kopi robusta efektif menurunkan derajat inflamasi pada tikus, hal ini ditunjukkan dengan ekspresi TNF- α yang lebih sedikit pada sitoplasma selnya. Kopi memiliki senyawa flavonoid dan asam khlorogenat yang diketahui berperan sebagai imunomodulator. Pada penelitian bahan alam lain, flavonoid memiliki kemampuan dalam memperbaiki sistem imun. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penulis bermaksud melakukan penelitian mengenai analisis efek seduhan biji hijau (*green coffee*) dan biji hitam (*black coffee*) kopi robusta terhadap ekspresi TNF- α *human monosit* yang dipapar *S.aureus* dengan teknik imunositokimia.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efek seduhan *green coffee* dan *black coffee* kopi robusta terhadap ekspresi TNF- α pada *human monosit* yang dipapar *S.aureus* dengan teknik imunositokimia?

1.3 Tujuan

Menganalisis efek seduhan *green coffee* dan *black coffee* kopi robusta terhadap ekspresi TNF- α pada *human monosit* yang dipapar *S.aureus* dengan teknik imunositokimia.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi kepada masyarakat bahwa seduhan *green coffee* dan *black coffee* kopi robusta memiliki efek terhadap ekspresi TNF- α yang dapat berfungsi sebagai antiinflamasi dan imunomodulator.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kopi Robusta (*Coffea robusta*)

Kopi merupakan salah satu jenis tanaman perkebunan yang sudah lama dibudidayakan dan memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Kopi (*Coffea. sp*) merupakan salah satu komoditi terbesar kedua di dunia setelah minyak mentah. Tercatat ada sekitar 60 negara penghasil kopi dan Indonesia menjadi salah satu penghasil kopi terbanyak yang menempati urutan keempat dengan total produksinya mencapai 686.763 ton (Yowanda, 2015). Kopi merupakan jenis tanaman tropis yang dapat tumbuh di mana-mana, kecuali tempat yang terlalu tinggi dengan suhu udara sangat dingin atau daerah-daerah tandus yang memang tidak cocok bagi kehidupan tanaman. Angka konsumsi kopi dunia 70% berasal dari spesies kopi arabika, 26% berasal dari spesies kopi robusta dan sisanya 4% berasal dari spesies kopi liberika (Raharjo, 2012).



Gambar 2.1 Kopi robusta A. Tumbuhan kopi robusta, B. Buah Kopi Robusta Matang (Titus dan Periera, 2005)

Kopi robusta berasal dari Kongo dan masuk ke Indonesia pada tahun 1900. Karena mempunyai sifat lebih unggul, yaitu kopi ini sangat cepat berkembang. Ada tiga jenis kopi yang berkembang di Indonesia, yaitu kopi arabika (*Coffea Arabica*), kopi robusta (*Coffea robusta*), dan kopi liberika (*Coffea liberica*). Akan

tetapi umumnya petani menanam kopi jenis robusta, sementara kopi arabika hanya ditanam berkisar 10% (Herman dalam Chamidah, 2012). Bahkan kopi robusta merupakan jenis yang mendominasi perkebunan kopi di Indonesia hingga saat ini (Gambar 2.1) (Najiyati dan Danarti, 2009).

Tanaman kopi robusta tumbuh baik di dataran rendah sampai ketinggian 1.000 m di atas permukaan laut dan daerah-daerah dengan suhu sekitar 20° C. Selain ketinggian tempat, hujan juga merupakan faktor iklim yang penting. Tanaman kopi umumnya dapat tumbuh optimum di daerah dengan curah hujan 2.000-3.000 mm/tahun. Secara umum tanaman kopi menghendaki tanah yang subur dan kaya bahan organik serta kisaran pH tanahnya adalah 4,5-6,5 (Prawitasari, 2012). Kopi jenis kopi robusta mempunyai sifat yang lebih unggul sehingga sangat cepat berkembang. Beberapa sifat penting kopi robusta antara lain:

- a. Resisten terhadap penyakit HV (penyakit karat daun)
- b. Tumbuh baik pada ketinggian 400-700 m di atas permukaan laut (dpl), tetapi masih toleran pada ketinggian kurang dari 400 mdpl, dengan temperatur 21-24°C
- c. Menghendaki daerah yang mempunyai bulan kering 3-4 bulan secara berturut turut, dengan 3-4 kali hujan kiriman.
- d. Produksi lebih tinggi daripada kopi arabica dan liberica (rata-rata ±9-13 ku kopi beras/ha/thn), dan apabila dikelola secara intensif bisa bereproduksi 20 ku/ha/thn
- e. Kualitas lebih rendah dari kopi arabica, tetapi lebih tinggi dari kopi liberica (Najiyati dan Danarti, 2009).

2.1.1 Taksonomi Kopi Robusta

Taksonomi tanaman kopi robusta secara lengkap adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Phylum</i>
Divisi	: <i>Spermathophyta</i>
Sub Divisio	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Rubiales</i>

Genus : *Coffea*

Spesies : *Coffea canephora* (Darwish, 1991 dalam Chamidah, 2012).

2.1.2 Morfologi Kopi Robusta

Tanaman ini tumbuh dengan tegak, bercabang, dan bila dibiarkan tumbuh dapat mencapai tinggi 12 m. Gambar 2.3 terlihat buah dan daun dari kopi robusta. Daunnya bulat telur dengan ujung agak meruncing. Daun tumbuh berhadapan dengan batang, cabang, dan ranting- rantingnya (Najiyati dan Danarti, 2009). Permukaan atas daun mengkilat, tepi rata, pangkal tumpul, panjang 5 – 15 cm, lebar 4,0 – 6,5 cm, pertulangan menyirip, dan berwarna hijau. Kopi robusta memiliki dua tipe pertumbuhan cabang, yaitu cabang ortotrop yang tumbuh kearah vertikal dan cabang plagiotrop yang tumbuh kearah horizontal (Najiyati dan Danarti, 2009).



Gambar 2.2 Ilustrasi penampang buah kopi (Panggabean, 2011).

Bagian dalam dari buah kopi apabila dilihat dari penampang melintang terdiri dari lapisan kulit luar, daging buah, lapisan kulit tanduk, kulit ari, dan biji seperti yang terlihat pada Gambar 2.2. Buah kopi robusta mentah berwarna hijau muda, setelah itu berubah menjadi hijau tua, lalu kuning. Buah kopi matang berwarna merah atau merah tua (Gambar 2.3). Ukuran panjang buah kopi jenis robusta 8-16 mm. Berikut ini susunan buah kopi dalam penampang melintang secara umum:

1) Lapisan paling luar disebut kulit luar buah (eksokarp).

- 2) Lapisan daging buah (mesokarp).
- 3) Lapisan kulit tanduk (endokarp).
- 4) Biji (biji masih dibungkus lagi dengan kulit ari) (Panggabean, 2011).



A

B

Gambar 2.3 Perubahan pada warna kopi. A: buah kopi muda yang warnanya hijau.
B: buah kopi tua yang warnanya merah (Panggabean, 2011)

Daging buah kopi yang sudah matang penuh mengandung lendir dan senyawa gula yang rasanya manis. Kulit tanduk buah kopi memiliki tekstur agak keras dan membungkus sepasang biji kopi. Sementara itu, kulit tanduk merupakan kulit halus yang menyelimuti masing-masing biji kopi. Bagian dalam yang terakhir dari buah kopi adalah biji kopi (*coffee bean*). Berikut ini karakteristik fisik biji kopi robusta, yaitu:

- a. Rendemen kopi robusta relatif lebih tinggi dibandingkan dengan rendemen kopi arabika (20-22%).
- b. Biji kopi agak bulat.
- c. Lengkungan biji lebih tebal dibandingkan dengan jenis arabika.
- d. Garis tengah (parit) dari atas ke bawah hampir rata.
- e. Untuk biji yang sudah diolah, tidak terdapat kulit ari di lekukan atau bagian parit (Panggabean, 2011).

2.1.3 Kandungan Biji Kopi Robusta

Kopi umumnya mengandung senyawa aktif berupa kafein, fenol, alkaloid, flavonoid, saponin, asam klorogenik, dan trigonelin. Selain senyawa aktif kopi juga memiliki kandungan air, karbohidrat, protein, lipid, dan mineral. Kandungan yang terdapat pada kopi berbeda tergantung dengan kondisi geografis tempat tumbuhnya. Kopi robusta mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, kafein, dan fenol (Yowanda, 2015).

a. *Green Coffee*

Green coffee atau kopi hijau adalah kopi yang sudah dikupas dan belum dilakukan penyangraian (Rahardjo, 2012). Buah kopi hijau mengandung kafein, senyawa fenolik, dengan asam klorogenat (Isnindar *et al.*, 2017). Asam klorogenat termasuk beberapa kelompok isomer seperti asam caffeoylquinic, asam dicaffeoylquinic dan asam feruloylquinic. Asam-asam itu penting untuk pembentukan pigmen, rasa dan rasa minuman kopi. Kopi adalah sumber utama asam klorogenik dalam diet manusia dan ada laporan yang menunjukkan aktivitas antioksidan dari asam klorogenik secara *in vitro* (Gouvêa *et al.*, 2005). Menurut sebuah penelitian yang diterbitkan pada bulan Maret 2006 di BMC Complementary and Alternative Medicine, suplemen harian ekstrak biji kopi hijau dapat mengurangi lemak tubuh dan berat badan, serta komposisi lemak di hati pada tikus. Selain fungsinya untuk menurunkan berat badan, asam klorogenat pada kopi hijau juga dapat mengurangi tekanan darah. Menurut sebuah penelitian yang diterbitkan pada tahun 2006 di Clinical and Experimental Hypertension menunjukkan bahwa pasien yang mengonsumsi 140 mg ekstrak biji kopi perhari menunjukkan penurunan tekanan darah.

Kadar kafein pada kopi hijau 2,38% (Bicho *et al.*, 2012). Kadar total asam klorogenat pada biji kopi hijau adalah 7-10%. Hasil penelitian lain menunjukkan kandungan kimia buah kopi hijau yaitu sterol (stigmasterol, sitosterol), diterpen pentasiklik (methylcafestol, cafestol, kahweol) (Kurzrock dan Speer, 2001). Alkohol diterpen, diterpen dan tripterpen ester dan seramid (González *et al.*, 2001).



Gambar 2.4 *Green Coffee Bean* (Wiranata, 2016)

b. *Black Coffee*

Black coffee atau *roasted coffee* adalah biji kopi hijau yang sudah disangrai dengan tingkat panas tertentu (Rahardjo, 2012). Selama *roasting*, biji-biji dipanaskan hingga suhu 200-240 °C selama 10-15 menit tergantung derajat *roasting* yang diminta, dimana umumnya dievaluasi dari berat sebagian cuplikan yang diuji secara termal. Proses *roasting* menghasilkan perubahan rasa dan aroma. Hal ini membuat perubahan pada komposisi kimia dan aktivitas biologi kopi, sesuai dengan perubahan secara alami yang berlangsung pada senyawa dalam kopi hijau dan generasi senyawa turunan dari reaksi Maillard, karamelisasi karbohidrat dan pirolisis senyawa organik. Pada proses *roasting*, banyak senyawa polifenol yang rusak. Diantara senyawa polifenol itu adalah asam klorogenat, asam kafeat dan asam ferulat (Yaqin dan Nurmilawati, 2015).



Gambar 2.5 *Black Coffee Bean* (Wiranata, 2016)

Kandungan protein biji kopi Robusta 11%-13% atau 10-13%, kadar kafein 2,2%; minyak atsiri 10% - 16%; Asam klorogenik 5,7%-8,6% ; Flavonoid 10,09 μ /g; Kondensasi tannin 3,1; Fenol 27,04 μ /g; selulosa 22% - 27%; Tanin 3,1% (Yowanda, 2015).

Tabel 2.1 Komposisi biji kopi arabika dan robusta sebelum dan sesudah disangrai (% bobot kering).

Komponen	Kopi beras/ <i>green</i> arabika	Kopi arabika sangrai	Kopi beras/ <i>green</i> robusta	Kopi robusta sangrai
Mineral	3,0-4,2	3,5-4,5	4,0-4,5	4,6-5,0
Kafein	0,9-1,2	1,0	1,6-2,4	2,0
Trigonelline	1,0-1,2	0,5-1,0	0,6-0,75	0,3-0,6
Lemak	12,0-18,0	14,5-20,0	9,0-13,0	11,0-16,0
Total	5,5-8,0	1,2-2,3	7,0-10,0	3,9-.,6
Chlorogenic Acid				
Asam Alifatis	1,5-2,0	1,0-1,5	1,5-1,2	1,0-1,5
Oligosakarida	6,0-8,0	0-3,5	5,0-7,0	0-3,5
Total	50,0-55,0	24,0-39,0	37,0-47,0	-
Polisakarida				
Leucine-	-	-	0,475	0,366
Isoleucine				
Valine	-	-	0,085	0,063
Tyrosine	-	-	0,294	0,168
Arginin	-	-	0,059	0,026
Methionin	-	-	0,117	0,92
Prolin	-	-	0,059	0,043
Phenylalanin	-	-	0,454	0,471
Protein	11,0-13,0	13,0-15,0	-	13,0-15,0
Humic acids	-	16,0-17,0	-	16,0-17,0

Sumber: Israyanti, 2012.

2.2.4 Manfaat Kopi Robusta

Menurut Dr. J. Murdoch Ritchie dalam *The Pharmacological Basis of Therapeutic*, kafein yang terkandung dalam 1-2 cangkir kopi dapat meningkatkan detak jantung, menambah kecepatan berpikir dan inspirasi, menyembuhkan rasa kantuk dan kelelahan, peningkatan sensor stimuli dan reaksi motorik, melebarkan pembuluh darah, mendorong aliran sekresi cairan maupun sekresi padat dari dalam tubuh, sehingga badan terasa lebih segar (Ramanaviciene *et al.*, 2003). Jumlah yang tepat berbeda untuk setiap orang dan efek kafein pada tiap orang berbeda. Secara umum mengonsumsi 2 sampai 4 cangkir kopi setiap hari memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Kafein banyak memiliki manfaat dan telah banyak digunakan dalam bidang obat-obatan dalam dunia medis. Kafein berfungsi untuk merangsang aktivitas susunan saraf dan meningkatkan kerja jantung sehingga jika dikonsumsi dalam jumlah berlebihan akan bersifat racun dengan menghambat mekanisme susunan saraf manusia. Kafein didalam kopi Robusta komposisinya 1,6-2,4%, memiliki peran penting dalam pengembangan pertahanan tubuh melawan bakteri dengan meningkatkan konsentrasi beberapa sel imunokompeten dan memperkuat aktivitas lisozim. Kandungan asam klorogenik dan asam kafein yang merupakan asam organik non-volatil mampu mencegah pertumbuhan bakteri Gram positif dan negatif, senyawa antibakteri tersebut bekerja dengan cara masuk ke dalam sel dan merusak struktur dinding sel bakteri (Ramanaviciene *et al.*, 2003).

Polifenol adalah kelompok zat kimia yang ditemukan pada tumbuhan. Zat ini memiliki tanda khas yakni memiliki banyak gugus fenol dalam molekulnya. Polifenol memiliki fungsi sebagai antiinflamasi yang telah dibuktikan baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Polifenol memiliki 3 sub kelas antara lain: flavonoid, asam fenolik, dan polifenol lainnya (non flavonoid). Asam klorogenat adalah salah satu bentuk polifenol (Hattenschwiler dan Vitousek, 2000).

Flavonoid dilaporkan menunjukkan kemampuan aktifitas anti-inflamasi, *oestrogenic*, enzim *inhibition*, antimikroba, antialergi, antioksidan, dan aktifitas sitotoksis antitumor. Ekstrak flavonoid dari tanaman ini telah banyak digunakan dalam penelitian efek terhadap berbagai bakteri secara *in vitro*. Flavonoid

memiliki mekanisme antibakteri dengan berbagai aktifitas, diantaranya dengan menghambat sintesis dari asam nukleat bakteri, menghambat fungsi membran sitoplasmik bakteri, dan menghambat metabolisme energi bakteri (Gunawan dan Mulyani, 2004).

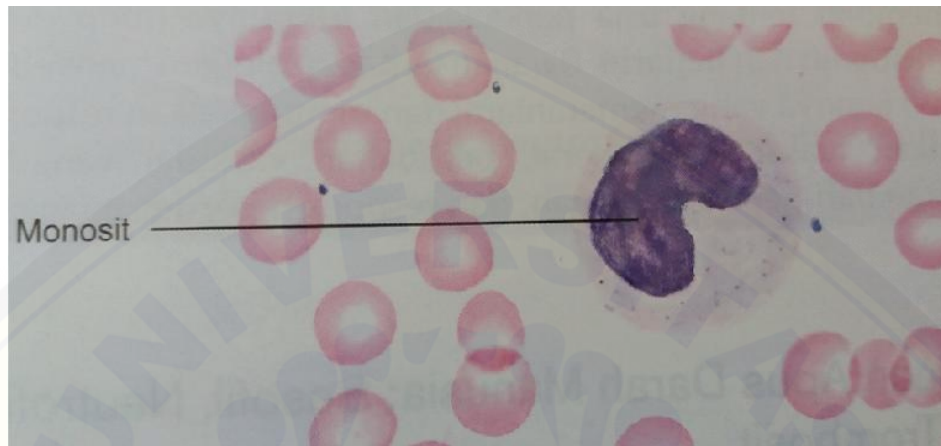
Polifenol juga berfungsi sebagai imunomodulator. Imunomodulator adalah substansi yang dapat memodulasi fungsi dan aktivitas sistem imun. Imunomodulator dibagi menjadi 3 kelompok: i) imunostimulator, berfungsi untuk meningkatkan fungsi dan aktivitas sistem imun, ii) imunoregulator, artinya dapat meregulasi sistem imun, dan iii) immunosupresor yang dapat menghambat atau menekan aktivitas sistem imun. Kebanyakan tanaman obat yang telah diteliti membuktikan adanya kerja imunostimulator, sedangkan untuk immunosupresor masih jarang dijumpai. Polifenol disini berperan sebagai imunostimulator untuk menekan atau mengurangi infeksi virus dan bakteri intraseluler (Block dan Mead, 2003).

2.3 Monosit pada *Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (HPBMC)*

Human peripheral blood mononuclear cell merupakan sel-sel darah dalam sistem kekebalan tubuh yang berperan penting untuk melawan infeksi dan beradaptasi dengan benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Sel-sel darah ini terdiri atas setiap sel darah yang memiliki inti bulat seperti limfosit, monosit atau makrofag. Sel-sel darah ini dapat diekstraksi dari keseluruhan darah manusia. HPBMC banyak digunakan dalam penelitian dan aplikasi toksikologi (Pourahmad dan Salimi, 2015). HPBMC terdiri dari limfosit dan monosit, pada perkembangannya monosit akan berubah menjadi makrofag. Limfosit (sel T dan sel B) dan makrofag memegang peranan penting dalam imunitas, makrofag akan menelan zat asing secara fagositosis (Sloane, 2004).

Monosit merupakan salah satu leukosit dengan tipe agranular yang berasal dari sum-sum tulang belakang. Monosit merupakan sel darah putih yang paling besar. Intinya berbentuk lonjong atau mirip ginjal tetapi tanpa lobus. Sitoplasma yang cukup banyak terpulas biru pucat dan sering mengandung granula merah jambu (Underwood, 2000). Pada perjalanan respon inflamasi akut, monosit mulai

bermigrasi dalam waktu yang kira-kira sama dengan neutrofil, tetapi jumlahnya jauh lebih sedikit dan kecepatannya jauh lebih lambat. Oleh karena itu pada awal respon inflamasi, jumlah sel darah putih relatif sedikit (Corwin, 2009).



Gambar 2.6 Monosit (Eroschenko, 2010)

Monosit mampu mensintesis berbagai enzim interseluler tetapi tidak bersifat fagositik. Toksin bakteri dapat memicu respon imun setelah mengikat TLR4 atau TLR 2 pada permukaan monosit. Hal ini akan menyebabkan pengaktifan dari *nuclear factor kappa-B* (NF- κ B) yang nantinya akan memicu produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α (Fournier dan Philpott, 2005).

Monosit berkembang matang menjadi makrofag setelah beberapa jam berada di jaringan. Makrofag adalah sel besar yang bergerak aktif dan merespon terhadap rangsangan kemotaktik. Makrofag bersifat fagositik aktif dan mampu membunuh serta mencerna berbagai agen inflamasi (Price, 2005; Corwin, 2009).

2.4 Inflamasi

Inflamasi merupakan satu dari respon utama sistem pertahanan tubuh dari suatu organisme, infeksi dan iritasi. Dasar dari inflamasi yaitu melindungi, menetralkan, memperbaiki kerusakan dikarenakan oleh patogen, dan mengaktifkan proses perbaikan jaringan yang diperlukan serta mengembalikan keseimbangan fungsi jaringan yang rusak atau terkena infeksi. Perubahan pada inflamasi secara metabolisme berpotensi merusak (Calder *et al.*, 2013).

Inflamasi dapat diklasifikasikan menjadi akut dan kronis. Inflamasi akut adalah peradangan yang berlangsung relatif singkat, durasinya beberapa menit sampai beberapa hari terhadap agen infeksi. Inflamasi akut dapat berkembang menjadi suatu inflamasi kronis bila terkena paparan secara terus menerus pada agen pemicu. Inflamasi kronis biasanya berlangsung selama berminggu-minggu berkepanjangan bahkan bisa tahunan. Radang kronis bisa disebabkan karena perkembangan radang akut, jika agen penyebab injuri masih tetap ada (Calder *et al.*, 2013).

Respon antiinflamasi meliputi kerusakan mikrovaskular, meningkatnya permeabilitas kapiler dan migrasi leukosit ke jaringan radang. Gejala proses inflamasi yang sudah dikenal ialah:

1. Kemerahan (rubor)

Terjadinya warna kemerahan ini karena arteri yang mengedarkan darah ke daerah tersebut berdilatasi sehingga terjadi peningkatan aliran darah ke tempat cedera (Corwin, 2009).

2. Rasa panas (kalor)

Rasa panas dan warna kemerahan terjadi secara bersamaan. Dimana rasa panas disebabkan karena jumlah darah lebih banyak di tempat radang daripada di daerah lain di sekitar radang dan juga aktivitas sel-sel disekitar radang meningkat (Wilmana dan Gan, 2007).

3. Rasa sakit (dolor)

Rasa sakit akibat radang dapat disebabkan beberapa hal yang pertama karena adanya pembengkakan jaringan sehingga terjadi peningkatan tekanan lokal yang dapat menimbulkan rasa nyeri, yang kedua karena adanya pengeluaran zat – zat kimia atau mediator nyeri seperti prostaglandin, histamin, bradikinin yang dapat merangsang saraf – saraf perifer di sekitar radang sehingga dirasakan nyeri (Wilmana dan Gan, 2007).

4. Pembengkakan (tumor)

Gejala paling nyata pada peradangan adalah pembengkakan yang disebabkan oleh terjadinya peningkatan permeabilitas kapiler, adanya

peningkatan aliran darah dan cairan ke jaringan yang mengalami cedera sehingga terjadi ekstrasvasasi yaitu keluarnya protein plasma dari pembuluh darah ke ruang interstitium (Corwin, 2009).

5. *Fungsiolaesa*

Fungsiolaesa merupakan gangguan fungsi dari jaringan yang terkena inflamasi dan sekitarnya akibat proses fagositosis yang mengeluarkan metabolit-metabolit toksik dan protease yang akan menimbulkan kerusakan jaringan (Wilmana dan Gan, 2007).

Selama berlangsungnya respon inflamasi banyak mediator kimiawi yang dilepaskan secara lokal antara lain histamin, faktor kemotaktik, bradikinin, leukotrien dan prostaglandin (PG). Histamin menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler pada awal peradangan. Selama peradangan sel-sel endotel kapiler disekitarnya yang dalam keadaan normal tersusun rapat mulai saling menjauh satu sama lain sehingga permeabilitas meningkat. Sel-sel darah merah dan cairan keluar dari kapiler dan masuk dalam ruang interstinum. Leukosit akan menuju tempat inflamasi dan melakukan fungsinya yaitu fagositosis agen penyebab (Calder *et al.*, 2013).

Proses fagositosis merupakan bagian dari respon imun non spesifik dan yang memperantarai pertahanan host terhadap benda asing. Sel yang berperan dalam mencerna partikel atau substansi cairan disebut sel fagositik, terdiri dari sel fagosit *mononuclear* dan sel fagosit *polu morphonuclear* (Guyton, dalam Asti, 2015). Proses membunuh dan mencerna terjadi dalam dua jalur yaitu jalur non-oksitatif (tidak tergantung oksigen) dan jalur oksitatif (tergantung oksigen). Pada mekanisme jalur non- oksitatif, fagosom masuk kedalam sitoplasma dan akan mengalami fusi dengan lisosom sehingga membentuk fagolisosom. Setelah itu terjadi penurunan pH dalam fagolisosom sehingga terjadi pembebasan enzim lisosom yang mampu menyerang dinding sel bakteri dan membunuhnya. Sedangkan pada jalur oksitatif, sel fagosit akan distimulasi untuk mengeluarkan oksidan seperti superoksida (O_2^-) dan hydrogen peroksida (H_2O_2) dari oksigen, myeloperoksidase dan NADPH atau NADH yang dapat beinteraksi kemudian menghasilkan metabolit oksigen toksik, sehingga dapat digunakan untuk

membunuh pathogen. Selanjutnya agen infeksius yang sudah mati tersebut akan dikeluarkan dari sel fagosit (Hoffbrand dan Pettit 1996; Surati, 2014; Asti, 2015)

Jalur oksidasi yang berlebih berpotensi menimbulkan stress oksidatif, yaitu keadaan dimana tingkat oksigen reaktif intermediate (ROI) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen. Keadaan ini mengakibatkan kelebihan radikal bebas, yang akan bereaksi dengan lemak, protein, dan asam nukleat seluler. Kerusakan yang terjadi pada sel tersebut mengakibatkan sel mengalami lisis (Arief, 2007). Stress oksidatif dapat meningkatkan aktivasi NF-KB, dan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi (Glasser dan Glasser, 2005). Aktivitas NF-KB meningkat 34% dalam waktu 10 menit setelah adanya stressor pada tes laboratorium. Peningkatan stres terkait norepinephrin memprovokasi aktivasi NFkB, satu rute langsung dari sistem endokrin hingga inflamasi (Bierhaus *et al.*, 2003). Perubahan terkait stres ini pada aktivitas NF-KB konsisten dengan bukti lain bahwa stres dapat meningkatkan ekspresi gen proinflamasi pada sel mononuclear darah perifer (PBMcs) (Miller *et al.*, 2008).

2.5 TNF- α (*Tumor Necrosis Factor Alpha*)

Respon inflamasi dicirikan oleh pengaturan peran antara efek pro-inflamasi (memulai sinyal) dan anti inflamasi (menghentikan sinyal) yang dimediasi oleh sejumlah sitokin. Sitokin merupakan messenger kimiawi dan termasuk diantaranya adalah tumor necrosis factors (TNF), interleukin, interferon, kemokin, dan factor pertumbuhan. Pada umumnya sitokin – sitokin digolongkan menjadi: Sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1, interferon- α (IFN- α), IL-12, IL-18 dan granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) yang memperkuat respon inflamasi dengan meningkatkan produksi IL-1 dan TNF oleh makrofag. Sitokin anti-inflamasi seperti IL-4, IL-10, IL-13, IFN- α dan transforming growth factor- β (TGF- β) (Hartanto, 2009). Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) adalah sitokin pleiotropic yang dihasilkan oleh berbagai jenis sel dalam tubuh. TNF- α bekerja melalui dua reseptor transmembran yaitu: reseptor TNF 1 (TNFR1), dan reseptor TNF 2 (TNFR2), dan mengatur sejumlah fungsi sel

penting termasuk proliferasi sel, kelangsungan hidup, diferensiasi, dan apoptosis (Fournier dan Philpott, 2005).

Produksi reseptor sinyal TNF α telah dikaitkan dengan patogenesis beberapa penyakit, termasuk rheumatoid arthritis, penyakit Crohn, aterosklerosis, psoriasis, sepsis, diabetes, dan obesitas. TNF- α adalah agen pro-inflamasi yang kuat yang mengatur banyak aspek fungsi makrofag. Makrofag adalah produsen utama TNF- α yang merupakan sel imun bawaan yang membentuk garis pertahanan dan sangat responsif terhadap TNF- α . TNF- α bereaksi saat trauma, infeksi, atau paparan Lipopolisakarida (LPS) dan terbukti menjadi salah satu mediator awal yang paling banyak pada jaringan yang meradang. Lipopolisakarida (LPS) diaktifkan makrofag dan mensekresikan sitokin pro-inflamasi, termasuk tumor necrosis factor (TNF) untuk memperoleh respon imun bawaan. Sekresi sitokin ini juga merupakan faktor utama dalam penyakit inflamasi kronis. TNF- α berperan penting dalam merancang kaskade sitokin dalam banyak penyakit inflamasi dan berperan sebagai master-regulator produksi sitokin inflamasi (Parameswaran dan Patial, 2010).

TNF- α diatur oleh beberapa faktor termasuk faktor nuklir kappa B (Nf κ B) dan faktor nuklir mengaktifkan sel T (NF-AT) (Boehm *et al.*, 1997). Sebagian besar TNF- α dihasilkan oleh monosit, makrofag, limfosit T dan limfosit B (Adhi *et al.*, 2016). Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar biasanya dapat menimbulkan reaksi sistemik. TNF- α pada kadar yang tepat akan memberikan perlindungan dan penyembuhan, sedang pada kadar akan menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal (Irawati, 2014) Lipopolisakarida merupakan rangsangan poten terhadap makrofag untuk menyekresi TNF. IFN- γ yang diproduksi oleh sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain meningkatkan sintesis TNF- α (Baratawidjaja dan Iris, 2012).

2.6 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus berasal dari perkataan *staphyle* yang berarti kelompok buah anggur dan *coccus* yang berarti benih bulat. Bakteri ini sering ditemukan sebagai bakteri flora normal pada kulit dan selaput lendir pada manusia. Bakteri

ini dapat menjadi penyebab infeksi baik pada manusia maupun hewan (Syahrurachman *et al.*, 2010).

2.6.1 Taksonomi *S.aureus*

Berdasarkan sistem hierarki dalam klasifikasi organisme, taksonomi *S. aureus* yaitu:

Ordo : *Eubacteriales*

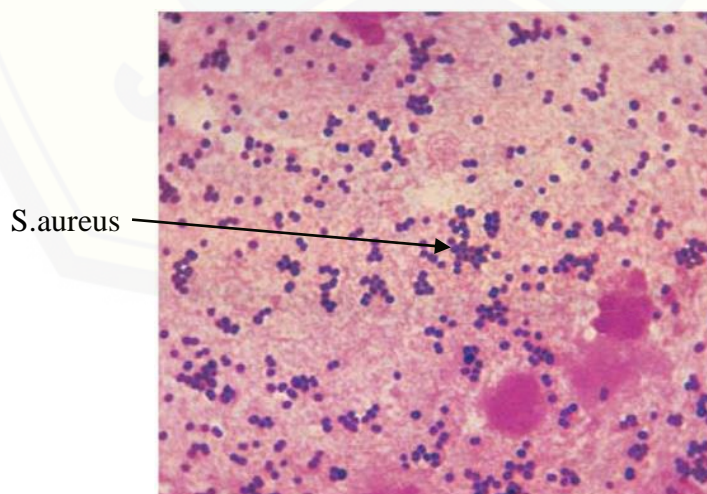
Family : *Micrococcaceae*

Genus : *Staphylococcus*

Species : *S.aureus* (Syahrurachman *et al.*, 2010)

2.6.2 Morfologi *S.aureus*

S. aureus merupakan bakteri Gram positif, tidak berspora dan tidak bergerak (Gambar 2.7) Bakteri ini berbentuk sferis, bila menggerombol dalam susunan yang tidak teratur. Diameter bakteri antara 0,8-1,0 mikron. Pada sediaan langsung yang berasal dari nanah dapat terlihat sendiri, berpasangan, menggerombol dan bahkan dapat tersusun seperti rantai pendek. Susunan gerombolan yang tidak teratur biasanya ditemukan pada sediaan yang dibuat dari perbenihan padat, sedangkan dari perbenihan kaldu biasanya ditemukan tersendiri atau tersusun sebagai rantai pendek (Syahrurachman *et al.*, 2010).



Gambar 2.7 Gambaran mikroskopis *S.aureus* dengan pewarnaan Gram pada perbesaran 1000x (Kayser *et al.*, 2005).

2.6.3 Pertumbuhan dan Pembedahan *S.aureus*

S. aureus tumbuh dengan baik dalam kaldu biasa pada suhu 37°C. Batas-batas suhu untuk pertumbuhannya ialah 15°C dan 40°C, sedangkan suhu pertumbuhan optimum ialah 35°C. Pertumbuhan terbaik dan khas ialah pada suasana aerob; bakteri ini pun bersifat anaerob fakultatif dan dapat tumbuh dalam udara yang hanya mengandung hidrogen dan pH optimum untuk pertumbuhan ialah 7,4. Pada lempeng agar, koloninya berbentuk bulat, diameter 1-2 mm, cembung, mengkilat dan konsistensinya lunak. Warna khas ialah kuning keemasan, hanya intensitas warnanya dapat bervariasi. Pada lempeng agar darah umumnya koloni lebih besar dan pada varietas tertentu koloninya dikelilingi oleh zona hemolisis (Syahrurachman *et al.*, 2010; Amanati, 2014).

Koloni yang masih sangat muda tidak berwarna, tetapi dalam pertumbuhannya terbentuk pigmen yang larut dalam alkohol, eter, khloroform dan benzol. Pigmen ini termasuk dalam golongan lipokrom dan akan tetap dalam koloni, tidak meresap ke dalam pembedahan, tetapi larut dalam eksudat jaringan sehingga nanah berwarna sedikit kuning keemasan yang dapat merupakan petunjuk tentang adanya infeksi oleh bakteri ini (Syahrurachman *et al.*, 2010).

2.6.4 Patogenesis dan Infeksi *S.aureus*

S.aureus merupakan sebagian dari flora normal pada kulit manusia, saluran pernapasan dan saluran pencernaan makanan. Pada 6,6% dari bayi yang berumur 1 hari telah dapat ditemukan *Staphylococcus* di hidungnya, 50% pada umur 2 hari, 62% pada umur 3 hari dan 88,8% pada umur 4-8 hari. Bakteri ini juga dapat ditemukan di udara dan lingkungan di sekitar kita (Syahrurachman *et al.*, 2010).

S. aureus dapat menjadi patogen apabila dipengaruhi oleh faktor predisposisi seperti perubahan kuantitas mikroorganisme menjadi tidak seimbang dan penurunan daya tahan tubuh *host*. *S. aureus* bersifat invasif, penyebab hemolisis, membentuk koagulasi, mencairkan gelatin, membentuk pigmen kuning emas dan meragi manitol. Selain itu bakteri ini dapat pula menyebabkan terjadinya sistitis dan pielitis, bahkan dapat pula menyebabkan terjadinya

septikemia, endokarditis, meningitis, abses serebri, sepsis puerpuralis, trombosis sinus kavernosus dan orbitalis, osteomielitis dan pneumonia (Syahrurachman *et al.*, 2010). Beberapa penyakit dalam rongga mulut dan sekitarnya yang dapat disebabkan oleh *S. aureus* yaitu abses, gingivitis, *angular cheilitis*, parotitis, *staphylococcal mucositis* dan *denture stomatitis* (Smith *et al.*, 2011).

S. aureus dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya berkembangbiak dan menyebar luas dalam jaringan dan melalui pembentukan berbagai zat ekstraseluler. Beberapa zat ini adalah enzim, sedangkan yang lain diduga toksin. *S.aureus* mempunyai protein A yang merupakan protein permukaan dinding sel yang dapat menghindari proses fagositosis. Proses ini dimulai dari berikatannya protein A dengan reseptor Fc IgG. IgG yang menyelubungi sel bakteri akan menimbulkan kesalahan pengenalan oleh neutrofil (Dinata, 2016). Dinding sel *S.aureus* terdiri atas peptidoglikan, asam lipoteikoat dan toksin lainnya. Patogenesis *S.aureus* merupakan efek gabungan faktor-faktor ekstraseluler dan toksin-toksin yang bersifat invasisif serta meliputi skala yang luas. Selama infeksi *S.aureus* jumlah leukosit akan meningkat, leukosit polimorfonuklear dan monosit akan membunuh bakteri yang masuk ke jaringan (Jawetz *et al.*, 2007).

2.6.5 Respon Imun Terhadap *S.aureus*

Respon imun non spesifik akan berperan saat pertamakali terjadi paparan dari *S.aureus*. Sel yang berperan adalah neutrofil, monosit dan makrofag pada jaringan. Saat ada paparan dari bakteri ini akan terjadi peningkatan permeabilitas kapiler. Sel-sel darah merah dan cairan keluar dari kapiler dan masuk dalam ruang interstinum, hal ini menyebabkan pembengkakan (turgor), kemerahan (rubor) karena peningkatan aliran darah ke daerah peradangan, serta rasa nyeri (dolor) selama peradangan yang disebabkan oleh bradikinin dan panas (kalor) akibat peningkatan aliran darah (Corwin, 2009).

Selama berlangsungnya respon inflamasi banyak mediator kimiawi yang dilepaskan secara lokal antara lain histamin, faktor kemotaktik, bradikinin, leukotrien dan prostaglandin (PG). Histamin menyebabkan peningkatan

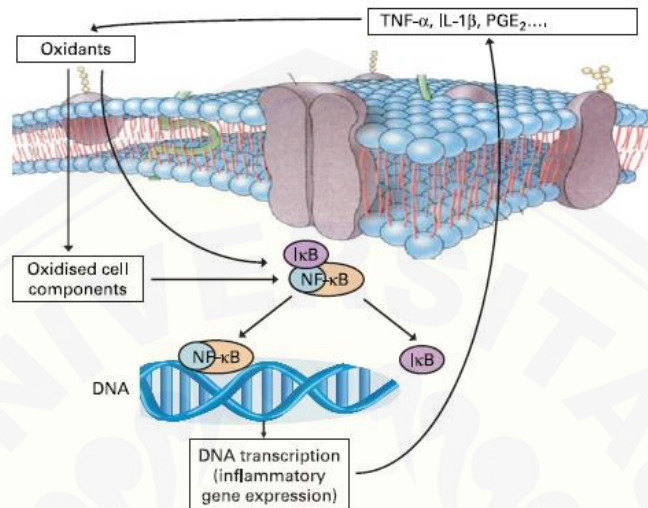
permeabilitas kapiler pada awal peradangan. Selama peradangan sel-sel endotel kapiler disekitarnya yang dalam keadaan normal tersusun rapat mulai saling menjauh satu sama lain sehingga permeabilitas meningkat. Sel-sel darah merah dan cairan keluar dari kapiler dan masuk dalam ruang interstinum. Leukosit akan menuju tempat inflamasi dan melakukan fungsinya yaitu fagositosis agen penyebab (Calder *et al.*, 2013).

Proses fagositosis merupakan bagian dari respon imun non spesifik dan yang memperantarai pertahanan host terhadap benda asing. Sel yang berperan dalam mencerna partikel atau substansi cairan disebut sel fagositik, terdiri dari sel fagosit *mononuclear* dan sel fagosit *poly morphonuclear* (Guyton, dalam Asti, 2015). Proses membunuh dan mencerna terjadi dalam dua jalur yaitu jalur non-oksitatif (tidak tergantung oksigen) dan jalur oksitatif (tergantung oksigen). Pada mekanisme jalur non- oksitatif, fagosom masuk kedalam sitoplasma dan akan mengalami fusi dengan lisosom sehingga membentuk fagolisosom. Setelah itu terjadi penurunan pH dalam fagolisosom sehingga terjadi pembebasan enzim lisosom yang mampu menyerang dinding sel bakteri dan membunuhnya. Sedangkan pada jalur oksitatif, sel fagosit akan distimulasi untuk mengeluarkan oksidan seperti superoksida (O_2^-) dan hydrogen peroksida (H_2O_2) dari oksigen, myeloperoxidase dan NADPH atau NADH yang dapat berinteraksi kemudian menghasilkan metabolit oksigen toksik, sehingga dapat digunakan untuk membunuh pathogen. Selanjutnya agen infeksius yang sudah mati tersebut akan dikeluarkan dari sel fagosit (Hoffbrand dan Pettit, 1996; Surati, 2014; Asti, 2015)

Jalur oksidasi yang berlebih berpotensi menimbulkan stress oksitatif, yaitu keadaan dimana tingkat oksigen reaktif intermediate (ROI) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen. Keadaan ini mengakibatkan kelebihan radikal bebas, yang akan bereaksi dengan lemak, protein, dan asam nukleat seluler. Kerusakan yang terjadi pada sel tersebut mengakibatkan sel mengalami lisis (Arief, 2007).

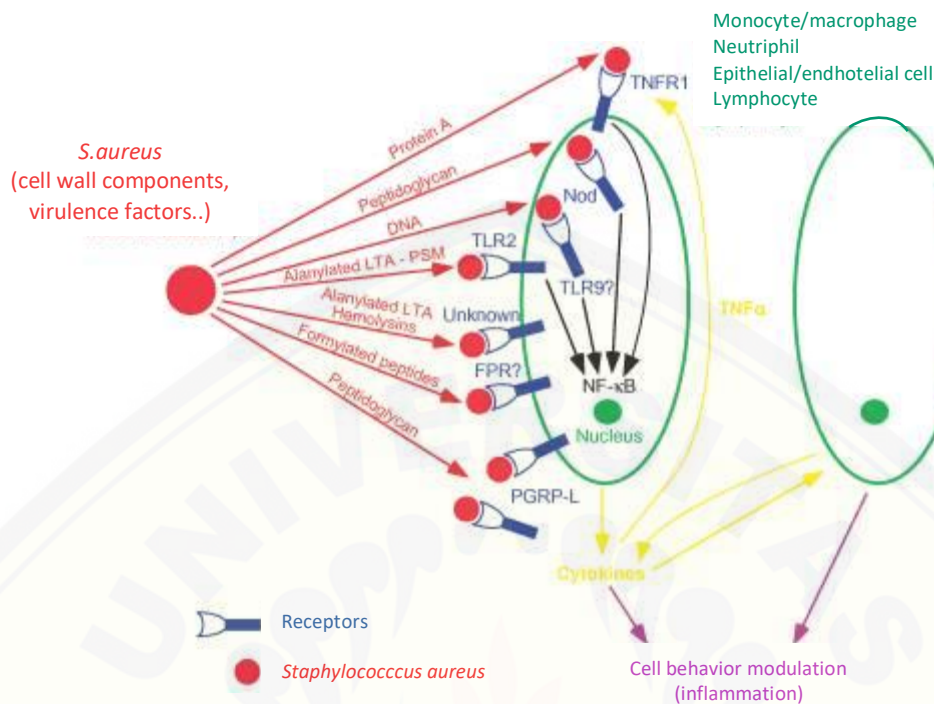
Stress oksitatif dapat meningkatkan aktivasi NF-KB, dan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi (Gambar 2.8) (Glasser dan Glasser, 2005). Aktivitas NF-Kb meningkat 34% dalam waktu 10 menit setelah adanya stressor

pada tes laboratorium. Perubahan terkait stres ini pada aktivitas NF-KB konsisten dengan bukti lain bahwa stress oksidatif dapat meningkatkan ekspresi gen proinflamasi pada sel mononuclear darah perifer (PBMcs) (Miller *et al.*, 2008).



Gambar 2.8 Interaksi antara stress oksidatif dan inflamasi (Calder *et al.*, 2009)

Monosit berperan dalam sistem imun non spesifik ini setelah neutrofil. Monosit adalah sumber utama sitokin proinflamasi. *S.aureus* akan dikenali oleh berbagai reseptor di permukaan monosit. TLR-2 akan mengenali *S.aureus* karena komponen dinding *S.aureus* yang terdiri dari peptidoglikan dan asam lipoteikoat. Telah banyak penelitian yang mengemukakan bahwa TLR-2 adalah reseptor yang mengenali peptidoglikan dan asam lipoteikoat pada *S.aureus* (Fournier dan Philpott, 2005).



Gambar 2.9 Respon Imun terhadap *S. aureus* (Fournier dan Philpott, 2005).

Setelah terjadi pengenalan oleh reseptor akan terjadi pengaktifan dari *nuclear factor kappa-B* (NF- κ B). Secara normal, NF- κ B ditemukan pada sitoplasma sebagai ikatan kompleks yang bersifat inaktif dengan protein inhibitor NF- κ B (I κ B). Berbagai stimulus dari dalam dan luar sel dapat menyebabkan aktivasi dari I κ B kinase (IKK) pada sitoplasma yang akan menyebabkan fosforilasi dan degradasi dari ikatan kompleks NF- κ B dan I κ B. Akibatnya heterodimer dari NF- κ B (p50/p65) akan mengalami translokasi dari sitoplasma ke dalam nukleus. Selanjutnya, di dalam inti sel, subunit p50/ p65 akan mengikat sejumlah promotor gen dan mengaktifkan transkripsi gen target yang terlibat dalam respons inflamasi. Akibatnya ekspresi enzim ini akan meningkat apabila mendapatkan stimulus inflamasi, sehingga akan menyebabkan peningkatan TNF- α sebagai mediator inflamasi (Fournier dan Philpott, 2005; Pietrocola *et al.*, 2011).

2.7 Imunositokimia

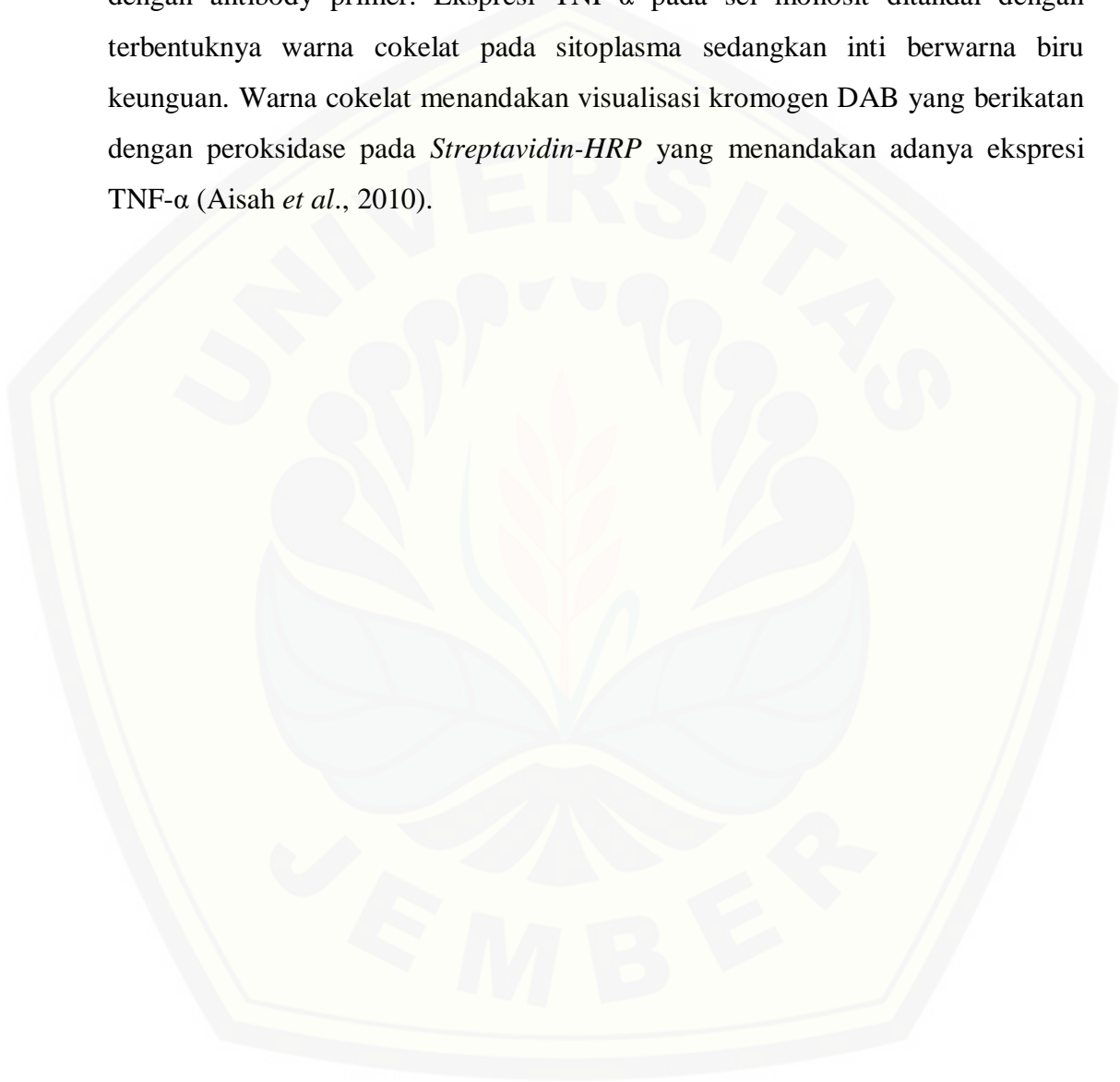
Imunositokimia merupakan sebuah pemeriksaan yang bertujuan untuk mengidentifikasi selular atau jaringan yang mengandung antigen dengan cara melihat reaksi antigen dan antibodinya. Ada dua jenis metode imunositokimia, yaitu metode langsung dan metode tidak langsung. Pada metode langsung, antibodi yang mengikat fluoresen atau zat warna langsung berikatan dengan antigen pada sel. Sedangkan pada metode tidak langsung, antigen diikat pada antibodi primer secara langsung, kemudian ditambahkan antibodi sekunder yang mengikat enzim seperti peroksidase, alkali fosfatase, atau glukosa oksidase. Antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer. Selanjutnya ditambahkan substrat kromogen yang akan diubah oleh enzim sehingga terjadi pembentukan warna (pigmen) yang akan mewarnai sel. Menggunakan kata imunositologi karena untuk memeriksakan sediaan sitologi salah satunya adalah sel darah (Bancroft dan Marlyn, 2008).

Dengan teknik Imunositokimia (imunoperoxidase imunoalkalin fosfatase) identifikasi sel-sel produk dapat di lihat, serta secara objektif dapat mengenal dan mengidentifikasi jenis dan asal sel (Lindholm *et al.*, 2005; Koss dan Leopold, 2006). Sediaan sitologi dapat diwarnai seperti pewarnaan histopatologi. Akan tetapi, terdapat kesulitan yaitu kandungan sel pada *object glass* dan fiksasi dengan cara preparasi yang konvensional. Penggunaan *coated glass* sangat berguna untuk mencegah sel-sel tidak terlepas pada saat di lakukan pencucian (Gabrijela, 2006).

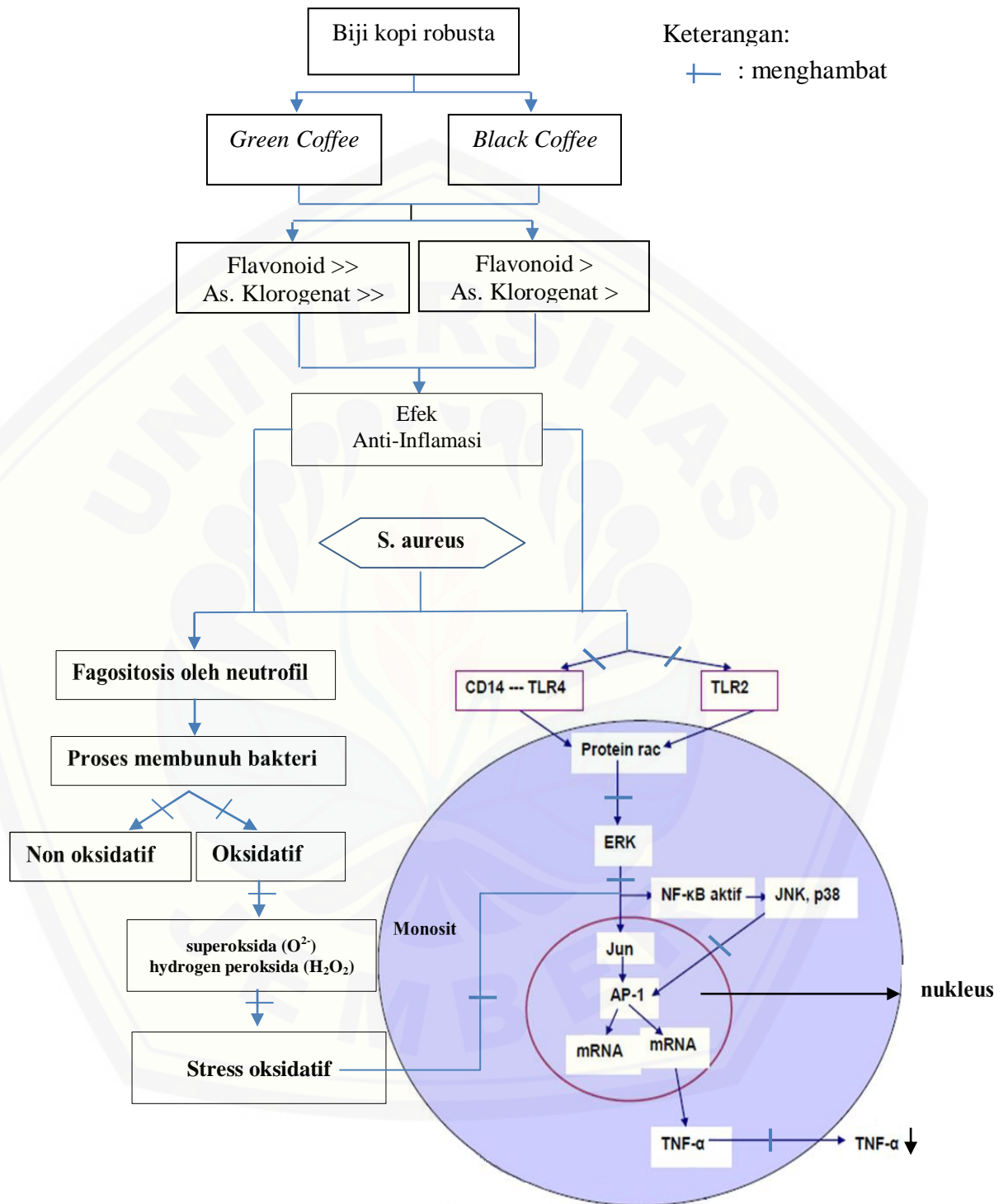
2.7.1 Teknik Imunositokimia

Terjadinya inflamasi karena adanya bakteri seperti *S.aureus* ditandai dengan terjadinya peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan TNF- α . Peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan TNF- α dapat dideteksi dengan menggunakan teknik imunositokimia (Aisah *et al.*, 2010). Teknik imunistokimia pada penelitian ini menggunakan Imunostaining Kit merk Bioss yang didalamnya terdiri dari antibodi primer *Anti-TNF- α* (Bioss), antibodi sekunder *anti Anti-TNF- α biotin conjugated* (Biotinylated/ DACO), *Streptavidin-HRP* dan *Betazoid DAB Chromogen* (Aisah *et al.*, 2010). Antigen berupa bakteri pada permukaan sel

monosit diikatkan pada antibodi primer *Anti-TNF- α* (Bioss) yang secara langsung ditetaskan pada preparat hapusan darah, kemudian ditambahkan antibodi sekunder *anti Anti-TNF- α biotin conjugated* (Biotinylated/ DACO) yang juga ditetaskan secara langsung pada preparat hapusan darah. Antibodi sekunder akan berikatan dengan antibody primer. Ekspresi TNF- α pada sel monosit ditandai dengan terbentuknya warna coklat pada sitoplasma sedangkan inti berwarna biru keunguan. Warna coklat menandakan visualisasi kromogen DAB yang berikatan dengan peroksidase pada *Streptavidin-HRP* yang menandakan adanya ekspresi TNF- α (Aisah *et al.*, 2010).



2.8 Kerangka Konseptual



Gambar 2.10 Kerangka Konsep

Penjelasan Kerangka Konsep

Kopi jenis Robusta merupakan jenis kopi yang banyak dibudidayakan di daerah Jember. Biji hitam (*black coffee*) dan biji hijau (*green coffee*) kopi robusta mengandung bahan aktif yang bermanfaat bagi manusia, salah satunya adalah flavonoid dan asam klorogenat. Flavonoid dan asam klorogenat memiliki kemampuan sebagai agen anti-inflamasi.

Selama peradangan sel-sel endotel kapiler disekitarnya yang dalam keadaan normal tersusun rapat mulai saling menjauh satu sama lain sehingga permeabilitas meningkat. Sel-sel darah merah dan cairan keluar dari kapiler dan masuk dalam ruang interstinum. Leukosit akan menuju tempat inflamasi dan melakukan fungsinya yaitu fagositosis agen penyebab (Calder *et al.*, 2013).

Proses fagositosis merupakan bagian dari respon imun non spesifik dan yang memperantarai pertahanan host terhadap benda asing. Proses membunuh dan mencerna bakteri terjadi dalam dua jalur yaitu jalur non-oksidatif (tidak tergantung oksigen) dan jalur oksidatif (tergantung oksigen). Pada jalur oksidatif, sel fagosit akan distimulasi untuk mengeluarkan oksidan seperti superoksida (O_2^-) dan hydrogen peroksida (H_2O_2) dari oksigen, myeloperoksidase dan NADPH atau NADH yang dapat berinteraksi kemudian menghasilkan metabolit oksigen toksik, sehingga dapat digunakan untuk membunuh pathogen (Hoffbrand dan Pettit 1996; Surati, 2014; Asti, 2015)

Jalur oksidasi yang berlebih berpotensi menimbulkan stress oksidatif, yaitu keadaan dimana tingkat oksigen reaktif intermediate (ROI) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen. Stress oksidatif dapat meningkatkan aktivasi NF- κ B, dan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi (Glasser dan Glasser, 2005).

S. aureus juga dapat memicu respon imun setelah mengikat TLR4/TLR2 pada permukaan monosit. Hal ini akan menyebabkan pengaktifan dari *nuclear factor kappa-B* (NF- κ B). Secara normal, NF- κ B ditemukan pada sitoplasma sebagai ikatan kompleks yang bersifat inaktif dengan protein inhibitor NF- κ B (I κ B). Berbagai stimulus dari dalam dan luar sel dapat menyebabkan aktivasi dari I κ B kinase (IKK) pada sitoplasma yang akan menyebabkan fosforilasi dan

degradasi dari ikatan kompleks NF- κ B dan I κ B. Akibatnya heterodimer dari NF- κ B (p50/p65) akan mengalami translokasi dari sitoplasma ke dalam nukleus. Selanjutnya, di dalam inti sel, subunit p50/ p65 akan mengikat sejumlah promotor gen dan mengaktifkan transkripsi gen target yang terlibat dalam respons inflamasi (Fournier dan Philpott, 2005). Akibatnya ekspresi enzim ini akan meningkat apabila mendapatkan stimulus inflamasi, sehingga akan menyebabkan peningkatan TNF- α sebagai mediator inflamasi. Jika hal ini terjadi secara terus menerus dapat menyebabkan kerusakan jaringan.

2.9 Hipotesis

Green coffee dan *black coffee* dapat mengurangi ekspresi TNF- α pada monosit yang dipapar *S. aureus*. Dengan dugaan *green coffee* lebih banyak mengurangi ekspresi TNF- α dibanding *black coffee*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris secara *in vitro*. Rancangan penelitian adalah *the post test only control group design* yang menurut Sugiyono (2010) adalah penelitian yang hanya untuk mengetahui keadaan suatu kelompok setelah diberikan perlakuan atau *treatment*. Penelitian dilakukan untuk menganalisis efek seduhan *green coffee* dan *black coffee* kopi robusta terhadap ekspresi TNF- α pada human monosit yang dipapar *S. aureus* dengan teknik imunositokimia.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus 2018 – Desember 2018 di Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut dan Laboratorium Patologi Anatomi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3 Variabel penelitian

3.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah seduhan *green coffee* dan *black coffee* kopi robusta.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah ekspresi TNF- α pada sitoplasma dan sekeliling membran monosit.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini sebagai berikut:

- a. Isolat monosit
- b. Dosis dalam perlakuan *S. aureus*
- c. Prosedur laboratoris

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 Seduhan *Green Coffee* Kopi Robusta

Green coffee adalah biji kopi robusta yang sudah dikupas dan belum dilakukan penyangraian. Seduhan biji hijau merupakan sediaan cair hasil penyeduhan bubuk *green coffee* berasal dari kopi robusta yang ditanam di perkebunan Puslit dan Kakao Jember, Jawa Timur dengan aquades mendidih (90°C). Dosis yang digunakan adalah 3 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquades mendidih (90°C) untuk kelompok perlakuan 1, 6 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquades mendidih (90°C) untuk kelompok perlakuan 2.

3.4.2 Seduhan *Black Coffee* Kopi Robusta

Black coffee atau *roasted coffee* adalah biji kopi hijau yang sudah disangrai dengan tingkat panas tertentu. Seduhan biji hijau merupakan sediaan cair hasil penyeduhan bubuk *black coffee* kopi robusta merek Sekar Arum produksi PTP XII daerah Jember Jawa Timur dengan aquades mendidih (90°C). Dosis yang digunakan adalah 3 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquades mendidih (90°C) untuk kelompok perlakuan 3, 6 gr bubuk kopi robusta dengan 200 ml aquades mendidih (90°C) untuk kelompok perlakuan 4 (Susilawati *et al.*, 2014).

3.4.3 Ekspresi TNF- α dengan Teknik Imunositokimia

Ekspresi TNF- α merupakan terbentuknya bercak berwarna cokelat pada sekeliling membran dan sitoplasma monosit setelah dilakukan uji imunositokimia. Teknik imunositokimia dilakukan dengan mengikat antigen pada permukaan sel monosit dengan antibodi primer *Anti-TNF- α* (Bioss), antibodi sekunder *Anti Anti-TNF- α biotin conjugated* (Biotinylated/ DECO) yang selanjutnya ditambahkan kromogen DAB yang berikatan dengan peroksidase pada *Streptavidin-HRP* yang nantinya akan terjadi pembentukan warna cokelat yang menandakan adanya ekspresi TNF- α . Pengamatannya dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali. Data penelitian adalah monosit yang membran dan sitoplasmanya berwarna kecoklatan.

3.4.4 Human Monosit

Human monosit adalah salah satu sel darah mononuklear yang diisolasi dari 6 ml sampel darah pendonor yang diambil dari pembuluh darah vena pada *fosaa cubiti*. Proses isolasi monosit dilakukan dengan metode *single filter* (*Lymphoprep*). Jumlah sel yang digunakan adalah 100 μ .

3.4.5 *S.aureus*

S. aureus merupakan bakteri Gram positif, berbentuk bulat, biasanya tersusun seperti anggur yang dipaparkan ke monosit pada *24-well plate* sebanyak 100 μ L tiap masing-masing well. *S. aureus* yang dipakai didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Kriteria Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel berupa isolat monosit yang diambil dari darah vena perifer orang sehat. Isolasi monosit menggunakan metode *single filter* (*Lymphoprep*). Monosit diisolasi dari 6 ml darah volunteer dengan kriteria sebagai berikut:

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

3.5.2 Pengulangan Sampel dan Pengelompokan Sampel Penelitian

Besarnya pengulangan sampel yang digunakan pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Gomez dan Gomez, 1995):

$$(r n - 1) - (n - 1) \geq v^2$$

Keterangan:

r = jumlah pengulangan

n = jumlah sampel

σ = standart deviasi (SD) penelitian sejenis

v^2 = derajat bebas galat

Maka, hasil perhitungan pengulangan sampel adalah sebagai berikut:

$$(r n - 1) - (n - 1) \geq v^2$$

$$(r n - 1) - (n - 1) \geq 10$$

$$(r(5) - 1) - (5 - 1) \geq 10$$

$$5r - 1 \geq 10 + 4$$

$$5r - 1 \geq 14$$

$$5r \geq 14$$

$$r \geq \frac{14}{5}$$

$$r \geq 2,8$$

$$r \approx 3$$

Pada penelitian ini banyaknya pengulangan sampel yang digunakan sebanyak 3 pada masing-masing kelompok. Pada penelitian yang dilakukan terdapat 6 kelompok, sehingga terdapat 18 sampel. Pengelompokan tersebut yaitu:

- a. Kelompok K : kelompok kontrol yang berisi media kultur, isolat monosit tanpa diberi seduhan kopi
- b. Kelompok P0 : kelompok yang berisi media kultur, isolat monosit dan dipapar bakteri *S. aureus*.
- c. Kelompok P1 : kelompok yang berisi media kultur, isolat monosit, diberi seduhan *green coffee* dengan dosis 3 gr bubuk kopi robusta dan 200 ml aquades dan dipapar bakteri *S. aureus*.
- d. Kelompok P2 : kelompok yang berisi media kultur, isolat monosit, diberi seduhan *green coffee* dengan dosis 6 gr bubuk kopi robusta dan 200 ml aquades dan dipapar bakteri *S. aureus*.

- e. Kelompok P3 : kelompok yang berisi media kultur, isolat monosit, diberi seduhan *black coffee* dengan dosis 3 gr bubuk kopi robusta dan 200 ml aquades dan dipapar bakteri *S. aureus*.
- f. Kelompok P4 : kelompok yang berisi media kultur, isolat monosit, diberi seduhan *black coffee* dengan dosis 6 gr bubuk kopi robusta dan 200 ml aquades dan dipapar bakteri *S. aureus*.

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat

1. Autoclave (Ependorf)
2. UV sterilizer
3. Tourniquet
4. Tabung vaculab EDTA K3 OneMed health care
5. Centrifuge (Eppendorf centrifuge 5810R)
6. Centrifuge
7. Coverslip poli L-lysine (Duran)
8. Gelas ukur
9. Incubator Shaker (LabTech, Daihan LabTech Co.,LTD.)
10. Laminar Flow Cabinet (Dwyer)
11. Microplate cell/ well plate 24 (Costas 3524)
12. Object glass
13. Oven (Binder)
14. Pipet mikro (Humapette)
15. Yellow/blue tip
16. Rak Tabung
17. Syringe 5 ml (Terumo Syringe)
18. Whatman puradisc syringe filter 0.45 μ m
19. Tabung ependorf
20. Tabung Falcon (Biologix)
21. Tabung heparin (BD Vacutainer)
22. Densicheck

23. Timbangan (*Balance boeco Germany*)

24. *Vortex*

25. *Water bath*

26. Mikroskop *inverted (Olympus)*

27. Optilab

28. Masker

29. Handscoon

3.6.2. Bahan

1. Bubuk *green coffee* kopi robusta

2. Bubuk *black coffee* kopi robusta

3. Darah vena perifer

4. Biakan *S. aureus*.

5. *Aquades steril*

6. Alkohol 70 %

7. Aluminium foil

8. *Phosphate Buffer Saline (PBS)*

9. *Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Gibco)*

10. Media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)

11. Media M199

12. *Lymphoprep*

13. *Hystopaque 1119*

14. Tisu (untuk inkubasi)

15. Reagen imunositokimia (Metanol, imunostaining kit, antibodi primer *Anti-Human TNF- α* (Bioss), antibodi sekunder *anti Anti- TNF- α biotin conjugated* (Biostinylated/ DACO)).

16. *Streptavidin-HRP*

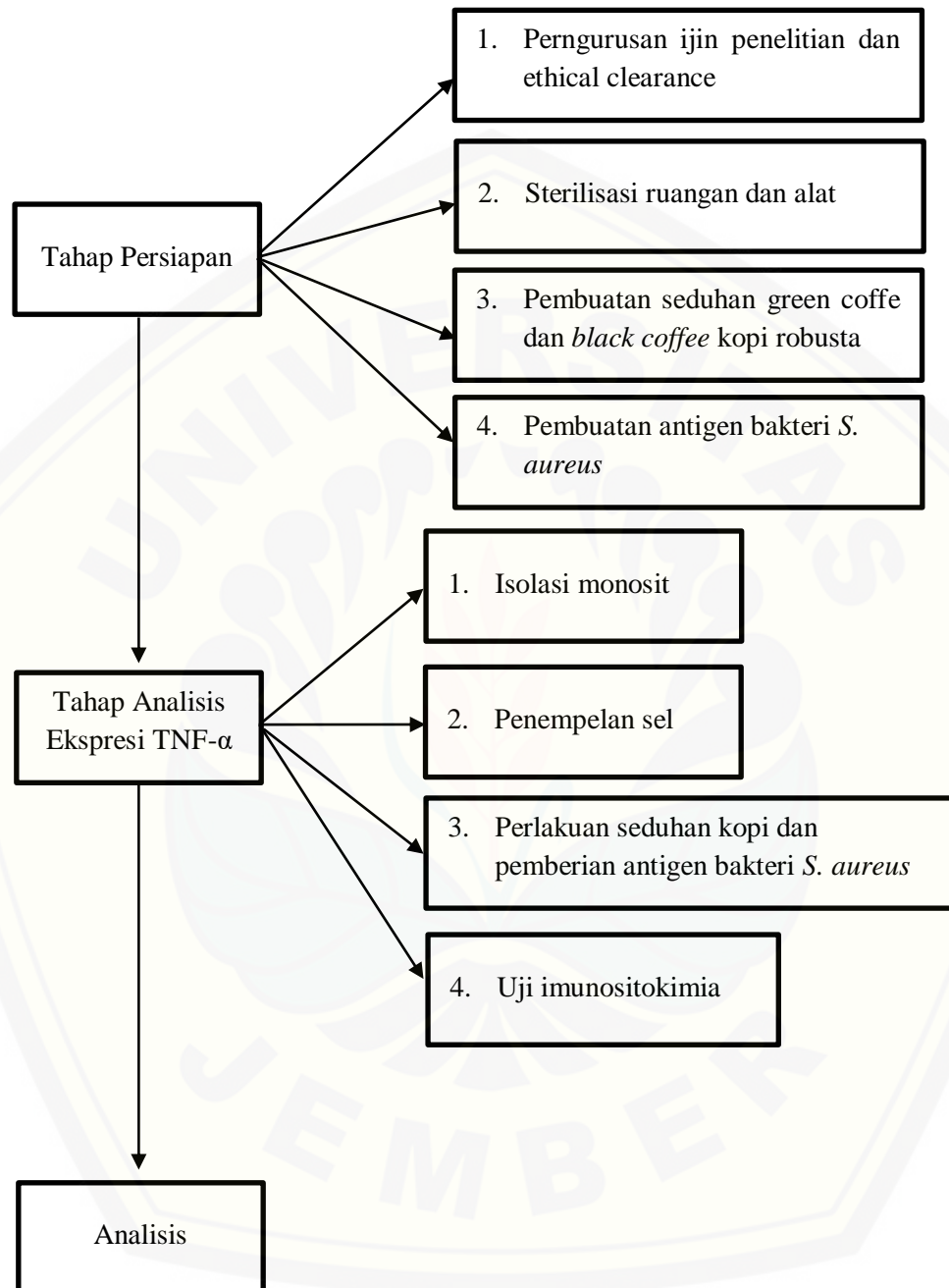
17. *DAB*

18. Cat Mayer *hematoxylin*

19. Entellan

20. Minyak emersi

3.7 Prosedur Penelitian



Gambar 3.1 Prosedur penelitian uji imunositokimia ekspresi TNF- α seduhan *green coffee* dan *black coffee* kopi robusta

3.7.1 Tahap Persiapan

a. Pengurusan Surat Izin Penelitian dan *Ethical Clearance*

Pengurusan surat izin penelitian ditujukan di Laboratorium *Bioscience* RSGM FKG Universitas Jember, bagian Biomedik FKG Universitas Jember dan *ethical clearance* diajukan kepada Komisi Etik FKG Universitas Jember sebelum dilakukan penelitian.

b. Sterilisasi Ruangan dan Alat

Sterilisasi *laminar flow cabinet* pertama dilakukan dengan membersihkan bagian dalam *laminar flow cabinet* beserta alat yang terdapat didalamnya seperti mikropipet dan rak tabung dengan menggunakan alkohol 70%, setelah itu alas dilapisi dengan aluminium foil, kaca ditutup dan ditekan tombol on power (warna merah) untuk menghidupkan UV, dan dimatikan setelah 1 jam (Syah, 2016). Untuk sterilisasi ruangan menggunakan alat *UV sterilizer* yang dimasukkan kedalam ruangan tempat penelitian, lalu dihubungkan pada stop kontak, tekan tombol power untuk menghidupkan alat. Ditunggu hingga alat mengeluarkan sinar/cahaya yang mengandung ultraviolet, dibiarkan 2-3 jam, setelah selesai kemudian dimatikan dengan cara menekan kembali tombol power. Lantai ruangan percobaan dibersihkan dengan menggunakan desinfektan (karbol) (Syah, 2016).

Untuk sterilisasi alat yang terbuat dari bahan yang tidak tahan panas disterilisasi menggunakan alkohol agar terbebas dari invasi bakteri. Khusus untuk peralatan yang terbuat dari bahan kaca dan logam seperti tabung *falcon*, tabung *ependorf*, *coverslips*, *yellow tip* dan *blue tip* yang dimasukkan ke dalam botol kaca,, gelas ukur dan lain lain, dibungkus dengan aluminium foil kemudian disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.

c. Pembuatan Seduhan *Green Coffee* dan *Black Coffee* Kopi Robusta

Prinsip proses penyeduhan adalah menuangkan air mendidih ke bubuk kopi dan merendam bubuk kopi di dalam air panas untuk mengekstrak kandungan bubuk kopi. Kopi harus ditunggu beberapa saat hingga ampas kopi mengendap seluruhnya, sebelum kopi tersebut diminum (Gardjito dan Rahadian, 2011).

Larutkan 3 gr bubuk *green coffee* kopi robusta dengan 200 ml aquades untuk kelompok perlakuan 1, larutkan 6 gr bubuk *green coffee* dengan 200 ml aquades untuk kelompok perlakuan 2, larutkan 3 gr bubuk *black coffee* dengan 200 ml aquades untuk kelompok perlakuan 3, larutkan 6 gr bubuk *black coffee* dengan 200 ml aquades untuk kelompok perlakuan 4. Setelah itu letakkan pada waterbath dengan suhu 99,9°C, selama 10 menit setelah mendidih. Setelah itu diamkan dalam suhu ruangan selama 3-4 menit. Setelah itu pindahkan ke *falcon* dan dilakukan centrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan menggunakan *whatman paradisc syringe filter 0.2µm* (Susilawati *et al.*, 2014).

d. Pembuatan RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) dan media kompleks M199

- 1) Pembuatan RPMI dari sediaan bubuk ke cair (dalam 200 ml aquades steril)

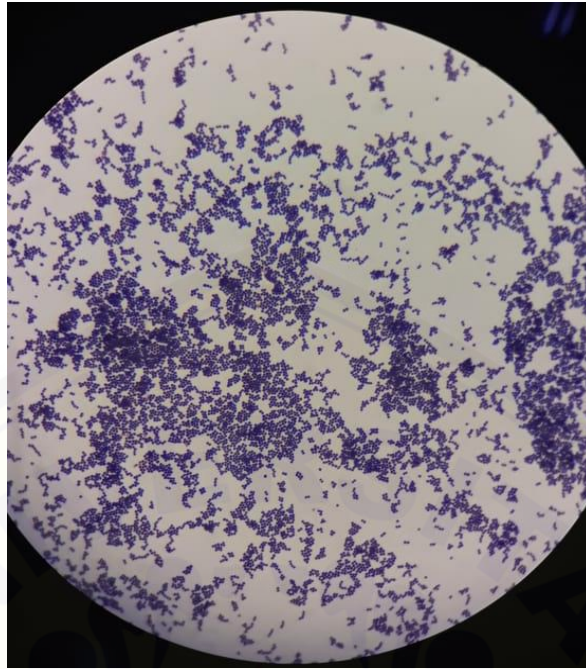
$$\frac{200}{1000} \times 10,4 = 2,08 \text{ gr (jadi, dalam 200 ml aquades steril ditambahkan 2,08 gr serbuk RPMI)}$$

- 2) Pembuatan media kompleks M199 dari sediaan bubuk ke cair (dalam 200 ml aquades steril)

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

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

BHI-B sebanyak 3,7 gr dimasukkan dalam *erlenmayer* dan ditambah 100 ml aquades steril. Dipanaskan diatas kompor listrik sampai mendidih. Kemudian ditutup kapas dan di sterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Untuk memastikan bahwa media BHI-B dalam keadaan steril, maka media tersebut dimasukkan dalam *incubator* dengan suhu 37°C selama 24 jam.



Gambar 3.2 Gambaran mikroskopis *S.aureus*

f. Prosedur pembuatan antigen

1) Pembuatan suspensi bakteri *S.aureus*

- a) Ambil 2 ml BHIB, kemudian tambahkan 3 ose koloni bakteri.
- b) Campurkan, lalu inkubasi pada suhu 37°C pada 2 x 24 jam.
- c) Amati
- d) Lakukan pengecatan Gram

2) Tahap Filter

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

3.7.2 Tahap Analisis Ekspesi TNF- α

a. Prosedur Pengambilan Sampel Darah

Sebelum pendonor diambil darahnya untuk dijadikan sampel penelitian, pendonor telah diminta mengisi dan menandatangani *informed concent*. Pada prosedur ini pendonor dijelaskan secara lisan dan tertulis mengenai keterangan ringkas penelitian, keterangan spesimen yang akan diambil, prosedur yang akan

dilakukan, perlakuan yang diterapkan, serta hak dan keterangan kerahasiaan.

Prosedur pengambilan sampel darah adalah sebagai berikut:

- 1) Pendoror diposisikan dalam posisi duduk, lengan pendonor diletakkan di atas meja, dengan telapak tangan menghadap ke atas.
 - 2) Menentukan lokasi atau tempat pembuluh darah vena yang akan dilakukan pengambilan darah.
 - 3) Posisikan lengan yang akan diambil darahnya dalam keadaan lurus. Pasangkan *torniquet* di atas lipatan siku pendonor. Minta pendonor untuk membuka-tutup telapak tangannya.
 - 4) Lakukan desinfeksi pada daerah pembuluh darah vena yang akan diambil darahnya dengan menggunakan alkohol 70%.
 - 5) Tusuk bagian vena menggunakan *syringe* 10 ml dan ambil darah secara perlahan.
 - 6) Lepas *tourniquet* setelah darah mengalir. Setelah volume darah dianggap cukup (6 ml), minta pasien membuka kepalan tangannya.
 - 7) Letakan kapas pada lokasi suntikan lalu segera lepaskan jarum *syringe*. Tekan kapas selama 3 menit dengan lengan diluruskan.
 - 8) Darah pendonor disimpan dalam *vacutee tube* yang sudah terdapat EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*) 5,4 mg (WHO, 2011).
- b. Prosedur Isolasi Monosit Metode Single Filter (*Lymphoprep*)
- 1) Sampel darah pada dua tabung EDTA masing-masing 3 ml dipindahkan pada dua tabung *falcon* masing-masing 3 ml menggunakan pipet mikro.
 - 2) Membuat diluent darah dengan cara, darah pada dua tabung *falcon* tersebut diencerkan menggunakan media *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS) dengan perbandingan 1:1, lalu dicampur sampai homogen.
 - 3) Memasukkan diluent darah tersebut pada dua tabung *falcon* lain yang sudah diisi 3 ml larutan *lymphoprep* dengan perbandingan *lymphoprep* dengan diluent darah adalah 1:2. Diluent darah tersebut dimasukkan melalui dinding tabung menggunakan pipet mikro secara perlahan, dan jangan sampai pecah.

- 4) Sentrifugasi pada kecepatan 900 g atau 2100 rpm selama 30 menit pada suhu 21°C. Hasil sentrifugasi akan terbentuk 4 lapisan (*plasma, mononuclear, lymphoprep, polymorfonuclear eritrosit*).
- 5) Mengambil lapisan ke 2 *mononuclear* pada masing-masing tabung falcon dengan menggunakan pipet mikro secara hati-hati, kemudian masukkan pada satu tabung *falcon* lain.
- 6) Mengencerkan sampel *mononuclear* menggunakan media HBSS (1:2) lalu dihomogenkan.
- 7) Sentrifugasi dengan kecepatan 600 *gradient* atau 1700 rpm selama 10 menit dengan suhu 21°C. Hasil sentrifugasi, pada tabung falcon akan terbentuk supernatan dan endapan.
- 8) Supernatant dibuang dan ditambahkan lagi 3 ml media HBSS (1:2), lalu disentrifugasi dengan kecepatan 600 g atau 1700 rpm selama 10 menit dengan suhu 21°C, lakukan tahap pencucian ini sebanyak 3 kali.
- 9) Tambahkan 1 ml HBSS pada supernatant yang didapat, homogenkan.
- 10) Tabung falcon diambil dari *centrifuge*, lalu menggunakan pipet mikro ambil 100 µL isolat monosit dan amati populasi sel perlapang pandang pada objek glass.

c. Prosedur Penempelan sel

Pertama siapkan *well plate culture 24*. Kemudian masukkan *cover slip* pada masing-masing *well plate*. Kemudian masukkan suspensi monosit sebanyak 100 µl pada *cover slip*. Kemudian diinkubasi dalam inkubator 37°C untuk penempelan sel selama 20 menit. Kemudian tambahkan 1 ml media kultur (RPMI), inkubasi 30 menit pada suhu 37°C. Amati dibawah mikroskop inverted, dengan cara menggoyang secara perlahan untuk melihat penempelan selnya. Cuci menggunakan RPMI sebanyak tiga kali, untuk melepaskan kontaminasi sel. Amati dibawah mikroskop inverted. Ganti media kultur menggunakan M 199 sebanyak 1 ml pada tiap well.

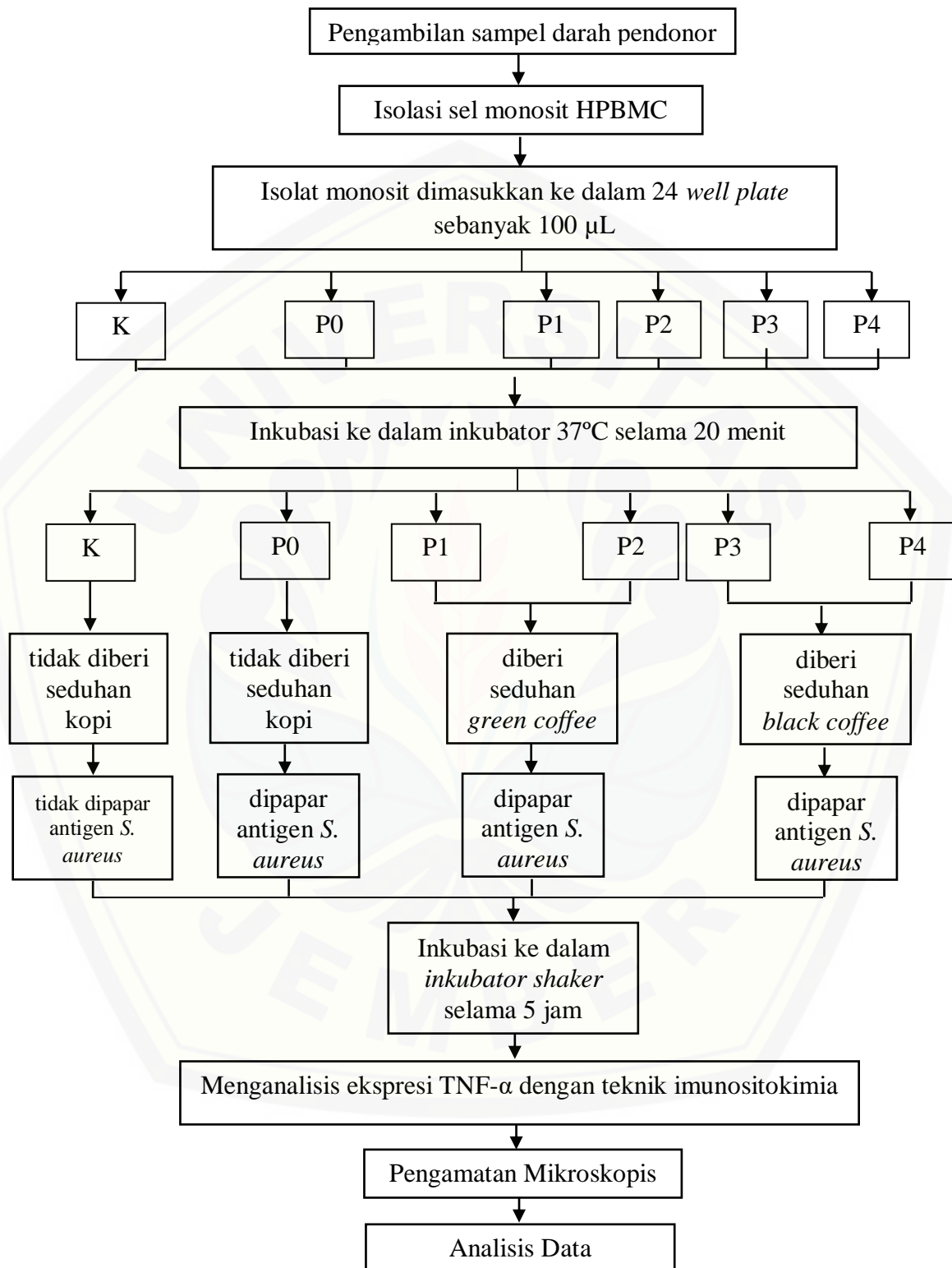
- d. Perlakuan Seduhan *Green Coffe*, *Black Coffe* dan pemaparan *S. aureus*
1. Seduhan *green coffee* dengan dosis 3 gr bubuk kopi dan 200 ml aquades mendidih (90° C) dan 6 gr bubuk kopi dan 200 ml aquades mendidih (90° C) masing–masing diambil sebanyak 100 µL dan ditambahkan ke dalam kelompok P1 dan P2. Seduhan *black coffe* dengan dosis 3 gr bubuk kopi dan 200 ml aquades mendidih (90° C) dan 6 gr bubuk kopi dan 200 ml aquades mendidih (90° C) masing–masing diambil sebanyak 100 µL dan ditambahkan ke dalam kelompok P3 dan P4. Kelompok K dan P0 tidak diberi seduhan *black coffe* dan *green coffee*.
 2. Dilanjutkan dengan melakukan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C dalam *inkubator shaker*.
 3. Kemudian lakukan pemaparan dengan antigen bakteri *S.aureus* sebanyak 100 µL pada semua kelompok, kecuali kelompok K.
 4. Inkubasi selama 5 jam dalam *inkubator shaker* suhu 37°C.
 5. Fikasasi dengan methanol absolut.
- e. Analisis Ekspresi TNF- α dengan Teknik Imunositokimia
1. Sediaan setelah difiksasi dengan metanol absolut kemudian dicuci dengan aquades selama 5 menit
 2. Sediaan direndam dalam *Peroxidase Blocking Solution* (PBS) pada suhu kamar selama 5 menit
 3. Kemudian diberi H₂O₂ selama 10 menit
 4. Cuci sediaan dengan PBS pada suhu kamar selama 5 menit sebanyak 3 kali pencucian.
 5. Sediaan diberi Superblock selama 5 menit.
 6. Sediaan direndam dalam PBS pada suhu kamar selama 5 menit
 7. Pemberian antibodi primer *Anti-TNF- α* (Bioss) ditambahkan 20 µl per preparat (disesuaikan sampai semua bagian tergenang) kemudian diinkubasikan pada nampan lembab pada suhu kamar (25°C) semalaman;
 8. Preparat selanjutnya dicuci dengan PBS selama 4 x 5 menit;

9. Diberi antibodi sekunder *anti Anti- TNF- α biotin conjugated* (Biotinylated/ DACO) sebanyak 20 μ l per preparat dan diinkubasikan pada suhu kamar (25°C) selama 15 menit kemudian dicuci dengan PBS selama 4 x 5 menit;
10. Dilakukan preparasi substrat kromogen DAB: 1 μ l *Betazoid DAB Chromogen* diencerkan dengan 600 μ l *Betazoid DAB Substrate Buffer* segera sebelum digunakan;
11. Preparat diinkubasikan dalam substrat kromogen DAB di atas sebanyak 20 μ l per preparat selama kurang dari 20 menit, kemudian preparat dicuci dengan PBS 4 x 5 menit.
12. Kemudian dicuci dengan aquades selama 5 menit.
13. Cat *Mayer hematoxylin (counterstain)* ditambahkan ke preparat, kemudian diinkubasi selama 1 menit, lalu dicuci dengan aquades selama 10 menit, dan dikeringkan;
14. Preparat dicelupkan ke dalam alkohol, dikeringkan dan dibersihkan;
15. Preparat selanjutnya ditetesi entellan kemudian ditutup dengan kaca penutup;
16. Setelah kering, preparat siap diperiksa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali;
17. Sel monosit yang dianalisis adalah yang disekeliling membran dan sitoplasmanya berwarna coklat dan dihitung di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000 kali pada 100 sel monosit.

3.8 Analisis Data

Data berasal dari rata-rata jumlah sel monosit yang mengekspresikan TNF- α . Dianalisis menggunakan uji normalitas *Saphiro-Wilk test* dan uji homogenitas *Levene test*. Data yang diperoleh pada penelitian ini berdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen ($p > 0,05$), sehingga digunakan analisis *One Way Anova*, kemudian dilanjutkan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbedaan tiap kelompok. Perbedaan pada tiap kelompok bermakna apabila nilai ($p < 0,05$).

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa seduhan *green coffee* dan *black coffee* kopi robusta memiliki efek antiinflamasi dan imunomodulator yang memadai dalam mengurangi ekspresi TNF- α monosit yang dipapar *S.aureus*. Seduhan kopi yang paling efektif dalam mengurangi ekspresi TNF- α pada penelitian ini adalah *green coffee* dosis 3gr/200ml.

5.2 Saran

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

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., A. H. Lichtman, dan S. Pillai. 2015. *Cytokines*. In: Cellular and Molecular Immunology. 8th. Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Adhi, K.C., S. Sulistyowati, dan S.H. Respati. 2016. Kadar Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) dan Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) pada Abortus dan Kehamilan Normal. *Jurnal Kesehatan Reproduksi*. 2(2): 71-76.
- Amanati, Luthfi. 2014. Uji Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* Pada Produk Mi Instan Yang Beredar Di Pasaran. *Jurnal Berita Litbang Industri*. 3(2): 73-80.
- Aisah, S., S. Djati, dan H. Khotimah. 2010. Pengaruh Polifenol Teh Hijau Terhadap Produksi TNF- α (Tumor Necrosis Factor – A) Pada Kultur Sel Trofoblas Manusia Yang Dipapar Glukosa Tinggi 33 Mm. *Skripsi*. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Arief, S. 2007. *Radikal Bebas*. Ilmu Kesehatan Anak FK UNAIR Surabaya.
- Asti, S. I. P. 2015. Pengaruh Ekstrak Biji Kopi Robusta Terhadap Aktifitas Fagositosis Sel Monosit. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Unej.
- Bancroft, J. D. dan G. Marlyn. 2008. *Theory and Practice of Histological Techniques: Immunohistochemical Techniques*. United State: Churchill Livingstone Elsevier.
- Baratawidjaja, G. K. dan R. Iris. 2012. *Imunologi dasar*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Bicho, N. C., A. E. Leitao, J. C. Ramalho, dan F.C. Lidon. 2012. Use of Colour Parameters for Roasted Coffee Assessment. *Ciênc. Tecnol.* 32(3): 436-442
- Bierhaus A., J. Wolf, M. Andrassy, N. Rohleder, P. M. Humpert, D. Petrov, R. Ferstl, E. Von, G. S. Frost, G. Rudofsky. 2003. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl acad Sci*. 100(4) : 1920-1925.
- Block, K. I. and M. N. Mead. 2003. Immune system effects of Echinacea, Ginseng and Astragalus: A review. *Integrative cancer therapies*. 2(3): 247 – 267.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, dan J. C. Howard. 1997. Cellular responses to interferongamma. *Annu Rev Immunol*. 15(1):749-795.

- Calder, P., N. Ahluwalia, R. Albers, N. Bosco, S. Bourdet, D. Haller, S. T. Holgate, L. S. Jonsson, M. E. Latulippe, A. Marcos, dan J. Moreines. 2013. A Consideration of biomarkers to be used for evaluation of Inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr.* 109(1):S1-34.
- Calder, P., R. Albers, J. M. Antoine, S. Blum, R. Bourdet-Sicard, G. A. Ferns, G. Folkerts, P. S. Friedmann, G. S. Frost, dan F. Guarner. 2009. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr.* 101(1):S1-45
- Castro, R. J. S., dan H. H. Sato. 2015. Review : Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International* 74: 185–198.
- Cavaillon, J. M. 2003. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators of Gram-negative sepsis, p. 33-58. In M. Kotb and T. Calandra (ed.), *Cytokines and chemokines in infectious diseases handbook*. Humana press, Totowa, N.J.
- Chamidah. 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) terhadap Aktivitas Pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Chandra, D., R. H. Ismono, dan E. Kasymir. 2013. Prospek Perdagangan Kopi Robusta Indonesia di Pasar Internasional. *JIIA* 1(1): 10-15.
- Chen, Y., dan P. H. Brown. 2012. Bioactive of crude caffeine: antioxidant activity, cyclooxygenase-2, inhibition, and enhanced glucose uptake. *Food Chemistry.* 131(2): 564-568.
- Coralie, J. D., C. Agnès, M. Baglieri, S. Claire, Ordonaud, M. G. Fabrice, Ducept, dan M. N. Maillard. 2006. Coffee Antioxidant Properties: Effects of Milk Addition and Processing Conditions. *Issue Journal of Food Science.* 71(3): S253-S258.
- Corwin, E. J. 2009. *Handbook of Pathophysiology*, 3rd Ed. Diterjemahkan oleh: Nike Budhi Subekti. Jakarta: EGC
- Dewanti, I. D. A. R., I. D. A. Susilawati, P. E. Lestari, R. Widi, E. Wulandari, R. Budiraharjo, D. Setyorini. 2017. Robusta Coffee Beans Decrease TNF- α and IL-1 β Expression in Dental Pulp. *Proceeding of the 1st International Conference on Medicine and Health Sciences I.* 31 Agustus – 1 Septembr 2016. Universitas Jember.

- Dinata, Wahyu. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kayu Manis (*Cinnamomum burmani*) terhadap Hitung Jenis Leukosit Darah Tepi. *Skripsi*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Emmanuel, I., M. A. Adeyeye, dan Kenni. 2008. The relationship in the amino acid of the whole body, flesh and exoskeleton of common west African fresh water male crab *Sudanaanautes africanus*. *Pakistan Journal of Nutrition*. 7(6): 748-752.
- Ermawati, Tantin. 2016. Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Tikus Periodontitis di Induksi *Porphyromonas gingivalis*. *Proceeding of the 3rd Dentistry Scientific Meeting of Jember*. Universitas Jember.
- Eroschenko, V. P. 2010. *Atlas Histologi diFiore dengan Korelasi Fungsional Edisi 11*. Jakarta: EGC.
- Fournier, B. dan D. J. Philpott. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System. *Clinical Mikrobiology Review*. 18(3): 521-540.
- Gabrijela, K. 2006. *Fine needle aspiration cytology*. New York: Springer
- Gardjito, M. dan D. A. Rahadian. 2011. *Kopi*. Kanisius. Yogyakarta.
- Glasser, R. dan J. K. Glasser. 2005. Stres-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immun*. 5(3): 243-251
- Gomez, K. A. dan A. A. Gomez, 1995. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*. Diterjemahkan oleh: E. Sjamsuddin dan J.S. Baharsjah. Jakarta: UIPress.
- González, A. G., F. Pablos, M. J. Martín, M. León-Camacho, and M. S. Valdenebro. 2001. HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. *Food Chemistry*. 73(1): 93-101.
- Gouvêa, Duarte, Santos, Abreu, dan Menezes. 2005. Effect Of Processing and Roasting On The Antioxidant Activity of Coffee Brews. *Journal of Antioxidant of Coffee Brews*. 25(2): 387-393.
- Gunawan, D. dan S. Mulyani. 2004. *Farma-kognos*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hartanto, D. S. 2009. Peran Sitokin dan Metabolisme Lipid dalam Stroke. *Berkala Neuro Sains*. 10(2): 63-67

- Hattenschwiler, S. dan P. M. Vitousek. 2000. The Role of Polyphenols Interrestrial Ecosystem Nutrient Cycling. *Trends in Ecology & Evolution*. 15(6):238-243.
- Hoffbrand, A.V. dan J. E. Pettit. 1996. *Kapita Selekt Haematologi*. Edisi 2. Alih Bahas oleh Iyan Darmawan. Jakarta: EGC.
- Horrigan, L.A., J. P. Kelly, dan T. J. Connor. 2004. Cafeeine surpreeses TNF- α production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Int. Immunopharmacol.* 4(10-11): 1409-1417.
- Irawati, L. Hubungan Tumor necrosis 2014. Factor-Alfa (Tnf-A) dengan Kadar Hemoglobin dan Parasitemia pada Infeksi Malatia Falciparum. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 3(2): 98-101.
- Isnindar, S. Wahyuono, dan S. Widyarini. 2017. Aktivitas Antioksidan Buah Kopi Hijau Merapi. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. Vol. 02, hal. 130-136.
- Israyanti. 2012. Perbandingan Karakteristik Kimia Kopi Luwak Dan Kopi Biasa Dari Jenis Kopi Arabika (*Cafeea Arabica. L*) dan Robusta (*Cafeea Canephora. L*). *Skripsi*. Makassar: Universitas Hasanuddin.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg 2007. *Mikrobiologi Kedokteran. Ed.23*. Translation of Jawetz, Melnick, and Adelberg's *Medical Microbiology*. 23 Ed. Alih bahasa oleh Hartanto, H. Jakarta: EGC
- Kayser, F.H., K. Bienz, dan J. Eckert. 2005. *Color atlas of Medical Microbiology*. Stuttgart, New York: Thieme
- Kenisa, Y.P., J. Handajani, dan H. Susilowati. 2012. Effect of Robusta Coffee beans ointment on full thickness wound healing. Surabaya: *Departement of Oral Biology* Faculty of Dentistry Airlangga University.
- Koss, dan G. Leopold. 2006. *The Breast Koss diagnostic cytology and its histopatologic bases. 5th ed*. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins
- Kumar, V., R. S. Cotran, dan S. L. Robbins. 2007. *Buku Ajar Patologi. Edisi 7*; ali Bahasa, Brahm U, Pendt ;editor Bahasa Indonesia, Huriawati Hartanto, Nurwany Darmaniah, Nanda Wulandari.-ed.7-Jakarta: EGC
- Kurzrock, T. dan K. Speer. 2001. Diterpenes and diterpene esters in coffee. *Food Reviews International*. 17(4): 433-450.
- Lampiasi, N. dan G. Montana. 2016. The molecular event behind ferulic acid mediated modulation of IL-6 expression in LPS-activated Raw 264.7 cells. *Immunobiology*. 221(4): 86-93.

- Lindholm, K., S. R. Orell, G. F. Sterrett, M. N. Walters, dan Whitaker D. 2005. *Fine Needle Aspiration Cytology*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier.
- Miller, G. E., E. Chen, J. Sze, T. Marin, J. M. Arevalo, R. Doll, R. Ma, dan S. W. Cole. 2008. A functional genomic fingerprint a chronic stress in humans; Blunted glucocorticoid and increased NF-kappa B signalling *Biol Psychiatry. Biol Psychiatry*. 64(4): 266-272 .
- Najiyati, S. dan Danarti. 2009. *Kopi: Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Natella, F., M. Nardini, F. Belelli, P. Pignatelli, S. Di Santo, A. Ghiselli, F. Violi, dan C. Scaccini. 2008. Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. *Br J Nutr*. 100(6): 1276-82.
- Panggabean, Edy. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: PT. AgroMedia Pustaka.
- Pedersen, G. W. 2013. *Buku Ajar Praktis Bedah Mulut*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Pietrocola, G., C. R. Arciola, S. Rindi, A. D. Poto, A. Missineo, L. Montanaro, dan P. Speziale. 2011. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *Int J Artif Organs*. 34(9): 799-810.
- Pourahmad, J. dan A. Salimi. 2015. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 14(4): 679-980.
- Parameswaran, N., dan S. Patial. 2010. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryot Gene Expression*. 20(2): 87-103.
- Prawitasari, Anggita. 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Price, Sylvia Anderson. 2005. *Patofisiologi: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi 6. Jakarta: EGC
- Rahardjo, Pudji. 2012. *Kopi*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Ramanaviciene, A., V. Mostovojus, I. Bachmatova, dan A. Ramanavicius. 2003. Anti-bacterial Effect on Caffeine on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal Acta Medica Lituania*. 10(4): 185-188.


- Scalbert, A. dan G. Williamson. 2000. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *J. Nutr.* 130(8): 2073S-2085
- Shen, W., R. Qi, J. Zhang, Z. Wang, H. Wang, dan C. Hu. 2012. Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. *Brain Res. Bull.* 88(5): 478-494.
- Sloane, Ethel. 2004. *Anatomy and physiology: an easy learner*. Diterjemahkan oleh: James Veldman. Jakarta: EGC.
- Smith A. J., M. S. Jackson, dan J. Bagg. 2011. The ecology of Staphylococcus species in the oral cavity. *J Med Microbiol.* 50(11): 940-6
- Sugiyono. 2010. *Metode penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Penerbit: Alfabeta
- Surati, S. 2014. Pengaruh Ekstrak Daun Salam (*Syzygum polyanthum*) terhadap Aktivitas Makrofag pada Mencit Balb/C yang Diinfeksi *Salmonella typhimurium*. *Thesis*. Semarang: Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
- Susilawati, I. D. A., Suryono, dan Ermawati, T. 2014. Kajian Efek Kopi dan Periodontitis pada Aterosklerosis Koroner. *Executive Summary Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi.* 304.
- Syah, I. S. K. 2016. Penentuan Tingkatan Jaminan Sterilisasi pada Autoklaf dengan Indikator Biologi *Spore Strip*. *Farmaka.* 14(1):59-69.
- Syahrurachman A., A. Chatim, A. Soebandrio, A. Karuniawati, A. Santoso, B.M. H. Harun., dan B. Bela. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi revisi. Jakarta : Binarupa Aksara publishers. p.125-34.
- Titus, A. dan G. N. Periera. 2005. The Fine Art of Irrigation in Robusta Coffee Plantations. <https://ecofriendlycoffee.org/the-fine-art-of-irrigation-in-robusta-coffee-plantations/>. Diakses pada tanggal 20 Mei 2018.
- Underwood, J. C. 2000. *Patologi Umum dan Sistemik*. Edisi 2 Vol 1. Diterjemahkan oleh Sardjadi, Jakarta: EGC.
- Wadsworth, T. L., T. L. McDonald, dan D. R. Koop. 2001. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide- induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Pharmacol.* 62(7): 963–974.
- Wadsworth, T. L. dan D. R. Koop. 2003. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharideinduced release of nitric oxide. *Chem Biol Interact.* 137(1): 43–58.

- Wahyuni, Tri. 2013. Hubungan Konsumsi Kopi dengan Tekanan Darah Pada Pasien Rawat Jalan Puskesmas Bogor Tengah. *Skripsi*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.
- Warbung, Y. Y., V.N.S. Wowor, dan J. Posangi. 2015. Daya Hambat Ekstrak Spons Laut *Callyspongia* sp Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. Manado: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sam Ratulangi.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Wilmana, P. F. dan S. Gan. 2007. *Analgesik-Antipiretik Analgesik Anti-Inflamasi NonSteroid dn Obat Gangguan Sendi Lainnya* dalam Farmakologi dan Terapi. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas
- Wiranata, Rozi. 2016. Pengaruh Tingkat Penyangraian terhadap Karakteristik Fisik Kimia Kopi Robusta (*Coffea canephora*. L). *Skripsi*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- World Health Organization. 2011. *Pedoman teknik dasar untuk laboratorium*. Ed. 2. Jakarta : EGC.Kedokteran Universitas Indonesia. Hal 230-246.
- Yaqin, M. A. dan M. Nurmilawati. 2015. Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta (*Coffea robusta*) sebagai Penghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Kediri: Universitas Nusantara PGRI.
- Yuslianti, E. R. 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Edisi 1. Yogyakarta: Deepublish.
- Yowanda, I. 2015. Perbandingan Daya Hambat Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dan Arabika (*Coffea arabica*) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. *Skripsi*. Aceh: Program Sarjana Universitas Syiah Kuala.

LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Izin Penelitian

115

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


Nomor : 2299/UN25.8.TL/2018
Perihal : Ijin Penelitian


Kepada Yth.
Ketua 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	: Wenny Agestin H
2	NIM	: 1516101010015
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Semeru XI/Q 10 Jember
6	Judul Penelitian	: Perbandingan Seduhan Biji Hijau (Green Coffee) Dan Biji Hitam (Black Coffee) Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Sel Mononuklear HPBmc Yang Dipapar Staphylococcus Aureus
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: Alat Uji Imunositokimia, Preparat, dll
9	Waktu	: Juli 2018 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Menganalisis Perbandingan Seduhan Biji Hijau (Green Coffee) Dan Biji Hitam (Black Coffee) Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Sel Mononuklear HPBmc Yang Dipapar Staphylococcus Aureus
11	Dosen Pembimbing	: 1. drg. Budi Yuwono, M.Kes 2. Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti, MSi

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

Jember 05 JULI 2018
an Dekan
Wakil Dekan I,

Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP.196109031986022001





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

Nomor : 2218 /UN25.8.TL/2018
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth.
Direktur RSGM 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 : Wenny Agestin H
- 2 NIM : 1516101010015
- 3 Semester/Tahun : 2017/2018
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Jl. Semeru XI/Q 10 Jember
- 6 Judul Penelitian : Perbandingan Seduhan Biji Hijau (Green Coffee) Dan Biji Hitam (Black Coffee) Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Sel Mononuklear HPBmc Yang Dipapar Staphylococcus Aureus
- 7 Lokasi Penelitian : Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember
- 8 Data/alat yang dipinjam : Tabung Reaksi, Alat Sentrifugasi, dll
- 9 Waktu : Juli 2018 s/d Selesai
- 10 Tujuan Penelitian : Untuk Menganalisis Perbandingan Seduhan Biji Hijau (Green Coffee) Dan Biji Hitam (Black Coffee) Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Sel Mononuklear HPBmc Yang Dipapar Staphylococcus Aureus
- 11 Dosen Pembimbing : 1. drg. Budi Yuwono, M.Kes
2. Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti, MSI

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

Jember 05 JUL 2018
Wakil Dekan I,

Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001

Lampiran B. *Etichal Clearance*



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. 077/UN25.8/KEPK/DL/2018

Title of research protocol : "Potensi Imunomodulator Protein Biji, Kulit Biji, Daun Kopi Untuk Meningkatkan Ketahanan Terhadap Infeksi *Streptococcus Mutans*"

Document approved : Research Protocol

Principal Investigator : drg. Roedy Budirahardjo, M.Kes, Sp. KGA

Member of research : 1. Prof. Dr. Drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si
2. Dr. Drg. Ristya Widi Endah Vari, M.Kes
3. drg. Diah Setyorini, M.Kes
4. Wenny Agustin H.

Responsible Physician : drg. Roedy Budirahardjo, M.Kes, Sp. KGA


Date of approval : May 24th, 2018

Place of research : 1. CDAST Laboratory Universitas Jember
2. Bioscience Laboratory RSGM Universitas Jember
3. Chemistry Laboratory Faculty of Mathematics and Natural Sciences Universitas Jember
4. Biology Laboratory Faculty of Pharmacy Universitas Jember

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, May 25th, 2018

Dean of Faculty of Dentistry Universitas
Jember



(drg. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)

Chairperson of Research Ethics Committee
Faculty of Dentistry Universitas Jember



(Prof. Dr. Drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si)

Lampiran C. Surat Identifikasi Bakteri



LABORATORIUM MIKROBIOLOGI
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER

SURAT KETERANGAN
No. 0155 / MIKRO / S.KET / 2018

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

Nama : Wenny Agestin H.
NIM : 151610101015
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
Keperluan : Identifikasi Mikroorganisme

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

Jember, 11 Maret 2018

Mengetahui,
Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi

Penanggung Jawab Lab. Mikrobiologi



(drg. Amandia Ddwi Permanashita, M. Biomed)
NIP. 198006032006042002

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

Lampiran D. Lembar Persetujuan (Informed Consent)

SURAT PERSETUJUAN
INFORMED CONSENT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Fiona Budi Amarta Domini
Umur : 22 tahun
Jenis Kelamin : Perempuan

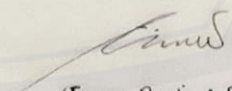
Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari :

Nama : Wenny Agestin
NIM : 151610101015
Fakultas : Kedokteran Gigi
Alamat : Jl. Semeru XI/Q10

Dengan judul penelitian **Analisis Efek Seduha *Green Coffe* dan *Black Coffe* Terhadap Ekspresi TNF- α Pada Sel Human Monosit yang Dipapar *Staphylococcus aureus***, dimana prosedur pelaksanaan penelitian untuk pengambilan sampel ini tidak akan menimbulkan resiko bagi subyek yang bersangkutan.

Saya telah membaca atau dibacakan prosedur penelitian yang terlampir dan telah diberi kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan diberi jawaban dengan jelas.

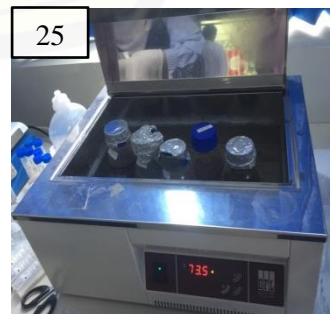
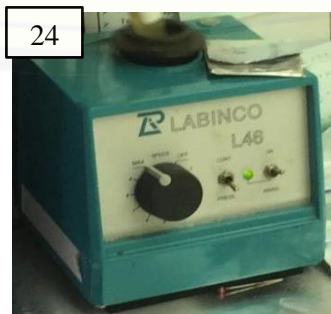
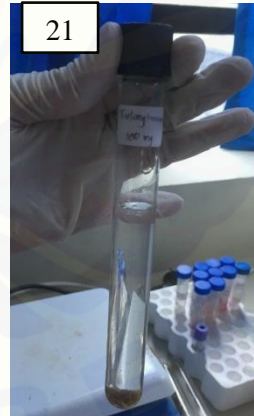
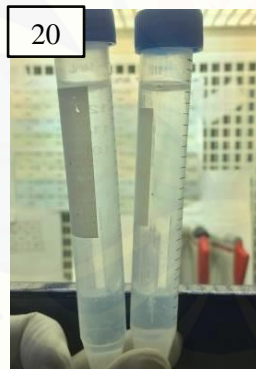
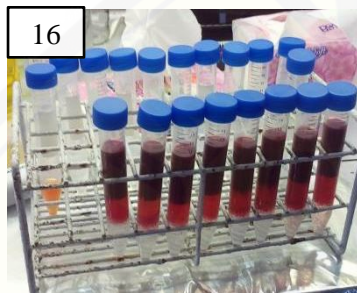
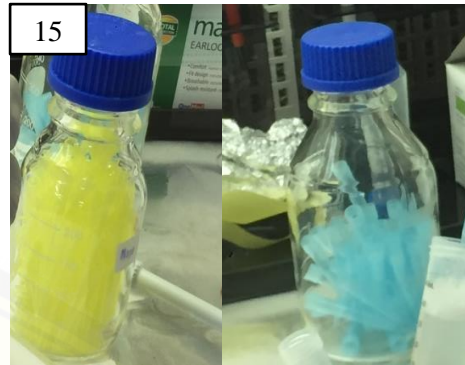
Surat persetujuan ini saya tulis dengan sebenar-benarnya tanpa suatu paksaan dari pihak manapun. Dengan ini saya menyatakan dengan sukarela sanggup menjadai subyek penelitian ini.

Jember, 28 Agustus 2018
Yang menyatakan

(Fiona Budi A. D.)

Lampiran E. Alat dan Bahan Penelitian

E.1 Alat Penelitian







Keterangan Gambar:

1. *Autoclave (Ependorf)*
2. *UV sterilizer*
3. *Tourniquet*
4. *Tabung vaculab EDTA K3 OneMed health care*
5. *Centrifuge (Eppendorf centrifuge 5810R)*
6. *Centrifuge*
7. *Coverslip poli L-lysine (Duran)*
8. *Gelas ukur*
9. *Incubator Shaker (LabTech, Daihan LabTech Co.,LTD.)*
10. *Laminar Flow Cabinet (Dwyer)*
11. *Microplate cell/ well plate 24 (Costas 3524)*
12. *Object glass*
13. *Oven (Binder)*
14. *Pipet mikro (Humapette)*
15. *Yellow tip/ blue tip*
16. *Rak Tabung*
17. *Syringe 5 ml (Terumo Syringe)*
18. *Whatman puradisc syringe filter 0.45 μ m*
19. *Tabung ependorf*
20. *Tabung Falcon (Biologix)*
21. *Tabung heparin (BD Vacutainer)*

- 22. Densicheck
- 23. Timbangan (*Balance boeco Germany*)
- 24. *Vortex*
- 25. *Water bath*
- 26. Mikroskop *inverted (Olympus)*
- 27. Optilab
- 28. Masker
- 29. Handscoon

E.2 Bahan Penelitian












Keterangan Gambar:




1. Bubuk *green coffee* kopi robusta
2. Bubuk *black coffee* kopi robusta
3. Darah vena perifer
4. Biakan *S. aureus*.
5. *Aquades steril*
6. Alkohol 70 %
7. Aluminium foil
8. *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
9. *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) (*Gibco*)
10. Media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)
11. Media M199
12. *Lymphoprep*
13. *Hystopaque 1119*
14. Tisu (untuk inkubasi)
15. Reagen imunositokimia (Metanol, imunostaining kit, antibodi primer *Anti-TNF- α* (Bioss), antibodi sekunder *anti Anti-TNF- α biotin conjugated* (Biotinylated/ DACO)).
16. *Streptavidin-HRP*
17. *DAB*
18. Cat Mayer *hematoxylin*
19. Entellan
20. Minyak emersi

Lampiran F. Pembuatan Seduhan *Green Coffee* dan *Black Coffee*

	<p>Menimbang bubuk <i>green coffee</i> dan <i>black coffee</i></p>
	<p>Larutkan dengan 200 ml aquades</p>
	<p>Masukan ke dalam <i>water bath</i> suhu 99,9°C, selama 10 menit setelah mendidih</p>
	<p>Diamkan selama 3-4 menit</p>

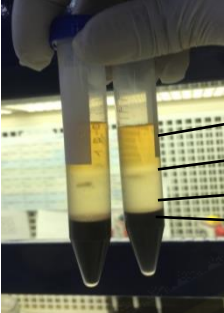
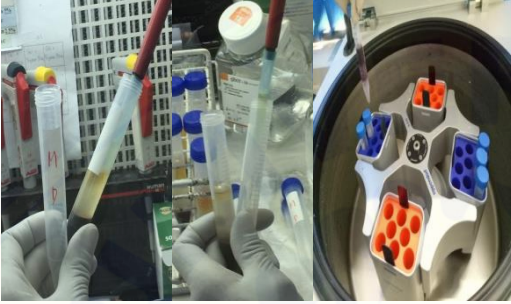
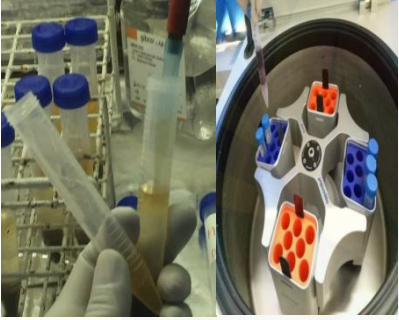
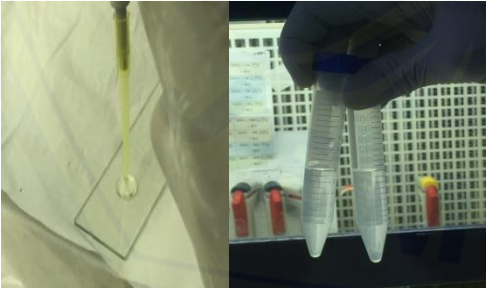
	<p>Pindahkan ke tabung falcon</p>
	<p>Di centrifuge kecepatan 2000 rpm 10 menit</p>
	<p>Penyaringan dengan menggunakan <i>whatman puradisc syringe filter 0.45μm</i></p>

Lampiran G. Pembuatan Suspensi *S.aureus*





	<p>Ambil media BHI-B sebanyak 2 ml</p>
	<p>Tambahkan 3 ose koloni bakteri</p>
	<p>Penyaringan bakteri dengan medianya</p>

Lampiran H. Isolasi Monosit

	<p>Pengambilan darah</p>
	<p>Membuat diluen darah: darah dimasukkan ke dalam tabung falcon dan tambahkan HBSS (1:1)</p>
	<p>Siapkan <i>Limproprep</i> ditabung falcon lain dan campurkan dengan diluent darah (1:2)</p>
	<p>Sentrifugasi dengan kecepatan 2100rpm/900g selama 30 menit</p>

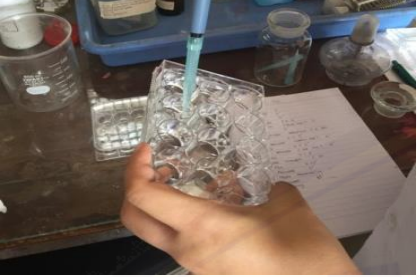



	<p>Terbentuk 4 lapisan:</p> <ul style="list-style-type: none">Plasma darahPBMCLymphoprepEritrosit
	<p>Pipeting PBMC ke tabung falcon, tambahkan HBSS (1:2) dan sentrifugasi dengan kecepatan 600 gatau 1700 rpm selama 10 menit</p>
	<p>Supernatan dibuang ditambahkan HBSS (1:2) sentrifugasi lagi dengan kecepatan 600g/1600rpm selama 10 menit , diulang sebanyak 3 kali</p>
	<p>Ambil menggunakan pipet mikro sebanyak 100 μl isolat monosit amati populasi sel berlapang pandang pada <i>objectglass</i></p>





Lampiran I. Penempelan Sel dan Perlakuan


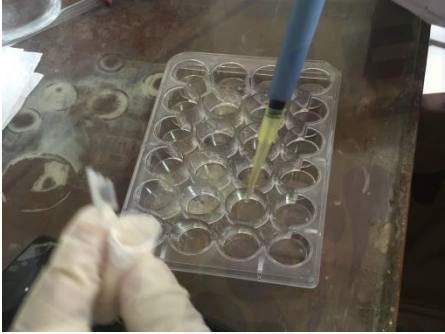

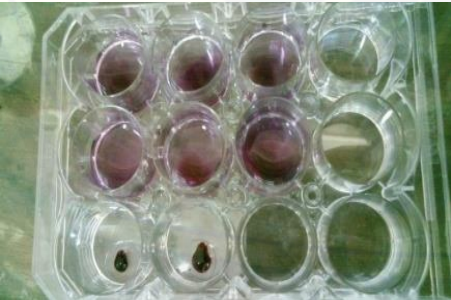
	<p>Siapkan microplate 24 well dan masukkan coverslip ke tiap-tiap well</p>
	<p>Pipeting 100 μl isolat monosit pada cover slip</p>
	<p>Inkubasi dalam inkubator 37°C selama 20 menit</p>
	<p>Tambahkan 1 ml media kultur (RPMI), inkubasi 30 menit pada suhu 37°C</p>

	<p>Cuci menggunakan RPMI sebanyak tiga kali, untuk melepaskan kontaminasi sel setelah itu ganti media kultur menggunakan M 199 sebanyak 1 ml pada tiap well</p>
	<p>Beri seduhan kopi sebanyak 100 μL tiap well Inkubasi selama 1 jam dalam <i>incubator shaker</i></p>
	<p>Pemaparan dengan antigen bakteri <i>S.aureus</i> sebanyak 100 μL pada semua kelompok, kecuali kelompok K1, setelah itu inkubasi selama 5 jam dalam <i>incubator shaker</i></p>
	<p>Fiksasi dengan metanol absolut</p>

Lampiran J. Prosedur Imunositokimia

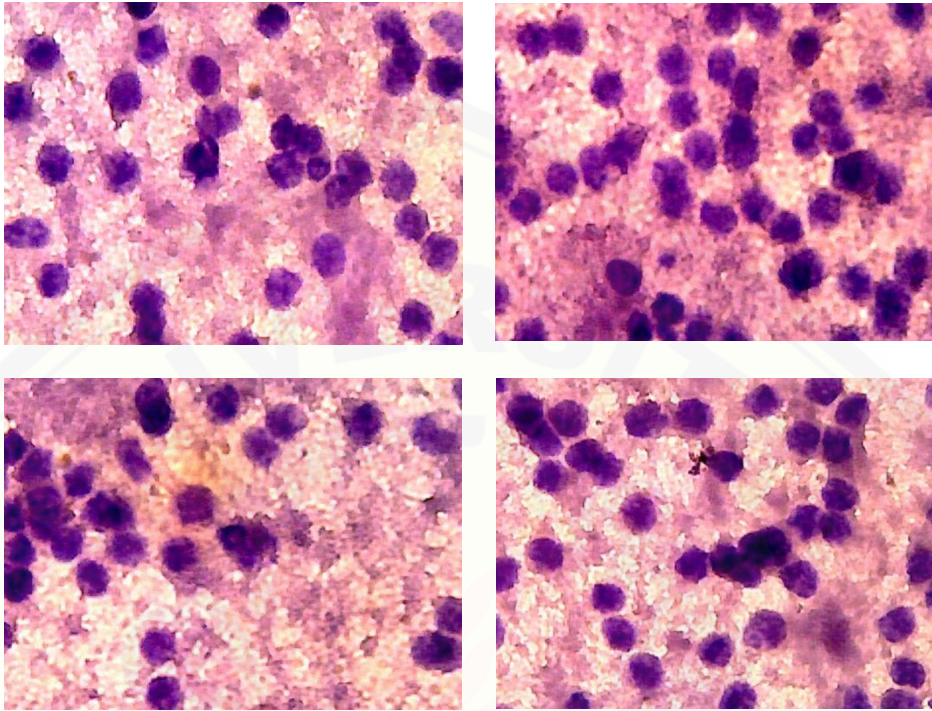
	<p>Cuci dengan aquades selama 5 menit</p>
	<p>Rendam dalam <i>Peroxidase Blocking Solution</i> (PBS) pada suhu kamar selama 5 menit</p>
	<p>Diberi satu tetes H_2O_2 pada masing-masing well, diamkan selama 10 menit</p>
	<p>Cuci sediaan dengan PBS pada suhu kamar selama 5 menit sebanyak 3 kali pencucian</p>

	<p>Beri Superblock selama 5 menit setelah itu rendam dalam PBS pada suhu kamar selama 5 menit</p>
	<p>Pemberian antibodi primer <i>Anti-TNF-α</i> (Bioss) 20 μl per well kemudian diinkubasikan pada nampan lembab pada suhu kamar (25°C) semalaman</p>
	<p>Cuci sediaan dengan PBS pada suhu kamar selama 5 menit sebanyak 4 kali pencucian.</p>
	<p>Pemberian antibodi sekunder <i>anti Anti-TNF-α biotin conjugated</i> (Biotinylated/ DACO) sebanyak 20 μl selama 15 menit</p>

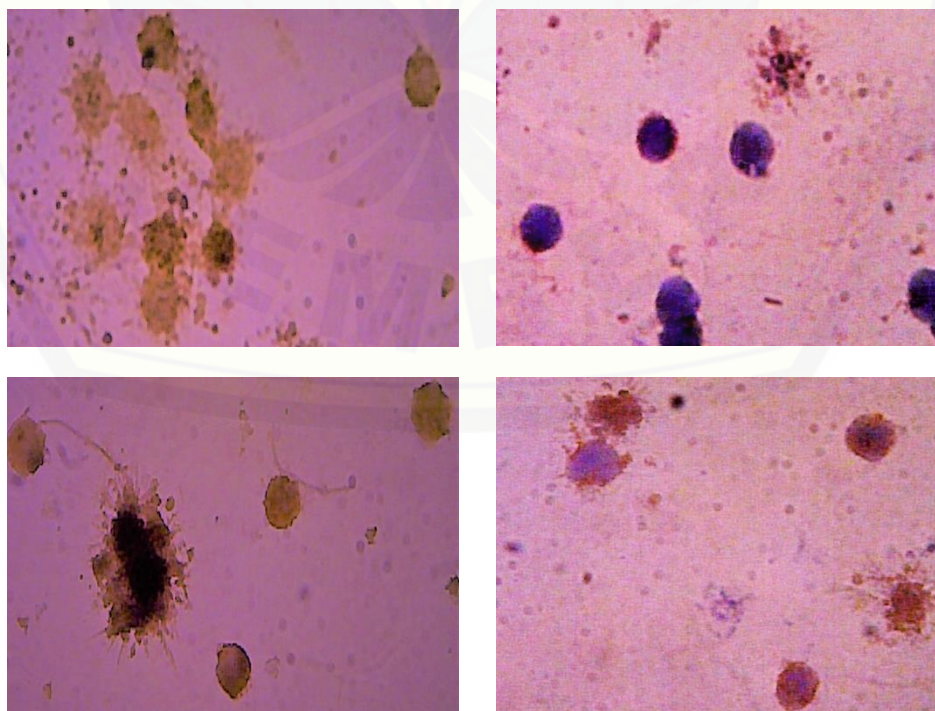
	<p>Cuci sediaan dengan PBS pada suhu kamar selama 5 menit sebanyak 4 kali pencucian.</p>
	<p>Inkubasikan dalam DAB sebanyak 20 μl per preparat selama kurang dari 20 menit</p>
	<p>Cuci sediaan dengan PBS pada suhu kamar selama 5 menit sebanyak 4 kali pencucian.</p>
	<p>Cat Mayer hematoxylin (<i>counterstain</i>) ditambahkan, diinkubasi selama 1 menit, lalu dicuci dengan aquades selama 10 menit dan dikeringkan → dicelupkan ke dalam alkohol, dikeringkan dan dibersihkan → diberi entelan dan ditutup → diamati</p>

Lampiran K. Hasil Penelitian

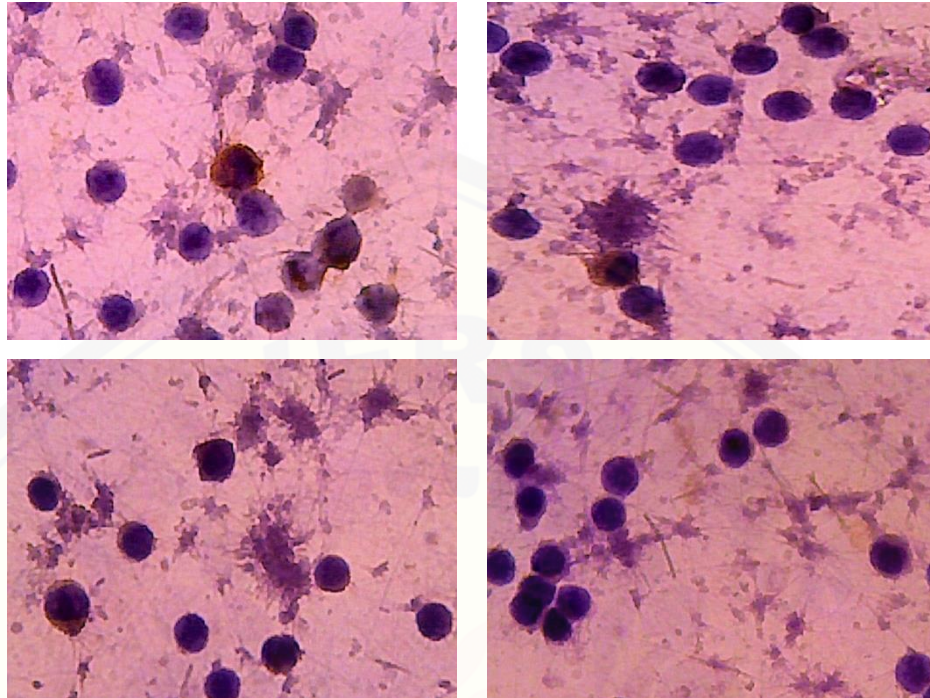
Kelompok Monosit (K)



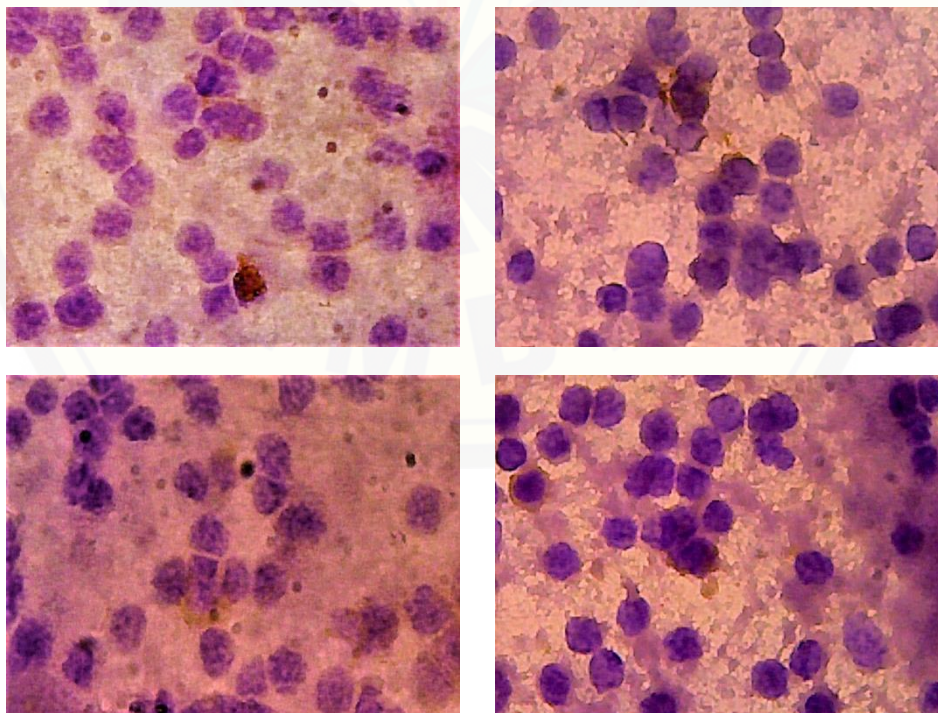
Kelompok Monosit + *S.aureus* (P0)



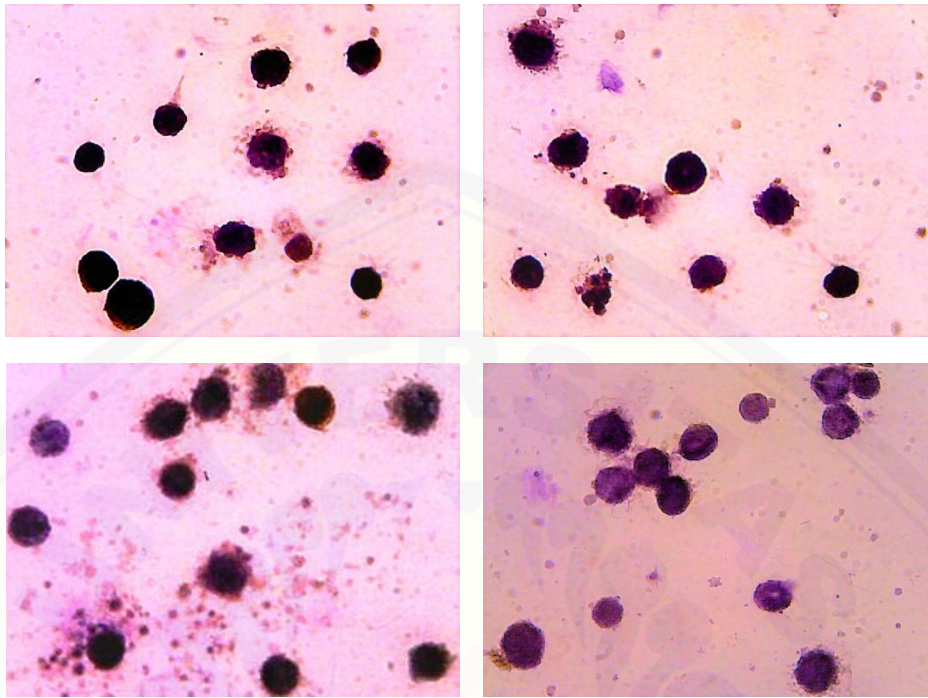
Kelompok Monosit + *S.aureus* + Green Coffee 3 gr (P1)



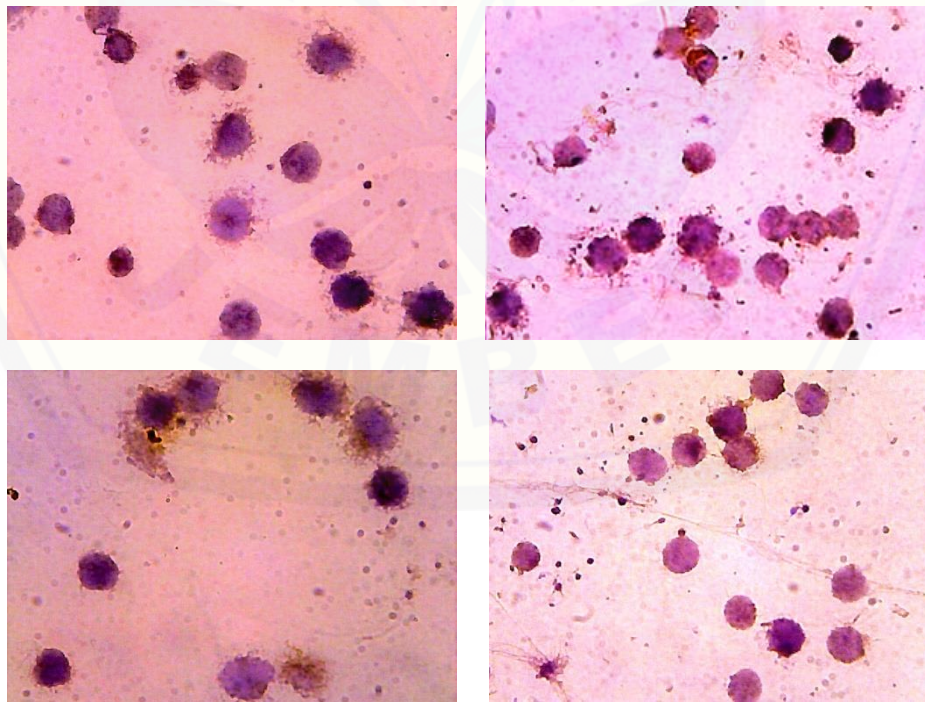
Kelompok Monosit + *S.aureus* + Green Coffee 6 gr (P2)



Kelompok Monosit + *S.aureus* + *Black Coffee* 3 gr (P3)



Kelompok Monosit + *S.aureus* + *Black Coffee* 6 gr (P4)



Lampiran L. Analisis Data**L.1 Hasil Penghitungan Kelompok Kontrol (Monosit)**

Pengulangan	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	10	11	10	10.33
2	13	13	11	12.33
3	9	10	9	9.33
			Jumlah	32.00
			Rata-rata	10.67
			%	10.67%

L.2 Hasil Penghitungan Kelompok P0 (Monosit+S.aureus)

Pengulangan	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	98	96	97	97.00
2	95	94	95	94.67
3	60	63	60	61.00
			Jumlah	252.67
			Rata-rata	84.22
			%	84.22%

L.3 Hasil Penghitungan Kelompok P1 (Monosit+Green Coffee 3 gr+S.aureus)

Pengulangan	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	16	16	15	15.67
2	18	17	18	17.67
3	30	34	34	32.67
			Jumlah	66.00
			Rata-rata	22.00
			%	22.00%

L.4 Hasil Penghitungan Kelompok P2 (Monosit+Green Coffee 6 gr+S.aureus)

Pengulangan	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	32	32	32	32.00
2	48	49	48	48.33
3	56	55	56	55.67
			Jumlah	136.00
			Rata-rata	45.33
			%	45.33%

L.5 Hasil Penghitungan Kelompok P3 (Monosit+*Black Coffee* 3 gr+*S.aureus*)

Pengulangan	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	34	32	34	33.33
2	44	44	43	43.67
3	49	50	48	49.00
			Jumlah	126.00
			Rata-rata	42.00
			%	42.00%

L.6 Hasil Penghitungan Kelompok P4 (Monosit+*Black Coffee* 6 gr+*S.aureus*)

Pengulangan	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	50	52	50	50.67
2	64	63	64	63.67
3	36	36	36	36.00
			Jumlah	150.33
			Rata2	50.11
			%	50.11%

L.7 Hasil Uji Normalitas *Saphiro-Wilk*

Tests of Normality							
	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Hasil	Kontrol	.253	3	.	.964	3	.637
	P0	.365	3	.	.798	3	.111
	P1	.346	3	.	.837	3	.206
	P2	.264	3	.	.954	3	.588
	P3	.250	3	.	.967	3	.651
	P4	.183	3	.	.999	3	.933

a. Lilliefors Significance Correction

L.8 Hasil Uji Homogenitas *Levene test*

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil	Based on Mean	2.554	5	12	.085
	Based on Median	.445	5	12	.809

Based on Median and with adjusted df	.445	5	4.833	.803
Based on trimmed mean	2.295	5	12	.111

L.9 Hasil Uji *One Way Anova*

ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9722.072	5	1944.414	13.014	.000
Within Groups	1792.874	12	149.406		
Total	11514.946	17			

L.10 Hasil Uji LSD (*Least Significant Difference*)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

LSD

(I) Kelompo k	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	P0	-73.56000*	9.98019	.000	-95.3050	-51.8150
	P1	-11.34000	9.98019	.278	-33.0850	10.4050
	P2	-34.67000*	9.98019	.005	-56.4150	-12.9250
	P3	-31.33667*	9.98019	.009	-53.0816	-9.5917
	P4	-39.45000*	9.98019	.002	-61.1950	-17.7050
P0	Kontrol	73.56000*	9.98019	.000	51.8150	95.3050
	P1	62.22000*	9.98019	.000	40.4750	83.9650

	P2	38.89000*	9.9801 9	.002	17.1450	60.6350
	P3	42.22333*	9.9801 9	.001	20.4784	63.9683
	P4	34.11000*	9.9801 9	.005	12.3650	55.8550
P1	Kontrol	11.34000	9.9801 9	.278	-10.4050	33.0850
	P0	-62.22000*	9.9801 9	.000	-83.9650	-40.4750
	P2	-23.33000*	9.9801 9	.038	-45.0750	-1.5850
	P3	-19.99667	9.9801 9	.068	-41.7416	1.7483
	P4	-28.11000*	9.9801 9	.016	-49.8550	-6.3650
P2	Kontrol	34.67000*	9.9801 9	.005	12.9250	56.4150
	P0	-38.89000*	9.9801 9	.002	-60.6350	-17.1450
	P1	23.33000*	9.9801 9	.038	1.5850	45.0750
	P3	3.33333	9.9801 9	.744	-18.4116	25.0783
	P4	-4.78000	9.9801 9	.641	-26.5250	16.9650
P3	Kontrol	31.33667*	9.9801 9	.009	9.5917	53.0816
	P0	-42.22333*	9.9801 9	.001	-63.9683	-20.4784
	P1	19.99667	9.9801 9	.068	-1.7483	41.7416
	P2	-3.33333	9.9801 9	.744	-25.0783	18.4116
	P4	-8.11333	9.9801 9	.432	-29.8583	13.6316
P4	Kontrol	39.45000*	9.9801 9	.002	17.7050	61.1950

P0	-34.11000*	9.98019	.005	-55.8550	-12.3650
P1	28.11000*	9.98019	.016	6.3650	49.8550
P2	4.78000	9.98019	.641	-16.9650	26.5250
P3	8.11333	9.98019	.432	-13.6316	29.8583

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

