



EFEKTIVITAS EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) DALAM MENINGKATKAN VIABILITAS PBMC YANG DIPAPAR KOBALT (Co)

SKRIPSI

Oleh

**Elma Farisah
NIM 1516101017**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



EFEKTIVITAS EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) DALAM MENINGKATKAN VIABILITAS PBMC YANG DIPAPAR KOBALT (Co)

SKRIPSI

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

Oleh:

Elma Farisah
NIM 151610101017

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Orangtua tercinta, Papa Latif Masykur Zamaniy dan Mama Nunuk Endah Purwanti yang telah banyak memberikan kasih sayang, dukungan, doa dan pengorbanan tiada henti;
2. Adik tersayang, Alfi Maghfirah dan Hilda Majidah;
3. Dosen pembimbing drg. Dessy Rachmawati, M.Kes., Ph.D dan drg. Tantin Ermawati, M.Kes.;
4. Bapak ibu guru sejak penulis bersekolah di taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah banyak membimbing dan memberikan ilmu kepada penulis;
5. Almamater Universitas Jember.

MOTTO

“Allah SWT tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”
(Terjemahan QS. Al-Baqarah: 286)^{*)}

“Cukuplah Allah (menjadi penolong) bagi kami dan Dia sebaik-baik pelindung”
(Terjemahan QS. Ali Imran: 173)^{*)}

“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat”
(Terjemahan QS. Al-Mujadalah: 11)^{*)}

^{*)} Subarkah, A. 2017. *Al-Qur'an Perkata Warna Ar-Riyadh*. Bandung: Cordoba.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Elma Farisah

NIM : 151610101017

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dalam Meningkatkan Viabilitas PBMC yang Dipapar Kobalt (Co)” adalah benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang saya sebut sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 21 Juni 2019

Yang menyatakan

Elma Farisah

NIM 151610101017

SKRIPSI

**EFEKTIVITAS EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)
DALAM MENINGKATKAN VIABILITAS PBMC YANG DIPAPAR
KOBALT (Co)**

Oleh

Elma Farisah
NIM 1516101017

Dosen Pembimbing:

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

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

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dalam Meningkatkan Viabilitas PBMC yang Dipapar Kobalt” karya Elma Farisah telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 21 Juni 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua

Penguji Anggota

drg. Nadie Fatimatuzzahro, MDSc.
NIP 198204242008012022

drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc.
NIP 197908142008122003

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

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

drg. Tantin Ermawati, M.Kes.
NIP 198003222008122003

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

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

RINGKASAN

Efektivitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dalam Meningkatkan Viabilitas PBMC yang Dipapar Kobalt (Co); Elma Farisah; 151610101017; 66 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Kobalt masih banyak digunakan dalam pembuatan mahkota logam-keramik dan kerangka gigi tiruan sebagian. Logam kobalt di dalam rongga mulut akan menghasilkan pelepasan ion logam terus menerus karena berinteraksi dengan lingkungan yang basah. Ion logam kobalt dapat merangsang respon sel-sel imun PBMC. Kobalt dapat menginduksi produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang berperan penting dalam tahap awal terjadinya apoptosis. Apoptosis sel dikarenakan logam kobalt dapat dicegah dengan bahan antioksidan yang berasal dari sediaan herbal.

Bahan herbal yang dapat berperan sebagai antioksidan salah satunya adalah biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Ekstrak biji kopi robusta mengandung polifenol dan flavonoid yang merupakan antioksidan kuat dan dapat melindungi sel imun dari kerusakan biologis akibat radikal bebas. Bahan herbal ini dapat diaplikasikan jika didukung oleh bukti ilmiah adanya khasiat dan penggunaannya pada manusia. Bukti tersebut dapat diperoleh dari penelitian yaitu dilakukan uji sitotoksitas atau uji viabilitas. Uji ini bertujuan untuk mengetahui apakah bahan tersebut dapat diterima oleh tubuh atau tidak. Uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji MTT.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris *in vitro* dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan isolat PBMC yang diambil dari darah vena perifer orang sehat yang kemudian dipapar dengan larutan kobalt (II) klorida heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) konsentrasi 125 μM dan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan konsentrasi 31,25 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$ dan 125 $\mu\text{g/ml}$. Larutan logam yang digunakan dibuat dengan melarutkan *powder* dalam aquades dan selanjutnya dalam *Roswell Park Memorial Institute Media* (RPMI) untuk mendapatkan konsentrasi 125 μM yang siap untuk dipaparkan langsung pada

PBMC. Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dibuat menggunakan metode maserasi yang selanjutnya diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan yaitu 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 125 µg/ml. Data yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk* dan uji homogenitas *Levene*, dilanjutkan uji non-parametrik *Kruskall Wallis* dan uji beda *Mann Whitney*.

Ekstrak biji kopi robusta efektif dalam meningkatkan viabilitas PBMC yang dipapar kobalt. Ekstrak biji kopi robusta dalam konsentrasi paling tinggi 125 µg/ml yang dipaparkan pada PBMC dapat meningkatkan viabilitas secara signifikan dari paparan logam kobalt.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dalam Meningkatkan Viabilitas PBMC yang Dipapar Kobalt (Co)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pro., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. Orangtua tercinta; Papa Latif Masykur Zamaniy dan Mama Nunuk Endah Purwanti yang selalu mendoakan, memberi dukungan, serta mencurahkan kasih sayangnya hingga saat ini;
3. drg. Dessy Rachmawati, M.Kes., Ph.D., dan drg. Tantin Ermawati, M.Kes., selaku dosen pembimbing utama dan dosen pembimbing pendamping, yang telah membagikan ilmu, waktu dan pengalamannya dalam proses penyelesaian skripsi penulis;
4. drg. Nadie Fatimatuzzahro, MDSc., dan drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc., selaku dosen penguji utama dan dosen penguji anggota, yang telah bersedia meluangkan waktu untuk membaca, memberikan kritik dan memberikan saran pada skripsi penulis;
5. drg. Ristya Widi Endah Yani, M.Kes., selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Adik tersayang, Alfi Maghfirah dan Hilda Majidah yang selalu menyemangati dan mendoakan penulis.
7. Seluruh staf di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang membantu dalam penyelesaian administrasi penulisan skripsi ini;

8. Teknisi Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah membantu dalam proses penelitian;
9. Teman-teman tim penelitian Nindya Shinta dan Indah Pratiwi. Terima kasih atas kerjasamanya;
10. Sahabat saya Arifah Khoirianti, Rizky Purboningtyas, Asmaradita Nourisha, dan Berliana Calpika yang selalu menemani dan mendukung penulis;
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

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

Jember, 21 Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Alloy</i> Logam Kobalt	5

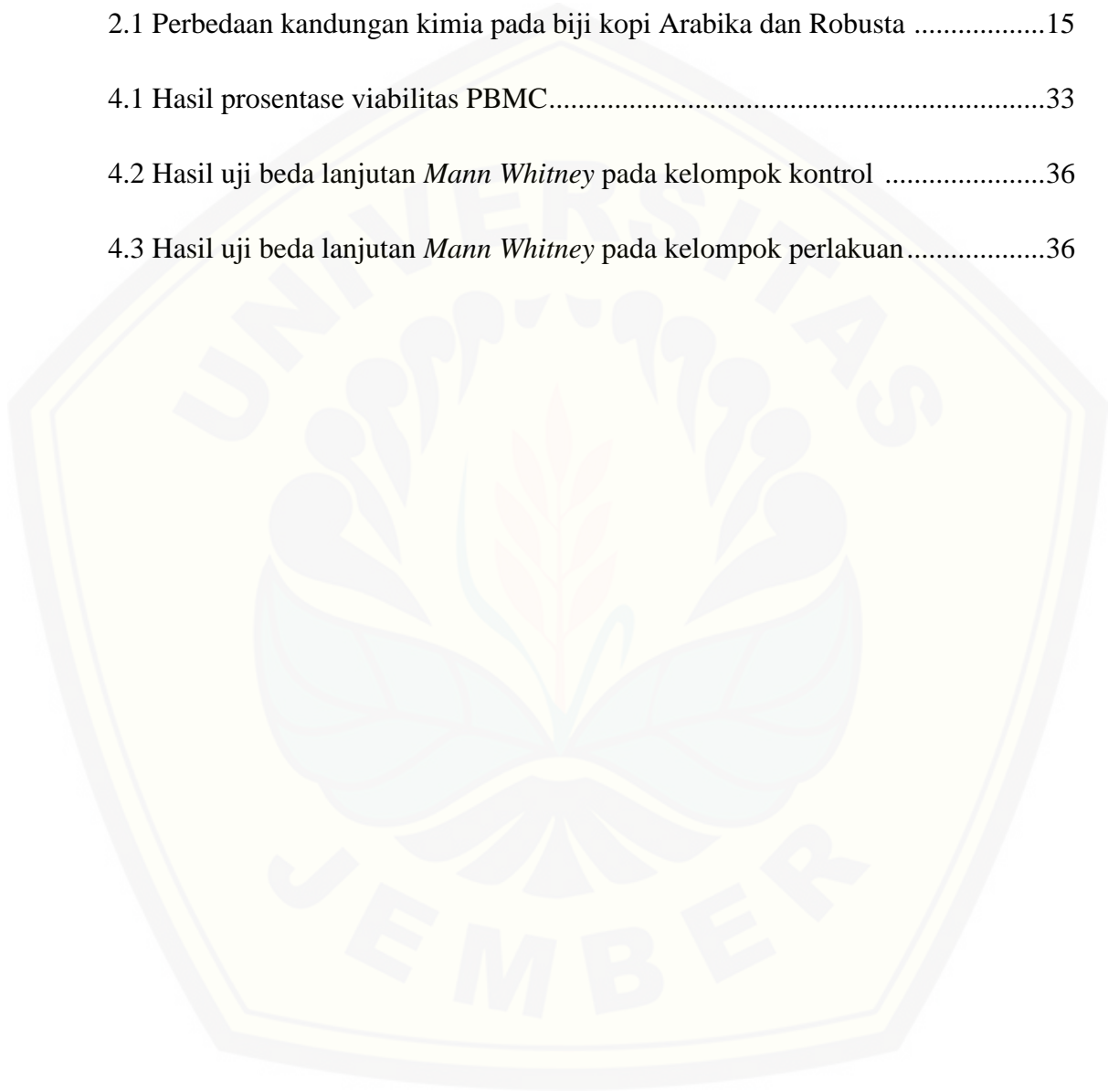
2.1.1 Pengertian Alloy	5
2.1.2 Logam Kobalt	5
2.1.3 Pelepasan Ion Logam	6
2.2 Respon Tubuh Manusia Terhadap Paparan Logam.....	7
2.2.1 Kobalt dan ROS	7
2.2.2 Apoptosis	9
2.3 PBMC (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)	11
2.4 Kopi Robusta	12
2.4.1 Taksonomi dan Deskripsi Kopi Robusta	13
2.4.2 Komposisi Kimia Kopi Robusta	14
2.5 Uji Viabilitas	17
2.5.1 Uji MTT	17
2.5.2 Tingkat Toksisitas	19
2.6 Kerangka Konsep	20
2.7 Penjelasan Kerangka Konsep	21
2.8 Hipotesis	21
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Jenis Penelitian	22
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.2.1 Waktu Penelitian	22
3.2.2 Tempat Penelitian	22
3.3 Identifikasi Variabel	22

3.3.1 Variabel Bebas	22
3.3.2 Variabel Terikat	22
3.3.3 Variabel Terkendali	22
3.4 Sampel Penelitian	23
3.4.1 Kriteria Sampel	23
3.4.2 Kelompok Sampel.....	23
3.4.3 Besar Sampel	24
3.5 Definisi Operasional	24
3.5.1 Ekstrak Biji Kopi Robusta	24
3.5.2 Larutan Logam Kobalt.....	24
3.5.3 Viabilitas PBMC.....	25
3.6 Alat dan Bahan	25
3.6.1 Alat.....	25
3.6.2 Bahan	25
3.7 Prosedur Penelitian	26
3.7.1 <i>Etichal Clearance</i>	26
3.7.2 Sterilisasi Alat.....	26
3.7.3 Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta	26
3.7.4 Pengenceran Ekstrak Biji Kopi Robusta.....	27
3.7.5 Pengambilan Sampel Darah.....	27
3.7.6 Isolasi PBMC	27

3.7.7	Prosedur Penempelan Sel.....	28
3.7.8	Inkubasi PBMC.....	28
3.7.9	Inkubasi PBMC dengan Logam Kobalt.....	28
3.7.10	Inkubasi PBMC dengan Ekstrak Biji Kopi Robusta.....	29
3.7.11	Inkubasi PBMC dengan Ekstrak Biji Kopi Robusta dan Logam Kobalt	29
3.7.12	Uji MTT.....	29
3.7.13	Pengamatan Hasil.....	30
3.8	Analisis Data.....	30
3.9	Alur Penelitian.....	31
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Hasil.....	32
4.2	Pembahasan.....	37
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN		
5.1	Kesimpulan.....	41
5.2	Saran.....	41
DAFTAR PUSTAKA.....		42
LAMPIRAN.....		47

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Perbedaan kandungan kimia pada biji kopi Arabika dan Robusta	15
4.1 Hasil prosentase viabilitas PBMC.....	33
4.2 Hasil uji beda lanjutan <i>Mann Whitney</i> pada kelompok kontrol	36
4.3 Hasil uji beda lanjutan <i>Mann Whitney</i> pada kelompok perlakuan.....	36



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Reaksi Haber-Weiss dan Fenton	8
2.2 Jalur ekstrinsik dan instrinsik pada apoptosis	11
2.3 Tanaman kopi robusta	14
2.4 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan	18
2.5 Kerangka konsep penelitian	20
3.1 Alur penelitian	31
4.1 Hasil uji MTT pada PBMC yang telah diberi berbagai perlakuan.....	32
4.2 Diagram batang prosentase viabilitas PBMC menggunakan uji MTT pada kelompok kontrol	34
4.3 Diagram batang prosentase viabilitas PBMC menggunakan uji MTT pada kelompok kontrol sel, kelompok kontrol kobalt dan kelompok perlakuan.....	34
4.4 Mekanisme aktivitas antioksidan pada kopi	38

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
<i>Ethical Clearance</i>	47
Surat Identifikasi Tanaman	48
Surat Ijin Pembuatan Ekstrak	49
Surat Ijin Penelitian	50
<i>Informed Consent</i>	51
Alat Penelitian.....	52
Bahan Penelitian	55
Foto Penelitian	57
Analisis Data.....	59

DAFTAR SINGKATAN

AIF : *Apoptosis Inducing Factor*
AP-1 : *Activator Protein-1*
Apaf-1 : *Apoptotic protease activating factor-1*
ATP : *Adenosine Triphosphate*
ATPase : *Adenosine Triphosphatase*
BAD : *Bcl-2 associated agonist of cell death*
BAX : *Bcl-2-associated X protein*
BCL-2 : *B-cell lymphoma 2*
CARD : *Caspase Recruitment Domain*
Caspase : *Cysteine Aspartate Specific Protease*
Co : *Cobalt*
CoCl₂.6H₂O : *Kobalt (II) Klorida Heksahidrat*
Cr : *Chromium*
Cu : *Cuprum/Copper*
Cyt c : *Cytochrome c*
DMSO : *Dimethylsulfoxide*
DMT1 : *Divalent Metal Transporter 1*
DNA : *Deoxyribonucleic Acid*
ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FADD : *Fas-associated protein with Death Domain*
Fe : *Ferrum/Iron*
H₂O₂ : *Hydrogen peroxide*
HBSS : *Hank's Balanced Salt Solution*
HIF-1 : *Hypoxia-Inducible Factor 1*
IL : *Interleukin*
LPS : *Lipopolisakarida*
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
Mn : *Manganese*
mRNA : *Messenger Ribonucleic Acid*

MTT : *3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide*

NADH : *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen*

NF- κ B : *Nuclear Factor-kappa B*

NK : *Natural Killer*

O₂⁻ : *Superoxide Anion*

OD : *Optical Density*

OH[•] : *Hydroxyl Radical*

p53 : *Transformation-related Protein 53*

PBMC : *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

PBS : *Phospat Buffered Saline*

pH : *potential of Hydrogen*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

RPM : *Rotasi per Menit*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*

RSGM : *Rumah Sakit Gigi dan Mulut*

tBid : *Truncates Bid*

TLR4 : *Toll-Like Receptor 4*

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor*

TNFR1 : *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*

TRADD : *Tumor Necrosis Factor Receptor 1-associated Death Domain Protein*

Zn : *Zinc*

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penggunaan logam sudah umum digunakan dalam perawatan di bidang kedokteran gigi. Dalam bidang kedokteran gigi logam yang digunakan berbentuk logam campur atau paduan yang disebut *alloy* (Soesetijo, 2012). Logam kobalt (Co) di kedokteran gigi biasanya dicampur dengan kromium (Cr) agar didapatkan biaya yang lebih rendah, sifat mekanik dan fisik yang lebih baik. Paduan ini masih banyak digunakan dalam pembuatan mahkota logam-keramik dan kerangka gigi tiruan sebagian (Rachmawati, 2016).

Alloy di dalam rongga mulut akan menghasilkan pelepasan ion logam terus menerus karena berinteraksi dengan lingkungan yang basah. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi pelepasan ion logam dalam rongga mulut, seperti pengaruh suhu, pH saliva, agen eksogen seperti tembakau dan alkohol, reaksi kekebalan tubuh yang sedang berlangsung, serta paduan logam yang berbeda (Rachmawati, 2016). Akibatnya, ion logam yang dilepaskan dari *alloy* dapat menginduksi sitotoksisitas terutama jika paparannya terjadi dalam jangka waktu yang lama. Sitotoksisitas sering dianggap sebagai manifestasi pertama dari biokompatibilitas yang kurang baik, sehingga menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis atau nekrosis (Pan dkk., 2017).

Kontak dengan kobalt dapat menyebabkan reaksi alergi. Namun, reaksi alergi terhadap paduan kobalt diduga tidak hanya disebabkan oleh sensitisasi kobalt, hal ini juga disebabkan karena paduan ini selalu mengandung nikel dan atau kromium (Rachmawati, 2016). Kobalt berpotensi beracun dalam bentuk ionik (Co^{2+}) dan bersifat sitotoksik terhadap banyak tipe sel, termasuk sel-sel saraf, dan dapat menginduksi kematian sel dengan cara apoptosis dan nekrosis. Kobalt diduga dapat menginduksi apoptosis melalui jalur ekstrinsik maupun jalur intrinsik (Battaglia, 2009).

Kobalt dapat menginduksi produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan bertindak langsung pada mitokondria untuk menginduksi pelepasan sitokrom c (*cyt c*) dari membran mitokondria eksternal yang mengarah pada aktivasi *caspase-*

9. Aktivasi *caspase* memainkan peran penting dalam pelaksanaan apoptosis. Selain dapat menyebabkan aktivasi *caspase*, kobalt juga dapat menyebabkan fragmentasi DNA, fosforilasi augmentasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan peningkatan kadar p53 (Battaglia, 2009; Pan dkk., 2017). Logam kobalt yang dipakai pada penelitian ini adalah berbentuk larutan kobalt (II) klorida heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) sebagai *metal allergen*.

Ion logam kobalt dapat merangsang respon sistem imun non spesifik melalui ikatan antigen logam dengan reseptor TLR4 yang selama ini dikenal merupakan reseptor untuk lipopolisakarida (LPS) bakteri. Komponen seluler dari sistem imun non spesifik yaitu neutrofil, monosit, sel dendritik, sel mast, basofil, eosinofil dan sel *natural killer* (NK) (Rachmawati, 2016). Pada penelitian ini digunakan PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) yang merupakan bagian dari sel-sel darah yang berinti bulat, terdiri dari sel monosit, sel T, sel B, sel *natural killer* (NK), dan sel dendritik. PBMC memainkan peranan penting dalam sistem kekebalan tubuh dan terjadinya inflamasi (Koncarevic, dkk., 2014).

Kematian sel dikarenakan paparan logam kobalt dapat dicegah dengan bahan antioksidan yang berasal dari sediaan herbal. Sediaan herbal yang dapat berperan sebagai antioksidan antara lain adalah biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Salah satu kabupaten penghasil kopi terbaik di Indonesia yakni kabupaten Jember, Jawa Timur, yang telah memiliki Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, sehingga kopi yang dihasilkan dapat dijamin kualitasnya. Sebagian besar kopi Indonesia merupakan kopi jenis robusta karena lebih mudah ditanam dan memiliki adaptasi yang lebih baik dibandingkan kopi arabika (Panggabean, 2011). Tanaman kopi merupakan salah satu tanaman yang mengandung antioksidan tinggi. Komponen bioaktif dari biji kopi seperti flavonoid, xanthine, antioksidan, alkaloid, polifenol telah diketahui dapat berfungsi sebagai imunomodulator, antiinflamasi, antibakteri dan mempengaruhi agregasi platelet. Ekstrak etanol biji kopi terbukti dapat mempertahankan hidup sel (Budirahardjo, 2016). Aktivitas antioksidan yang dimiliki biji kopi robusta lebih tinggi daripada biji kopi arabika. Kopi dalam bentuk ekstrak yang tidak mengalami proses *roasting* memiliki kandungan polifenol dan kafein yang lebih tinggi daripada kopi yang telah

mengalami proses *roasting* (Yashin, 2013). Dengan adanya sifat biji kopi robusta tersebut, diharapkan bahan ini dapat mengurangi toksisitas logam kobalt sehingga meningkatkan viabilitas sel setelah pengaplikasiannya. Konsentrasi ekstrak biji kopi yang digunakan pada penelitian El-Nabi tahun 2018 adalah 125, 250, 500 µg/ml. Setelah dilakukan penelitian pendahuluan, pada konsentrasi 250, 500 µg/ml didapatkan banyak sel mati. Oleh karena itu, penggunaan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta pada penelitian ini diturunkan menjadi 125 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 31,25 µg/ml.

Bahan herbal ini dapat diaplikasikan jika didukung oleh bukti ilmiah adanya khasiat dan penggunaannya pada manusia. Bukti tersebut dapat diperoleh dari penelitian yaitu dilakukan uji sitotoksitas atau uji viabilitas. Uji ini dilakukan agar diketahui apakah bahan tersebut telah memenuhi syarat biokompatibilitas yang dapat diterima oleh tubuh (Nirwana, 2005). Uji yang digunakan adalah dengan uji MTT. Berdasarkan latar belakang diatas, penulis ingin melakukan penelitian mengenai efektivitas ekstrak biji kopi robusta dalam meningkatkan viabilitas PBMC yang dipapar kobalt.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu :

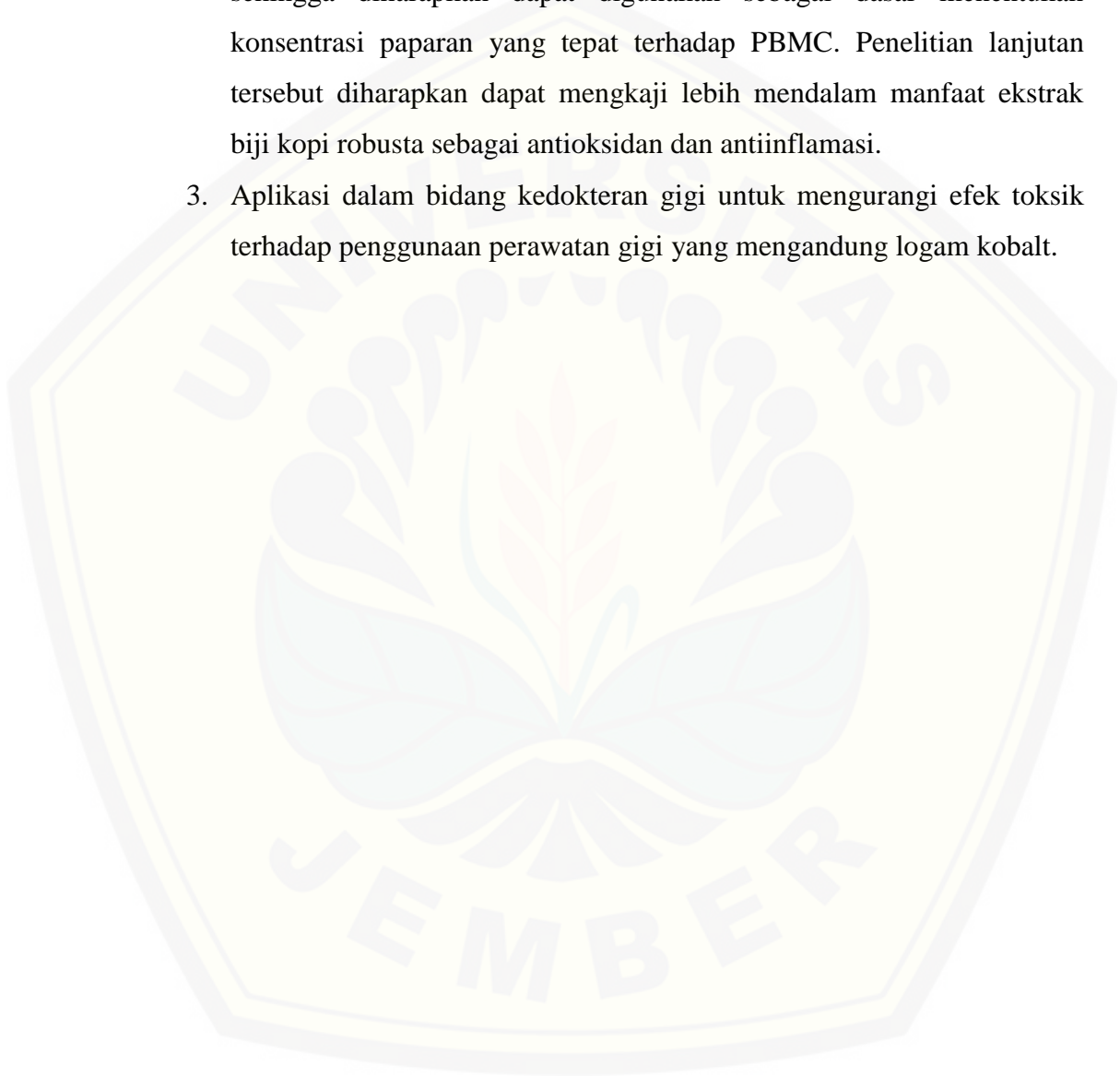
1. Apakah ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) efektif dalam meningkatkan viabilitas PBMC yang dipapar oleh kobalt?
2. Berapa konsentrasi ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang menunjukkan optimal konsentrasi dalam penelitian ini?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Mengkaji efektivitas ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dalam meningkatkan viabilitas PBMC yang dipapar oleh kobalt.
2. Mengetahui konsentrasi ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang menunjukkan optimal konsentrasi dalam penelitian ini.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Menambah pengetahuan tentang efektivitas ekstrak biji kopi robusta terhadap PBMC yang dipapar oleh kobalt.
2. Sebagai bahan kajian dan panduan untuk penelitian selanjutnya, sehingga diharapkan dapat digunakan sebagai dasar menentukan konsentrasi paparan yang tepat terhadap PBMC. Penelitian lanjutan tersebut diharapkan dapat mengkaji lebih mendalam manfaat ekstrak biji kopi robusta sebagai antioksidan dan antiinflamasi.
3. Aplikasi dalam bidang kedokteran gigi untuk mengurangi efek toksik terhadap penggunaan perawatan gigi yang mengandung logam kobalt.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alloy Logam Kobalt

2.1.1. Pengertian Alloy

Dalam bidang kedokteran gigi logam yang digunakan untuk mengkonstruksi restorasi tidak pernah menggunakan logam tunggal, karena jika digunakan kurang memenuhi syarat fisis, mekanis, biologis, kimia dan estetis. Sifat tersebut dapat diperbaiki dengan cara mencampur beberapa logam dengan kadar yang berbeda, sehingga logam campur yang terbentuk dapat saling memperbaiki sifat-sifat logam yang merugikan. Logam campur atau paduan tersebut disebut *alloy* (Soesetijo, 2012). *Alloy* merupakan campuran yang terdiri minimal 2 logam, dan *dental alloy* biasanya mengandung 4 logam dan seringkali 6 atau lebih (Rachmawati, 2017).

2.1.2. Logam Kobalt

Kobalt (simbol kimia, Co) adalah logam transisi d-blok. Pada tabel periodik kobalt terletak diantara besi (Fe) dan nikel (Ni) (Pourret, 2016). Kobalt merupakan unsur yang terdapat secara alami dalam berbagai bentuk kimia di seluruh lingkungan kita, dimana sifat-sifat kimianya mirip dengan besi (Fe) dan nikel (Ni). Kobalt memiliki nomor atom 27. Hanya ada satu isotop stabil kobalt, yang memiliki jumlah massa atom 59 (Leysens dkk., 2017; Jomova, 2011; ATSDR, 2004).

Kobalt membentuk sejumlah garam organik dan anorganik dengan bilangan oksidasi yang paling stabil +3 [Co(III)] dan +2 [Co(II)] (Jomova, 2011). Keadaan oksidasi yang umum untuk senyawa sederhana adalah Co^{2+} (Pourret, 2016). Logam kobalt biasanya dicampur dengan logam lain untuk membentuk *alloy* yang lebih keras atau lebih tahan aus dan korosi (ATSDR, 2004). Biokompatibilitas *alloy* kobalt didasarkan pada pembentukan spontan dari lapisan oksida pasif (Łukaszczyk, 2015).

Bentuk anorganik kobalt yaitu bentuk ion bersifat toksik pada tubuh manusia. Ketika terpapar dalam waktu yang lama, elemen ini bisa tersimpan pada

tubuh dan menyebabkan beberapa perubahan pada sel (Czarnek, 2015). Kobalt berpotensi beracun dalam bentuk ionik (Co^{2+}) dan bersifat sitotoksik terhadap banyak tipe sel, termasuk sel-sel saraf, dan dapat menginduksi kematian sel dengan cara apoptosis dan nekrosis (Battaglia, 2009). Ion logam seperti Ti^{4+} , Co^{2+} dan Al^{3+} telah terbukti menurunkan sintesis DNA, aktivitas dehidrogenase mitokondria, mineralisasi, dan ekspresi mRNA alkaline fosfatase (Agarwal dkk., 2014).

2.1.3. Pelepasan Ion Logam

Dental alloy di dalam rongga mulut berada pada lingkungan yang basah, bersentuhan dengan berbagai jenis ion dan mengalami perubahan pH atau suhu, keausan mekanis dan elektrokimia yang pada akhirnya dapat menyebabkan fenomena korosi (Savencu dkk., 2018). Secara biologis cairan dalam tubuh terdiri dari banyak ion klorin, natrium, kalium, fosfat, dan komponen organik. Selain itu suhu tubuh yang lebih tinggi juga perubahan pH dalam jaringan di sekitar protesa menyebabkan proses korosi logam (Czarnek, 2015).

Alloy melepaskan ion ke dalam jaringan karena korosi. Ion-ion logam yang dilepaskan dari logam pada permukaan protesa dapat memasuki aliran darah dan bersirkulasi pada tubuh dan akhirnya terakumulasi di jantung, hati, ginjal, limpa, pankreas, dan jaringan limfatik, dan hanya sebagian saja yang akan dihilangkan melalui urin. Puing-puing logam ini mungkin memiliki efek toksikologis langsung dalam waktu yang lama. Produk-produk korosi logam dapat menembus membran plasma sel, mengikat protein seluler atau enzim, dan memodulasi ekspresi sitokin (Czarnek, 2015).

Oksigen yang ada di lingkungan dapat berinteraksi dengan permukaan logam dengan membentuk lapisan oksida yang berfungsi sebagai penghalang untuk melindungi paduan dasar (*base alloy*) terhadap serangan korosif lebih lanjut. Lapisan oksida dapat larut ketika kerusakan dari paduan terus terjadi sehingga menyebabkan permukaan paduan terbuka, sehingga lebih rentan mengalami korosi (Pulikkottil dkk., 2016). Proses korosi dapat mempengaruhi biokompatibilitas dari paduan logam karena pelepasan ion logam, hal ini dapat

menyebabkan reaksi lokal seperti perubahan warna, peradangan jaringan sekitarnya atau reaksi sistemik yaitu reaksi alergi (Savencu dkk., 2018).

2.2. Respon Tubuh Manusia terhadap Paparan Logam

Alloy di dalam rongga mulut akan menghasilkan pelepasan ion logam terus menerus karena berinteraksi dengan lingkungan yang basah. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi pelepasan ion logam dalam rongga mulut, seperti pengaruh suhu, pH saliva, agen eksogen seperti tembakau dan alkohol, reaksi kekebalan tubuh yang sedang berlangsung, serta paduan logam yang berbeda (Rachmawati, 2016).

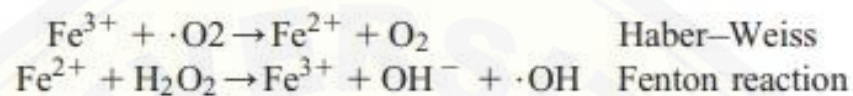
Korosi *alloy* terus-menerus terjadi karena lingkungan rongga mulut yang kompleks dan berubah-ubah karena perbedaan pola makan tiap individu. Akibatnya, ion logam dapat dilepaskan dari *alloy* dan menginduksi sitotoksitas terutama jika paparannya terjadi dalam jangka waktu yang lama. Sitotoksitas sering dianggap sebagai manifestasi pertama dari biokompatibilitas yang kurang baik, sehingga menyebabkan kematian sel dalam bentuk apoptosis atau nekrosis (Pan dkk., 2017).

2.2.1. Kobalt dan ROS

ROS adalah metabolit oksigen yang dihasilkan melalui reduksi satu elektron oksigen (Marks dkk., 2000). ROS dihasilkan dari oksigen molekuler sebagai hasil dari metabolisme sel normal. ROS dapat dibagi menjadi 2 kelompok: radikal bebas dan non-radikal. Molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan dapat memberikan reaktivitas kepada molekul lainnya disebut radikal bebas. Ketika 2 radikal bebas berbagi elektron tidak berpasangan, terbentuk non-radikal (Birben, 2012). Macam dari ROS antara lain adalah superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^\cdot), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Marks dkk., 2000).

Radikal hidroksil (OH^\cdot) adalah ROS yang paling reaktif dan menjadi inisiator dalam merusak protein, lipid, dan karbohidrat dan DNA. Radikal hidroksil juga dapat memulai peroksidasi lipid dengan mengambil elektron dari

asam lemak tak jenuh ganda (Birben, 2012; Marks dkk., 2000). Radikal hidroksil dihasilkan melalui ikatan antara hidrogen peroksida dengan logam transisi melalui reaksi Fenton (Gambar 2.1). Hidrogen peroksida (H_2O_2) dapat menimbulkan kerusakan di membran lokal yang mengandung Fe^{2+} . Anion superoksida (O_2^-) juga dapat menghasilkan radikal hidroksil dan hidroperoksi yang lebih reaktif melalui reaksi dengan hidrogen peroksida dalam reaksi Haber-Weiss (Marks dkk., 2000)



Gambar 2.1 Reaksi Haber-Weiss dan Fenton (Sumber: Birben, 2012)

Produksi radikal bebas yang terjadi secara terus-menerus, tanpa diimbangi dengan adanya antioksidan yang memadai, maka dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Dewi, 2013). Pada kondisi stres oksidatif, terjadi ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas atau ROS dengan kemampuan antioksidan alami tubuh untuk mengeliminasi, sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif jaringan. Kerusakan jaringan ini tergantung pada beberapa faktor, antara lain: target molekuler, tingkat stres yang terjadi, mekanisme yang terlibat, serta waktu dan sifat alami dari sistem yang diserang (Winarsi, 2007). Stres oksidatif dapat menginduksi ketidakseimbangan redoks seluler. Induksi dari stres oksidatif dan kerusakan pada komponen seluler, khususnya sistem perbaikan DNA, menghasilkan ketidakstabilan genom dan interupsi pertumbuhan sel dan proliferasi melalui jalur persinyalan. Beberapa logam mempromosikan beberapa jalur, seperti jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Ini melibatkan aktivasi *nuclear transcription factors* (AP-1, NF- κ B, p53) yang mengatur ekspresi gen sitoprotektif dalam relevansi dengan perbaikan DNA, respon imun, penangkapan siklus sel, dan apoptosis. *Nuclear transcription factor* AP-1 memiliki peran penting dalam pertumbuhan sel dan apoptosis. Aktivitas AP-1 diinduksi oleh MAPK kaskade sebagai respon terhadap logam tertentu, hidrogen peroksida, sitokin, dan stressor lainnya. *Nuclear transcription factor* NF- κ B

memiliki fungsi penting dalam beberapa proses, terutama respon inflamasi, transformasi sel, dan kelangsungan hidup sel (Koedrith, 2011).

Studi eksperimen mengkonfirmasi bahwa kobalt tidak hanya dapat menginterferensi proses perbaikan DNA tetapi juga bisa menginduksi langsung kerusakan DNA, DNA-protein *crosslinking*, dan pertukaran *sister-chromatid*. Hal ini menjelaskan bahwa radikal bebas yang dimediasi kobalt berkontribusi pada toksisitas kobalt (Jomova, 2011). Paparan senyawa logam dengan ukuran nanopartikel seperti kobalt dan nikel telah menyebabkan efek sitotoksik (tergantung konsentrasi) secara *in vitro* (Koedrith, 2011). ROS dapat menginduksi stres oksidatif secara *in vitro* dan *in vivo* (Guo dkk., 2016).

2.2.2. Apoptosis

Apoptosis adalah bentuk kematian sel yang terprogram secara genetik yang dapat terjadi secara fisiologis maupun patologis (Supriyadi, 2008; Pan dkk., 2017). Apoptosis disebabkan oleh suatu stimulus dengan dosis yang relatif kecil dibandingkan stimulus yang menyebabkan nekrosis (Supriyadi, 2008). Apoptosis diperlukan untuk homeostasis dari populasi sel dan pertahanan selama cedera (Guo, 2016). Melalui proses apoptosis, sel yang rusak akan dieleminasi, sedangkan sel yang masih berfungsi baik akan dibiarkan tetap berproliferasi sehingga dapat melindungi tubuh dari kerusakan (Supriyadi, 2008).

Bentuk lain dari efek sitotoksik *dental alloy* pada sel adalah apoptosis. Meskipun kematian sel apoptosis memainkan peran penting dalam pemeliharaan keadaan fisiologis normal, apoptosis juga bertanggung jawab untuk keadaan mukosa mulut yang sakit (Pan dkk., 2017). Kobalt berpotensi racun dalam bentuk ionik, Co^{2+} . Data dalam literatur menunjukkan bahwa kobalt bersifat sitotoksik terhadap banyak tipe sel, termasuk sel-sel saraf, dan dapat menginduksi kematian sel oleh apoptosis dan nekrosis (Battaglia, 2009).

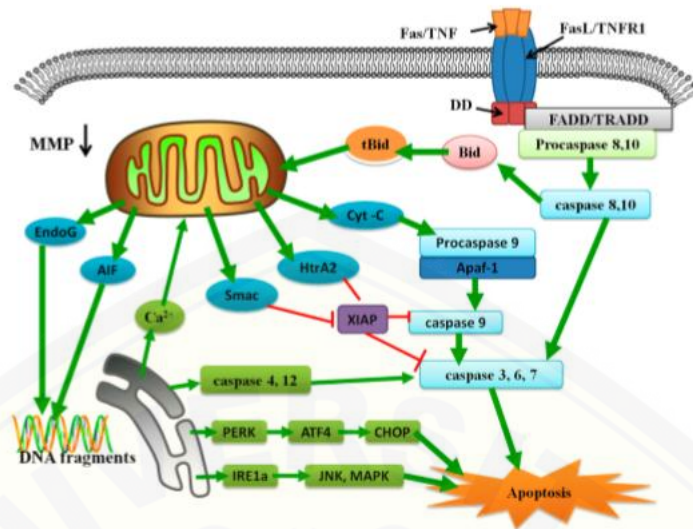
Rincian secara molekuler dari serapan Co ke dalam sel belum diketahui. Namun, kemungkinan bahwa Co diangkut ke dalam sel oleh transporter logam divalen spesifik-spesifitas. Protein yang bernama *divalent metal transporter 1* (DMT1) telah terbukti memiliki spesifisitas substrat luas yang mendukung logam

divalen termasuk Co^{2+} . Selain itu, serapan seluler Co dapat dimediasi baik oleh pompa ion transportasi aktif (yaitu, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase dan Na^+/K^+ ATPase) dan endositosis (Posada, 2015).

Ada beberapa bukti bahwa kobalt bertindak dengan mengaktifkan jalur intrinsik apoptosis, karena efeknya terhalang oleh *caspase-9-inhibitor*. Ini menunjukkan bahwa produksi ROS diinduksi oleh logam bertindak langsung pada mitokondria untuk menginduksi pelepasan sitokrom c (*cyt c*) dari membran mitokondria eksternal yang mengarah pada aktivasi *caspase 9*. Aktivasi *caspase* memainkan peran penting dalam pelaksanaan apoptosis. Selain dapat menyebabkan aktivasi *caspase*, kobalt juga dapat menyebabkan fragmentasi DNA, meningkatkan produksi ROS, fosforilasi augmentasi MAPK, dan peningkatan kadar p53 sebagai konsekuensi dari aktivasi *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) (Battaglia, 2009; Pan dkk., 2017).

Apoptosis dikontrol secara ketat oleh dua jalur utama, ekstrinsik dan intrinsik (Gambar 2.2). Jalur ekstrinsik dipicu oleh reseptor permukaan sel (*death receptor*), seperti *tumor necrosis factor* (TNF- α) sementara jalur intrinsik melibatkan jalur mitokondria. Aktivasi *caspase* memainkan peran penting dalam pelaksanaan apoptosis. *Caspase* terbagi dalam 2 grup, yaitu *caspase* inisiator (*caspase 2, 8, 9, 10*) dan *caspase* eksekutor (*caspase 3, 6, 7*). *Caspase 3* adalah bentuk utama yang aktif dalam apoptosis dan merupakan faktor kunci dari eksekusi apoptosis. Selain itu, *Caspase 9* adalah inisiator *caspase* dari jalur intrinsik (Pan dkk., 2017).

Jalur ekstrinsik terjadi apabila sinyal apoptosis yang diterima oleh *death receptor* cukup kuat. Kombinasi ligan (FasL/TNFR1) dan *death receptor* (Fas/TNF) memulai jalur apoptosis ekstrinsik. Pengikatan ini dapat menarik kombinasi FADD, TRADD dan *procaspase 8*. *Caspase 8* yang teraktivasi kemudian mengaktifkan *downstream effector caspase* atau *truncates Bid* (tBid). tBid dapat mengganggu mitokondria, dan kemudian menginduksi apoptosis mitokondria (Guo dkk., 2016).



Gambar 2.2 Jalur ekstrinsik dan instrinsik pada apoptosis
(Sumber: Guo dkk., 2016)

Jalur intrinsik mediasi mitokondria menghasilkan sitokrom c (*cyt c*) dari ruang intermembran mitokondria dan *apoptosis inducing factor* (AIF) dilepaskan ke sitoplasma (Sari, 2018; Guo, 2016). Pelepasan tersebut diatur oleh famili Bcl-2 yang terikat dengan mitokondria, yaitu Bax dan Bad. Sitokrom c yang keluar ke sitoplasma kemudian berikatan dengan Apaf-1 membentuk *Caspase Recruitment Domain* (CARD). Beberapa CARD bergabung membentuk kompleks apoptosom kemudian mengikat *procaspase* 9 dan mengaktifkan menjadi *caspase* 9 (*caspase* inisiator) (Sari, 2018). *Caspase* 9 akan mengaktifasi *procaspase* 3 menjadi *caspase* 3 dan mengaktifkan *caspase* 6 dan 7 yang kemudian menginduksi apoptosis (Sari, 2018; Guo, 2016).

2.3. PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

Sel mononuklear perifer (PBMC) merupakan bagian dari sel-sel darah yang beinti bulat. PBMC terdiri dari sel monosit (10-20%), sel T (50-70%), sel B (5-15%), sel NK (2-10%), dan sel dendritik. PBMC memainkan peran penting dalam sistem kekebalan tubuh dan terjadinya inflamasi (Koncarevic dkk., 2014). Pada individu sehat, sel-sel ini beredar dalam keadaan diam memantau potensi kejadian yang berkaitan dengan sistem kekebalan tubuh. Saat menghadapi

berbagai kelainan yang menimbulkan respon inflamasi, sel-sel ini ditargetkan untuk menghilangkan patogen potensial tersebut. Namun ternyata hal ini juga dapat menyebabkan efek samping dan gejala yang parah (Haudek-Prinz dkk., 2012).

Aktivasi inflamasi melibatkan beberapa fungsi biologis seperti migrasi leukosit, proliferasi sel T, respons interferon, pensinyalan NF- κ B dan regulasi kematian sel. Selanjutnya, masing-masing sel ini bekerja pada keadaan fungsional yang berbeda. Sel T yang diaktivasi saat terjadi kerusakan jaringan yang terkait dengan peradangan kronis dan autoimun. Monosit bertindak sebagai regulator penting aktivitas sel T. Setelah monosit bertemu dengan patogen potensial, sel ini menjadi aktif dan berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag memfagositosis dan menghasilkan protein pada permukaan sel yang dapat menginduksi pengaktifan sel T yang ditargetkan. Sel T yang diaktivasi pada gilirannya dapat mengaktifkan sel endotel, fibroblas dan monosit/makrofag sehingga mempertahankan keadaan peradangan akut atau kronis (Haudek-Prinz dkk., 2012).

Dalam beberapa tahun terakhir PBMC digunakan sebagai penanda beberapa penyakit. Sebagai contoh, data *in vitro* menggambarkan respon PBMC saat berkontak dengan sel-sel berpenyakit. PBMC diperoleh relatif mudah dari sampel darah pasien. Sel-sel ini menyediakan akses langsung ke protein yang relevan secara fisiologis (tanpa kekebalan) tanpa adanya kesulitan membedakan dari plasma manusia asli yang memiliki protein yang sangat melimpah (Koncarevic dkk., 2014).

2.4. Kopi Robusta

Tanaman kopi termasuk dalam genus *Coffea* dengan famili *Rubiaceae*. Famili tersebut memiliki banyak genus, yaitu *Gardenia*, *Ixora*, *Cinchona*, dan *Rubia*. Genus *Coffea* mencakup hampir 70 spesies, tetapi hanya ada dua spesies yang ditanam dalam skala luas di seluruh dunia, yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora* var. *robusta*) (Rahardjo, 2012). Kopi robusta merupakan jenis kopi yang paling banyak diproduksi karena

memiliki adaptasi yang lebih baik dibandingkan kopi arabika. Sebagian besar kopi Indonesia merupakan kopi jenis robusta karena lebih mudah ditanam dibandingkan kopi arabika serta tingkat produktivitas yang tinggi (Panggabean, 2011).

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

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

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

Tanaman kopi mempunyai batang tegak, bercabang dan tingginya bisa mencapai 12 m. Tanaman ini mempunyai beberapa jenis cabang yang sifat dan fungsinya berbeda. Cabang yang tumbuhnya tegak dan lurus disebut cabang reproduksi. Cabang ini berasal dari tunas reproduksi yang terdapat di setiap ketiak daun pada cabang utama atau cabang primer. Cabang ini memiliki sifat seperti batang utama. Jika batang utama mati, fungsinya dapat digantikan oleh batang reproduksi (Suwanto dkk., 2014). Daun kopi berwarna hijau mengkilap yang tumbuh berpasangan dengan berlawanan arah. Bentuk daun tanaman kopi lonjong dengan tulang daun yang tegas (Gambar 2.3) (Rahardjo, 2012).



Gambar 2.3 Tanaman kopi robusta (Sumber: Panggabean, 2011)

Buah kopi tersusun dari kulit buah (*epicarp*), daging buah (*mesocarp*), dan kulit tanduk (*endocarp*). Buah yang terbentuk akan matang dalam 7-12 bulan. Setiap buah kopi memiliki dua biji kopi. Biji kopi dibungkus kulit keras disebut kulit tanduk (*parchment skin*). Biji mempunyai alur pada bagian datarnya (Rahardjo, 2012). Kulit luar terdiri dari satu lapisan yang tipis, buah yang masih muda bewarna hijau tua yang kemudian berangsur-angsur berubah menjadi hijau kuning dan akhirnya menjadi merah sampai merah hitam kalau buah itu telah masak sekali. Dalam keadaan yang sudah masak, daging buah berlendir dan rasanya agak manis. Keadaan kulit bagian dalam, yaitu *endocarpanya* cukup keras dan kulit ini biasanya disebut kulit tanduk. Pada permukaan biji yang datar, terdapat saluran yang arahnya memanjang dan dalam, merupakan celah lubang yang panjang, sepanjang ukuran biji. Sejajar dengan saluran itu, terdapat pula satu lubang yang berukuran sempit, dan merupakan satu kantong yang tertutup. Di sebelah bawah dari kantong itu terdapat lembaga (*embryo*) dengan sepasang daun yang tipis dan dasar akar. Kedua bagian ini berwarna putih (Gambar 2.9) (Ridwansyah, 2003).

2.4.2. Komposisi Kimia Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Komposisi kimia dari biji kopi bergantung pada spesies dan varietas dari kopi tersebut serta faktor-faktor lain yang berpengaruh antara lain lingkungan tempat tumbuh, tingkat kematangan dan kondisi penyimpanan (Panggabean, 2011). Pohon kopi robusta lebih kuat, lebih tahan terhadap hama dan penyakit,

dan tidak terlalu bergantung pada iklim dibandingkan pohon kopi arabika. Kopi robusta juga mengandung jumlah antioksidan dan kafein yang lebih tinggi (Farah, 2012).

Senyawa-senyawa kimia pada biji kopi dapat dibedakan atas senyawa volatil dan non volatil. Senyawa volatil adalah senyawa yang mudah menguap, terutama jika terjadi kenaikan suhu. Senyawa volatil yang berpengaruh terhadap aroma kopi antara lain golongan aldehid, keton dan alkohol. Senyawa non volatil yang berpengaruh terhadap mutu kopi antara lain kafein, asam klorogenat, hidrokarbonalifatik, asam, alkohol, tiol, furan, piro, piridin, quinon, fenol (asam alifatik) dan amin aromatik (Ramanaviciene dkk., 2003). Kandungan kafein dan asam klorogenat pada *green coffee* robusta dua kali lipat lebih tinggi dari pada *green coffee* arabika (Tabel 2.1).

Tabel 2.1 Perbedaan kandungan kimia pada biji kopi Arabika dan Robusta

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

(Sumber : Farah, 2012)

Biji kopi secara alami mempunyai kandungan seperti kafein, senyawa fenolik, trigonellin, dan asam klorogenat yang memiliki aktifitas sebagai anti bakteri dan anti-inflamasi. Kemampuan ekstrak biji kopi robusta sebagai antiinflamasi yakni oleh karena kandungan yang terdapat pada biji kopi yakni kadar kafein 2%, minyak atsiri 10-16%, asam klorogenat 6-10%, zat gula 4%, selulosa 22-27%, polifenol 0,2%. Kandungan asam klorogenat dan kafein yang terdapat pada ekstrak biji kopi robusta dapat berfungsi sebagai antioksidan yang dapat menetralkan ROS (Ermawati, 2015). Asam klorogenat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kafein karena asam klorogenat memiliki banyak gugus hidroksil yang berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan (Sukohar, 2011).

Kandungan lain yang terdapat pada ekstrak biji kopi robusta adalah adanya polifenol dan flavonoid. Polifenol merupakan antioksidan kuat dan dapat melindungi sel imun dari kerusakan biologis akibat radikal bebas. Polifenol terbukti mampu mencegah peningkatan produksi sitokin inflamasi (IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α) oleh sel makrofag dan limfosit yang teraktivasi oleh radikal bebas (Ermawati, 2015). Fenol berperan sebagai *scavenger* (pemakan) radikal peroksil karena fenol memiliki struktur molekul penting yaitu cincin dan gugus hidroksil yang mengandung hidrogen yang dapat berpindah. Selain itu, kemampuan fenol juga diketahui dapat mengurangi radikal bebas melalui pembentukan *chelate* dengan ion-ion yang bervalensi dua seperti logam Cu, Fe, Zn dan Mn yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid (Yuslianti, 2018).

Flavonoid secara langsung mampu menangkap ROS, dapat menghambat enzim-enzim yang berperan dalam menghasilkan anion superoksida, serta mencegah proses peroksidasi dengan mengurangi radikal aloksil dan peroksil (Yuslianti, 2018). Mekanisme flavonoid dalam menghambat proses inflamasi adalah dengan menghambat permeabilitas kapiler, menghambat metabolisme asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom sel neutrofil dan sel endotel. Flavonoid memainkan peran penting dalam mempertahankan dan meningkatkan permeabilitas resistansi pembuluh darah kapiler. Oleh karena itu, flavonoid

digunakan dalam kondisi patologis seperti gangguan permeabilitas dinding pembuluh darah (Dewanti dkk. 2016).

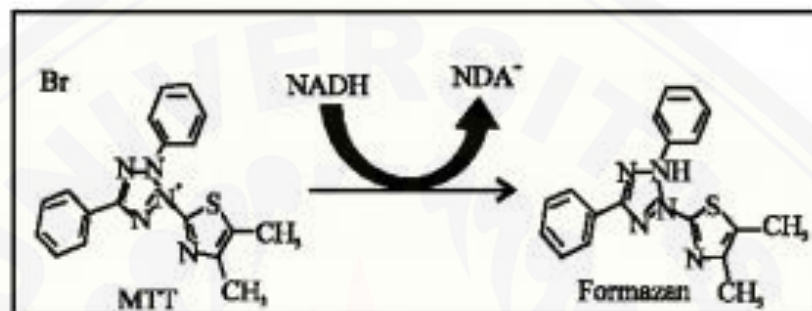
2.5. Uji Viabilitas

2.5.1. Uji MTT

Uji MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide*) adalah salah satu uji kolorimetri yang paling umum digunakan untuk menilai sitotoksitas atau viabilitas sel (Aslanturk, 2017). Tujuan umum MTT adalah untuk mengukur sel yang hidup di seluruh sumur (*96-well plates*) ditinjau dari aktivitas mitokondrianya tanpa memerlukan penghitungan sel yang rumit (Meerlo dkk., 2011). Prinsip metode MTT adalah didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk membentuk garam formazan tidak larut berwarna ungu dari reaksi reduksi tetrazolium yang sifatnya larut dalam air berwarna kuning. Reduksi garam tetrazolium terjadi secara intraseluler dan berhubungan dengan adanya enzim *succinic dehidrogenase* yang dihasilkan oleh mitokondria (Siregar, 2000). Enzim *succinic dehidrogenase* merupakan enzim yang berperan dalam siklus asam sitrat (siklus Krebs, siklus asam trikarboksilat) yang merupakan serangkaian reaksi di mitokondria untuk mengoksidasi gugus asetil pada asetil-KoA dan mereduksi koenzim yang teroksidasi melalui rantai transpor elektron yang berhubungan dengan pembentukan ATP (Murray dkk., 2009).

MTT direduksi menjadi formazan ungu oleh NADH (Aslanturk, 2017). Selama proses reduksi, NADH direduksi menjadi NAD⁺ yang kemudian dapat mengubah MTT menjadi formazan (Gambar 2.4) (Riss dkk., 2013). Produk formazan yang terbentuk akan dilarutkan oleh bahan pelarut dan intensitas warna diukur dengan spektrofotometer. Pengukuran intensitas warna dilakukan dengan menggunakan *ELISA reader*. Untuk mengukur intensitas warna digunakan pembaca *96-well plates*. Jumlah formazan yang dihasilkan dan kemudian diukur setelah dilarutkan, berbanding secara proporsional dengan jumlah sel hidup. Makin pekat warnanya, makin tinggi nilai absorbansinya, dan ini berarti makin banyak jumlah sel hidup (Siregar, 2000). Ketika sel mati, mereka kehilangan kemampuan untuk mengubah MTT menjadi formazan, sehingga pembentukan

warna berfungsi sebagai penanda sel-sel yang hidup (Riss dkk., 2013). Bahan pelarut formazan *dimethylsulfoxide* (DMSO) dan minyak mineral memberi karakteristik absorpsi yang lebih baik dibandingkan asam isopropil alkohol. Selain itu juga ditemukan panjang gelombang yang paling tepat untuk pengukuran absorbansi bergantung pada jenis pelarut yang digunakan dan faktor perlekatan sel terhadap substrat (Siregar, 2000).



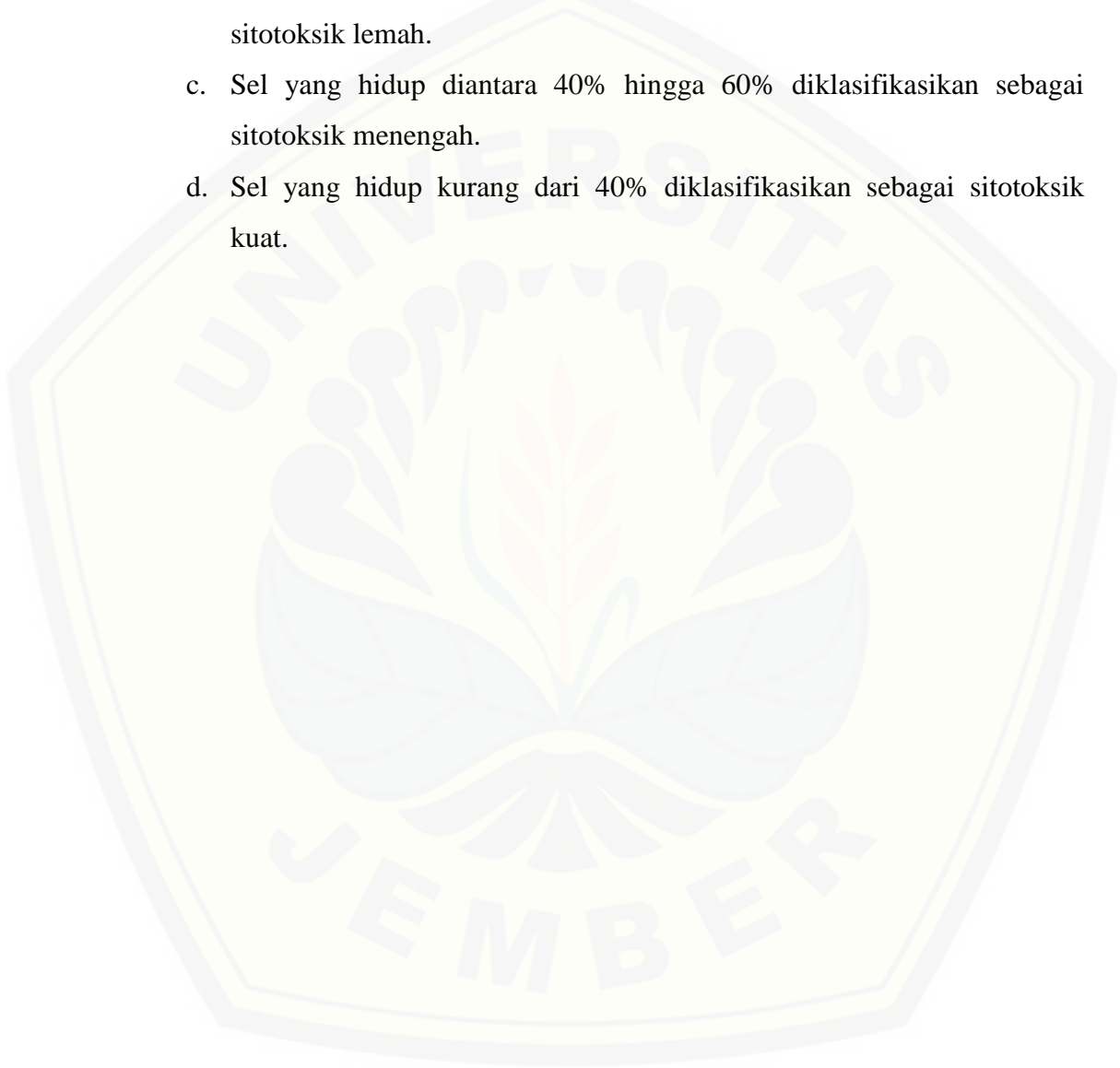
Gambar 2.4 Reaksi reduksi MTT menjadi formazan (Sumber: Riss dkk., 2013)

Keuntungan uji MTT ini memiliki kemampuan untuk mendeteksi secara akurat 200 hingga 100.000 sel per sumur, mudah digunakan, aman, memiliki reproduksibilitas tinggi, dan banyak digunakan untuk menentukan viabilitas sel. Sedangkan kekurangannya formazan yang terbentuk bersifat tidak larut dalam air dan membentuk kristal berbentuk jarum ungu di dalam sel, konversi menjadi kristal formazan bergantung pada tingkat metabolisme dan jumlah mitokondria karena beberapa sel yang hidup mungkin memiliki aktivitas metabolisme rendah sehingga dapat mengganggu hasil. Masalah penting lainnya dalam uji MTT adalah lamanya waktu inkubasi karena tergantung pada jenis sel dan senyawa yang dipaparkan. Inkubasi singkat kadang-kadang menghasilkan formazan terlalu sedikit dan ini memberikan hasil yang tidak akurat. (Alfraidi, 2018; Aslanturk, 2017).

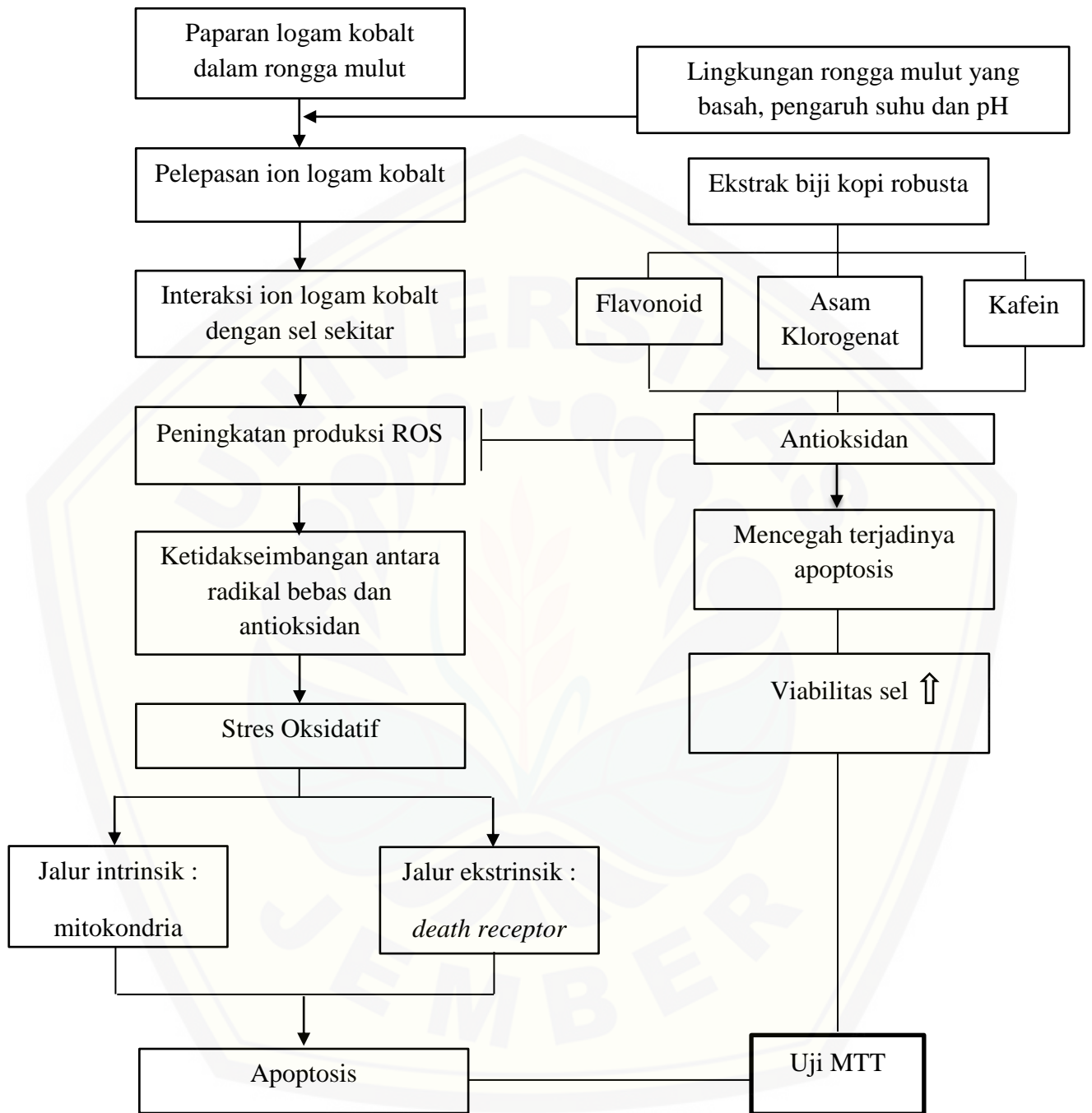
2.5.2. Tingkat Toksisitas

Menurut Garcia (2014) tingkat toksisitas suatu bahan dikelompokkan berdasarkan jumlah sel yang hidup/sel yang *viable* yaitu:

- a. Sel yang hidup lebih dari 80% diklasifikasikan sebagai non-toksik.
- b. Sel yang hidup diantara 60% hingga 80% diklasifikasikan sebagai sitotoksik lemah.
- c. Sel yang hidup diantara 40% hingga 60% diklasifikasikan sebagai sitotoksik menengah.
- d. Sel yang hidup kurang dari 40% diklasifikasikan sebagai sitotoksik kuat.



2.6. Kerangka Konsep



Keterangan :
 Menyebabkan : →
 Menghambat : |—

Gambar 2.5 Kerangka konsep penelitian

2.7. Penjelasan Kerangka Konsep

Logam kobalt merupakan logam yang biasanya digunakan sebagai *alloy* untuk perawatan di bidang kedokteran gigi. Paparan kobalt di dalam rongga mulut akan menghasilkan pelepasan ion logam terus menerus karena berinteraksi dengan lingkungan yang basah dan beberapa faktor yang dapat mempengaruhi pelepasan ion logam dalam rongga mulut yaitu pengaruh suhu dan pH saliva. Ion logam kobalt akan berinteraksi dengan sel sekitar sehingga dapat menyebabkan peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS). ROS merupakan salah satu radikal bebas yang akan mengikat elektron dari senyawa lain di sekitarnya. Produksi radikal bebas yang meningkat, tanpa diimbangi dengan adanya antioksidan yang memadai, maka dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menginduksi terjadinya apoptosis. Apoptosis dikontrol secara ketat oleh dua jalur utama, ekstrinsik dan intrinsik. Jalur ekstrinsik dipicu oleh reseptor permukaan sel (*death receptor*), seperti *tumor necrosis factor* (TNF- α) sementara jalur intrinsik melibatkan jalur mitokondria.

Peningkatan produksi ROS dapat dihambat dengan antioksidan. Sumber antioksidan bisa berasal dari endogen dan eksogen. Antioksidan eksogen merupakan antioksidan yang didapat dari luar tubuh. Kopi merupakan salah satu tanaman yang memiliki kandungan antioksidan, yaitu flavonoid, asam klorogenat dan kafein. Kandungan antioksidan dalam kopi diharapkan dapat menghambat produksi ROS yang terjadi pada sel akibat paparan dari logam kobalt. Produksi ROS yang dihambat oleh antioksidan kopi dapat mencegah terjadinya apoptosis sehingga meningkatkan viabilitas sel. Metode yang digunakan untuk uji viabilitas adalah dengan metode MTT

2.8. Hipotesis

Ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) pada konsentrasi optimal efektif dapat meningkatkan viabilitas PBMC yang dipapar logam kobalt.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris *in vitro*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design*, yaitu melakukan pengamatan setelah diberi perlakuan dan hasilnya dibandingkan dengan kontrol (Notoatmodjo, 2010).

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1. Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan November-Desember 2018.

3.2.2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di:

1. Laboratorium Tanaman Fakultas Pertanian Politeknik Negeri Jember
2. Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember
3. Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember

3.3. Identifikasi Variabel

3.3.1. Variabel Bebas

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

3.3.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah viabilitas PBMC.

3.3.3. Variabel Terkendali

- a. Isolat PBMC dari pasien sehat
- b. Konsentrasi larutan logam $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

3.4. Sampel Penelitian

3.4.1. Kriteria Sampel

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

3.4.2. Kelompok Sampel

Sampel penelitian dibagi menjadi 8 kelompok, sebagai berikut:

- a) Kelompok 1 : PBMC sebagai kelompok kontrol negatif.
- b) Kelompok 2 : PBMC yang dipapar dengan larutan logam $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 125 μM sebagai kelompok kontrol positif.
- c) Kelompok 3 : PBMC yang dipapar dengan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 31,25 $\mu\text{g/ml}$ sebagai kelompok kontrol positif.
- d) Kelompok 4 : PBMC yang dipapar dengan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 62,5 $\mu\text{g/ml}$ sebagai kelompok kontrol positif.
- e) Kelompok 5 : PBMC yang dipapar dengan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ sebagai kelompok kontrol positif.
- f) Kelompok 6 : PBMC yang dipapar dengan larutan logam $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 125 μM dan ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 31,25 $\mu\text{g/ml}$ sebagai kelompok perlakuan.
- g) Kelompok 7 : PBMC yang dipapar dengan larutan logam $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 125 μM dan ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 62,5 $\mu\text{g/ml}$ sebagai kelompok perlakuan.
- h) Kelompok 8 : PBMC yang dipapar dengan larutan logam $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ konsentrasi 125 μM dan ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ sebagai kelompok perlakuan.

3.4.3. Besar Sampel

Besar sampel pada penelitian ini diambil menurut rumus (Daniel, 2005):

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

Keterangan :

n= Besar sampel tiap kelompok

σ = Standar deviasi sampel

d= Kesalahan yang masih dapat ditolerir

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

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

Perhitungannya yaitu:

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

$$n \geq 3,84$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini lebih dari sama dengan 4. Peneliti menggunakan 6 (enam) sampel untuk setiap perlakuan.

3.5. Definisi Operasional

3.5.1. Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Ekstrak biji dari buah kopi robusta merupakan suspensi dari serbuk biji kopi robusta. Biji kopi robusta diperoleh dari perkebunan PTPN XII Durjo Kabupaten Jember. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta menggunakan metode maserasi, yaitu sediaan cair yang dibuat dengan mengencerkan bubuk biji kopi robusta dengan etanol 96%. Kemudian dilakukan pengenceran, sehingga diperoleh konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$ dan 31,25 $\mu\text{g/ml}$.

3.5.2. Larutan Logam Kobalt

Larutan logam kobalt merupakan senyawa yang berbentuk larutan kobalt (II) klorida heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) sebagai *metal allergen*. Pada penelitian

Rachmawati tahun 2013 menunjukkan bahwa konsentrasi non-toksik logam CoCl_2 adalah $125 \mu\text{M}$ yang dilarutkan dalam *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI).

3.5.3. Viabilitas PBMC

Viabilitas adalah kemampuan PBMC untuk bertahan hidup setelah diinkubasi dengan ekstrak biji kopi robusta dan dipapar dengan larutan logam kobalt. *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) merupakan bagian dari sel-sel darah yang beinti bulat. PBMC terdiri dari sel monosit, sel T, sel B, sel *natural killer* (NK), dan sel dendritik. PBMC diisolasi dari darah vena perifer pasien donor sehat yang diketahui tidak memiliki alergi logam dengan metode *Single Filter/Lymphoprep*. Uji viabilitas yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji MTT. Uji MTT didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi formazan yang berwarna biru-ungu. Jumlah sel yang hidup dapat diukur menggunakan *ELISA reader* pada densitas optik (OD) 630 nm.

3.6. Alat dan Bahan

3.6.1. Alat

Autoclave, Centrifuge, Gelas ukur, Blender, Hemositometer, Humaroller, Inkubator, Shaker Incubator, Laminar Flow Cabinet, Lampu spiritus, Microplate-96 well, Mikroskop inverted, Oven, Pipet mikro, Rak Tabung, Syringe 6 ml, Tabung epondorf, Tabung Falcon, Tabung heparin, Neraca Timbang, Rotary Evaporator, Vortex, Blue tip dan yellow tip

3.6.2. Bahan

Darah vena perifer, Larutan logam $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Larutan *Lymphoprep*, Ekstrak Biji Kopi Robusta, HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*), RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Media*), DMSO (*Dimethylsulfoxide*), Alkohol 70%, Aquades, MTT (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5 diphenyl tetrazolium bromide*), PBS (*Phospat Buffered Saline*)

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. *Ethical Clearance*

Sebelum dilaksanakan penelitian, prosedur pengambilan darah pada pasien telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. No. 103/UN25.8/KEPK/DL/2018

3.7.2. Sterilisasi Alat

Semua alat penelitian yang terbuat dari logam dicuci bersih kemudian disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121⁰C. Sedangkan alat yang terbuat dari plastik disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%.

3.7.3. Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta

Pembuatan ekstrak biji kopi dilakukan menggunakan biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang diperoleh dari perkebunan PTPN XII Durjo Kabupaten Jember. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta dilakukan di laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Biji kopi yang telah dikumpulkan dibersihkan dari pengotor, selanjutnya dicuci di bawah air mengalir sampai bersih, ditiriskan, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Sampel yang telah kering diserbukkan dengan menggunakan blender, serbuk yang dihasilkan diayak menggunakan ayakan mesh 65 hingga diperoleh serbuk yang halus dan seragam. Hasilnya dimasukkan ke dalam wadah gelas tertutup.

Pembuatan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dilakukan dengan menggunakan teknik maserasi. Serbuk biji kopi robusta ditimbang sebanyak 250 gram menggunakan neraca timbang lalu dimaserasi dalam larutan etanol 96% sebanyak 1000 ml selama 48 jam. Wadah ditutup dengan aluminium foil.

Hasil maserasi kemudian disaring dengan menggunakan corong yang dilapisi kertas saring sehingga menghasilkan filtrat 1 dan ampas 1. Ampas 1 disaring menggunakan kertas saring menghasilkan filtrat 2 dan ampas 2. Filtrat 1 dan 2 digabungkan, lalu dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 30-40⁰C, sehingga diperoleh ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 100%. Ekstrak disimpan dalam wadah gelas tertutup. Ketika akan digunakan, ekstrak diencerkan

dengan media kultur RPMI sehingga didapatkan konsentrasi 125 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 31,25 µg/ml (Tanauma dkk., 2016).

3.7.4. Pengenceran Ekstrak Biji Kopi Robusta

Membuat stok larutan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 250 µg/ml (0,25 mg/ml) dengan cara mencampurkan pasta ekstrak biji kopi robusta dengan media kultur RPMI. Apabila stok dibuat 10 ml maka menimbang 2,5 mg pasta ekstrak biji kopi robusta. Kemudian ekstrak diencerkan dengan media kultur RPMI sehingga didapatkan konsentrasi 125 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 31,25 µg/ml.

Pengenceran konsentrasi larutan menggunakan rumus:

$$V_1M_1=V_2M_2$$

Keterangan:

V_1 : Volume awal larutan

M_1 : Konsentrasi awal larutan

V_2 : Volume akhir larutan

M_2 : Konsentrasi akhir larutan

3.7.5. Pengambilan Sampel Darah

Melakukan pengambilan darah sebanyak 6 ml dari darah vena perifer orang sehat dengan menggunakan *syringe*. Segera setelah diambil, dimasukkan ke dalam tabung heparin secara perlahan-lahan dengan melewati pada dinding tabung agar tidak berbuih kemudian tabung digoyangkan agar tidak menggumpal (Bening, 2019).

3.7.6. Isolasi PBMC

Teknik isolasi PBMC ini menggunakan metode *Single Filter/Lymphoprep*. Isolasi sel PBMC dimulai dengan memasukkan 6 ml sampel darah pada tabung heparin lalu campur sampai merata secara perlahan-lahan dengan melewati pada dinding tabung agar tidak berbuih menggunakan mikropipet dan *blue tip*. Lalu darah tersebut dimasukkan pada tabung yang sudah diisi 3 ml larutan *lymphoprep* menggunakan perbandingan *lymphoprep* dengan diluen darah adalah 1:2. Dimasukkan melalui dinding tabung secara perlahan, larutan *lymphoprep* jangan sampai pecah. Kemudian sentrifugasi pada kecepatan 2100 rpm selama 30

menit pada suhu 20⁰C hingga terbentuk 4 lapisan (plasma, mononuklear, *lymphoprep*, polimorfonuklear eritrosit). Lalu pipet lapisan ke 2 mononuklear (cincin kabut) secara hati-hati dan masukkan pada tabung steril, kemudian mengencerkan sampel mononuklear menggunakan PBS/HBSS (1:1), lalu homogenkan. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1700 rpm selama 10 menit dengan suhu 20⁰C. Terbentuk 2 lapisan, lapisan supernatan (PBS/HBSS dan sisa plasma) pada bagian atas dan lapisan pelet (PBMC) pada bagian bawah. Supernatan dibuang dan disisakan lapisan PBMC (Bening, 2019).

3.7.7. Prosedur Penempelan Sel

Menyiapkan 96-well plate. Meneteskan *suspense* sel dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37⁰C selama 20 menit. Menambahkan media kultur RPMI, lalu inkubasi lagi selama 20-30 menit pada suhu 37⁰C. Mengamati *suspense* sel di bawah mikroskop *inverted* sembari menggoyang perlahan sehingga dapat dilihat penempelan selnya. Mencuci *suspense* sel dengan RPMI sebanyak 3 kali dengan tujuan menghilangkan kontaminasi pada sel dan sel kembali diamati dibawah mikroskop *inverted*. Setelah sel bebas dari kontaminasi, diamkan selama 15 menit lalu sel siap untuk dilakukan perlakuan (Bening, 2019).

3.7.8. Inkubasi PBMC

Menambahkan 20 µl PBMC dengan 200 µl media kultur RPMI ke dalam masing-masing sumuran 96-microwell plate. Kemudian inkubasi dalam *incubator shaker* pada suhu 37⁰C selama 3 jam sebelum dilakukan uji MTT.

3.7.9. Inkubasi PBMC dengan Logam Kobalt

Logam CoCl₂.6H₂O ditambahkan dengan media kultur RPMI sehingga didapatkan konsentrasi 125 µM. Menambahkan 20 µl PBMC dipaparkan dengan 200 µl larutan logam CoCl₂.6H₂O konsentrasi 125 µM pada 96-microwell plate. Menginkubasi sel pada suhu 37⁰C di 5% kelembapan CO₂ selama 3 jam sebelum dilakukan uji MTT.

3.7.10. Inkubasi PBMC dengan Ekstrak Biji Kopi Robusta

Penambahan 20 μl dari PBMC dipaparkan dengan 200 μl ekstrak biji kopi robusta dengan 3 konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 31,25 $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi 62,5 $\mu\text{g/ml}$ dan konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ yang telah dicampur dengan media kultur RPMI pada 96-*microwell plate*. Menginkubasi sel pada suhu 37⁰C di 5% kelembapan CO₂ selama 3 jam sebelum dilakukan uji MTT.

3.7.11. Inkubasi PBMC dengan Ekstrak Biji Kopi Robusta dan Logam Kobalt

Perlakuan dilakukan dengan menambahkan 20 μl PBMC dipaparkan dengan 100 μl ekstrak biji kopi robusta dengan 3 konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 31,25 $\mu\text{g/ml}$, konsentrasi 62,5 $\mu\text{g/ml}$ dan konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ yang telah dicampur dengan media kultur RPMI. Kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 1 jam. Setelah itu dipaparkan dengan 100 μl larutan logam CoCl₂.6H₂O konsentrasi 125 μM yang telah dicampur media kultur RPMI dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 3 jam sebelum dilakukan uji MTT.

3.7.12. Uji MTT

Stok MTT dilarutkan dalam PBS sehingga didapatkan konsentrasi 7,5 mg/ml. PBMC dengan konsentrasi 5x10⁶ yang telah ditambahkan perlakuan selanjutnya membuang media kultur dan menambahkan 50 μl larutan MTT ke dalam tiap sumuran 96-*microwell plate*. Inkubasi di dalam gelap dengan cara membungkus *plate* dengan aluminium foil. Menginkubasi *plate* selama 4 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C. Setelah itu menghentikan kerja MTT dengan menambahkan 50 μl *dimethylsulfoxide* (DMSO) agar kristal formazan terlarut, kemudian digetarkan di atas *plateshaker* selama 30-60 menit. Selanjutnya menghidupkan ELISA *reader*, tunggu proses *progressing* hingga selesai. Membuka pembungkus *plate* dan tutup *plate*, kemudian memasukkan *plate* ke dalam ELISA *reader*. Melakukan pembacaan ELISA dengan *optical density* (OD) 630 nm. PBMC tanpa dipapar logam dianggap 100% (CCRC, 2010; Siregar, 2000).

3.7.13. Pengamatan Hasil

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

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

Keterangan:

% Viabilitas sel : Persentase jumlah kehidupan sel setelah diuji

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

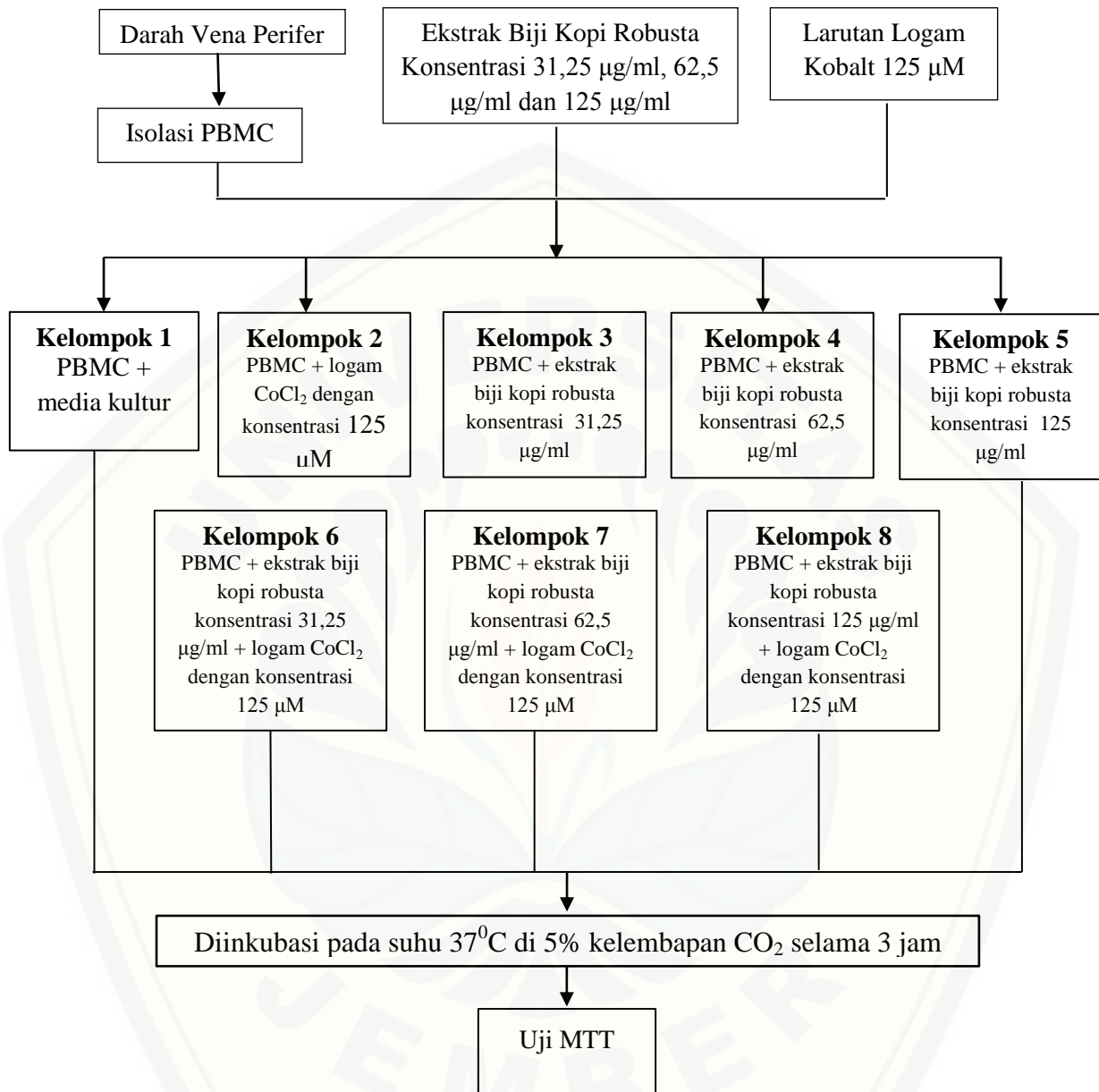
Absorbansi media : Nilai OD formazan pada rata-rata setiap kontrol media.

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

3.8. Analisis Data

Dalam penelitian ini data yang didapatkan yaitu rata-rata jumlah sel PBMC yang hidup. Selanjutnya dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan uji *Levene-test*. Data yang dihasilkan terdistribusi normal dan tidak homogen, maka dilakukan uji statistik non parametrik, yaitu *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Semua data diuji statistik dengan menggunakan program statistik GraphPad Prism Software versi 8.0 (San Diego, CA, USA). $P \leq 0.05$ dianggap signifikan secara statistik. Semua data disajikan sebagai rata-rata \pm SD.

3.9. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji kopi robusta dapat meningkatkan viabilitas PBMC yang dipapar kobalt. Konsentrasi optimal yang efektif pada penelitian ini yaitu 125 µg/ml.

5.2 Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai kandungan zat aktif dari ekstrak biji kopi robusta yang berperan sebagai antioksidan dan tidak menimbulkan efek toksik pada PBMC.
2. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas ekstrak biji kopi robusta dalam meningkatkan viabilitas PBMC yang dipapar kobalt dengan metode *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., A. Tyagi, A. Ahuja, N. Kumar, N. De, dan H. Bhutani. 2014. Corrosion aspect of dental implants—An overview and literature review. *Journal of Stomatology*, 4, 56-60
- Agency for Toxicological Substances and Disease Registry (ATSDR), 2004. *Toxicological Profile for Cobalt*. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Akbar, M., J. M. Brewer, dan M. H. Grant. 2011. Effect of Chromium and Cobalt Ions on Primary Human Lymphocytes in vitro. *Journal of Immunotoxicology*, 8(2): 140–149
- Alfraidi, A. dan T. C. Fagundes. 2018. Cell-based Cytotoxicity Methods. *Journal of Apitherapy and Nature*
- Aslanturk, O. Z. 2017. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *IntechOpen*
- Battaglia, V., A. Compagnone, A. Bandino, M. Bragadin, C. A. Rossi, F. Zanetti, S. Colombatto, M. A. Grillo, dan A. Toninello. 2009. Cobalt Induces Oxidative Stress In Isolated Liver Mitochondria Responsible For Permeability Transition And Intrinsic Apoptosis In Hepatocyte Primary Cultures. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41: 586–594.
- Birben, E., U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, dan O. Kalayci. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal* 5: 9–19.
- Bening, F. N. 2019. Efektifitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dalam Menghambat Efek Toksik Senyawa Nikel pada PBMC. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi: Universitas Jember
- Budirahardjo, R. 2016. Peningkatan Viabilitas Monosit Oleh Biji Kopi Robusta terhadap *Streptococcus mutans*. *Proceeding Book the 9th Natinal Scientific Meeting Indonesia Pediatric Dentist Association*. Universitas Jember
- CCRC. 2010. Standard Operating Procedure. *Cancer Chemoprevention Research* Cancer Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
- Czarnek, K., S. Terpiłowski, dan A. K. Siwicki. 2015. Selected Aspects Of The Action Of Cobalt Ions In The Human Body. *Central European Journal Immunology* 40(2): 236-242.

- Daniel, W. 2005. *Biostatistics Foundation for Analysis in the Health Sciences 8 th Edition*. Georgia: Wiley
- Dewanti, I. D. A. R., I. D. A. Susilawati, P. Endah, dan R. Budirahardjo. 2016. Robusta Coffee Beans Decrease of Inflammation in Dental Caries. *UNEJ e-Proceeding, [S.l.]*, p. 173-176
- Dewi, A. 2013. Peranan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dari Mitokondria pada Resistensi Silang (*Cross-Resistance*) antara Radiasi dan Docetaxel. *Tesis*. Program Studi Magister IKM Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran.
- El-Nabi, S. H. E., G. T. M. Dawoud, I. M. El-Garawani, dan S. S. El-Shafey. 2018. HPLC Analysis of Phenolic Acids, Antioxidant Activity and In Vitro Effectiveness of Green and Roasted *Coffea Arabica* Bean Extracts: A Comparative Study. *Anti-cancer Agents in Medical Chemistry*
- Ermawati, T. 2015. Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap Ekspresi TNF- α pada Tikus Periodontitis yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*. Penelitian dosen pemula, Universitas Jember
- Farah, A. 2012. *Coffee: Emerging health effects and disease prevention*. Oxford: Wiley- Blackwell.
- Garcia, J. L., M. Lehocky, P. Humpolicek, dan P. Saha. 2014. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *J. Funct. Biomater*, 5(2), 43-57
- Guo, H., L. Chen, H. Cui, X. Peng, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, X. Wang, dan B. Wu. 2016. Research Advances on Pathway of Nickel-Induce Apoptosis. *International Journal of Molekular Science* 17(10): 1-18
- Haudek-Prinz, V. J., P. Klepeisz, A. Slany, J. Griss, A. Meshcheryakova, V. Paulitschke, G. Mitulovic, J. Stöckl, dan C. Gerner. 2012. Proteome Signatures Of Inflammatory Activated Primary Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Proteomics* 76(5): 150–162
- Jomova, K. dan M. Valko. 2011. Advances In Metal-Induced Oxidative Stress And Human Disease. *Elsevier Toxicology Journal* 283: 65-87
- Koedrith, P. dan Y. R. Seo. 2011. Advances in Carcinogenic Metal Toxicity and Potential Molecular Markers. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 9576-9595

- Koncarevic, S., C. Löbner, K. Kuhn, T. Prinz, I. Pike, dan H. D. Zucht. 2014. In-Depth Profiling Of The Peripheral Blood Mononuclear Cells Proteome For Clinical Blood Proteomics. *International Journal Of Proteomics*
- Leysens, L., B. Vinck, C. V. D. Straetenc, F. Wuytse, dan L. Maesa. 2017. Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology* 387: 43–56
- Łukaszczyk, A., dan J. Augustyn-pieniążek. 2015. Corrosion Resistance of Co-Cr-Mo Alloy used in Dentistry. *Archives of metallurgy and materials volume 60*
- Manaari, C. P., E. Suryanto, dan J. Pontoh. 2014. Aktivitas Penangkal Radikal Hidroksil Fraksi Flavonoid dari Limbah Tongkol Jagung pada Tikus Wistar. *Jurnal MIPA UNSRAT Online*, 3(2) : 134-138
- Marks, D. B., A. D. Marks, dan C. M. Smith. 2000. Biokimia Kedokteran Dasar. Jakarta : EGC
- Meerlo, J., G. J. L. Kaspers, dan J. Cloos. 2011. Cell sensitivity assay: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 731(237): 45
- Mulanto, S. dan E. Suharyanto. 2012. *Kopi, Seduhan, dan Kesehatan*. Jember: Puslitkoka Indonesia.
- Murray, R. K., D. K. Granner dan V. W. Rodwell. 2009. Biokimia Harper ed. 27. Jakarta : EGC
- Nirwana, I. dan R. H. Soekartono. 2005. Sitotoksisitas resin akrilik hybrid setelah penambahan glass fiber dengan metode berbeda (Cytotoxicity of the hybrid acrylic resin after glass fiber reinforcement with difference method). *Maj. Ked. Gigi. (Dent. J.)*. 38 (2): 56–59
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta : PT Rineka Cipta
- Pangabeian, E. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: AgroMedia Pustaka
- Pan, Y., L. Jiang, H. Lin, dan H. Cheng. 2017. Cell death affected by dental alloys: Modes and mechanisms. *Dental Materials Journal*; 36(1): 82–87
- Posada, O. M., R. J. Tate, R. M. D. Meek, dan M. H. Grant. 2015. In Vitro Analyses of the Toxicity, Immunological, and Gene Expression Effects of Cobalt-Chromium Alloy Wear Debris and Co Ions Derived from Metal-on-Metal Hip Implants. *Lubricants*, 3, 539-568

- Pourret, O. dan M. P. Faucon. 2016. Cobalt. *Springer International Publishing Switzerland*
- Pulikkottil, V.J., S. Chidambaram, P.U. Bejoy, P.K. Femin, P. Paul, dan M. Rishad. 2016. Corrosion Resistance Of Stainless Steel, Nickel-Titanium, Titanium Molybdenum Alloy, And Ion-Implanted Titanium Molybdenum Alloy Archwires In Acidic Fluoride-Containing Artificial Saliva: An In Vitro Study. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 8: 96-99
- Pulido, M. D. dan A. R. Parrish. 2003. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutation Research*, 533, 227–241
- Puspitasari, M.L., T. V. Wulansari, T. D. Widyaningsih, J. P. Malingan, dan N. I. P. Nugrahini. 2016. Aktivitas Antioksidan Suplemen Herbal Daun Sirsak (*Annona Muricata L.*) Dan Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana L.*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 4(1): 283-290
- Rachmawati, D., H. J. Bontkes, M. I. Verstege, J. Muris, B. M. E. Blomberg, R. J. Scheper, dan I. M. W. Hoogstraten. 2013. Transition Metal Sensing by Toll-like receptor-4: Next to Nickel, Cobalt and Palladium are Potent Human Dendritic Cell Stimulators. *Contact Dermatitis* 68: 331-338
- Rachmawati, D. 2016. *Innate Immune Reactivity to Dental Alloy*. Amsterdam: Vrije Universiteit
- Rachmawati, D. 2017. Immunostimulatory capacity of dental casting alloys on endotoxin responsiveness. *The Journal Of Prosthetic Dentistry*
- Ramanaviciene, A., V. Mostovojus, I. Bachmatova, dan A. Ramanavicius. 2003. Anti-bacterial Effect on Caffeine on *Eschericia coli* and *Pseudomonas florescens*. *Journal Acta Medica Lituania*. 10 (4): 185-188
- Rahardjo, P. 2012. *Kopi : Panduan Budi daya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Ridwansyah. 2003. Pengolahan Kopi. *Skripsi*. Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara
- Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, dan L. Minor. 2013. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*.
- Roche Diagnostic. 2008. *Apoptosis and Cell Proliferation 4th Ed*. Germany: Roche Diagnostic GmbH

- Sari, L. M. 2018. Apoptosis : Mekanisme Molekular Kematian Sel. Cakradonya Dent J, 10 (2): 65-70
- Savencu, C. E., L. V. Costea, M. L Dan, dan L. Porojan. 2018. Corrosion Behaviour of Co-Cr Dental Alloys Processed by Alternative CAD/CAM Technologies in Artificial Saliva Solutions. *International Journal Electrochemical Science* 13: 3588 – 3600
- Silva, E. O. dan R. Batista. 2017. Ferulic acid and naturally occurring compounds bearing a feruloyl moiety: a review on their structures, occurrence, and potential health benefits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*; 16(2): 580 – 616.
- Siregar. F. dan B. Hadijono. 2000. Uji Sitotoksitas Dengan MTT Esei. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*. 7: 29-30
- Soesetijo, F. A. 2012. *Evaluasi Kekerasan Restorasi Nikel-Kromium dengan Berbagai Metode Casting*. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Jember Stomatognatic, 9 (3) 2 :145 – 151
- Sukohar, A., F. Setiawan, F. Wirakusumah, dan H. S. Sastramiharja. 2011. Isolation and Characterization Cytotoxic Compounds Caffeine and Chlorogenic Acid Seeds of Lampung Coffee Robusta. *Jurnal Medika Planta* 1(4): 11-26
- Supriyadi. 2008. Evaluasi Apoptosis Sel Odontoblas Akibat Paparan Radiasi Ionisasi. *Indonesian Journal of Dentistry*, 15(1): 71-76
- Suwarto, Y. Octavianty dan S. Hermawati. 2014. *Top 15 Tanaman Perkebunan*. Jakarta : Penebar Swadaya
- Tanauma, H. A., G. Citraningtyas, dan W. A. Lolo. 2016. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT* 5(4): 245, 243-251
- Yashin, A., Y. Yashin, J. Y. Wang, dan B. Nemzer. 2013. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. www.mdpi.com/journal/antioxidants
- Winarsi, H. 2007. *Anioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius

LAMPIRAN

A. Surat Keterangan

A1. Ethical 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. 103/UN25.8/KEPK/DL/2018	
Title of research protocol	: "The Effectiveness of Robusta Coffee Bean Extract (<i>Coffea canephora</i>) as a Review of The Toxic Effects of Cobalt Compounds on PBMC"
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Elma Farisah
Member of research	: 1. Indah Pratiwi 2. Nindya Shinta Damayanti
Responsible Physician	: Elma Farisah
Date of approval	: July 31 st , 2018
Place of research	: Bioscience laboratory Faculty of Dentistry 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, August 1 st , 2018	
Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember	Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember
 (dr. Wahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)	 (dr. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si)

A2. Surat Identifikasi Tanaman

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



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

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

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 52/PL17.3.1.02/LL/2018

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 2980/UN25.8/TL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Elma Farisah
NIM : 151610101017
Jur/Fak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:

Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub Kelas: Asteridae; Ordo: Rubiales; Famili: Rubiaceae; Genus: Coffea; Spesies: Coffea canephora, Pierre.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 18 Oktober 2018



Puji Mastuti, MP

195808201987032001

A3. Surat Ijin Pembuatan Ekstrak



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

Nomor : 2986 /UN25.8.TL/2018
Perihal : Pembuatan Ekstrak

15 AUG 2018

Kepada Yth
Laboratorium Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Jember
Di
Jember

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


- | | | |
|----|-------------------------|--|
| 1 | Nama | : Elma Farisah |
| 2 | NIM | : 151610101017 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2017/2018 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jl. Baturaden I No. 2 Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Efektivitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>) Tinjauan Terhadap Efek Toksik Senyawa Kobalt (Co) pada Sel PBMC |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember |
| 8 | Data/alat yang dipinjam | : Rotary evaporator, neraca timbang |
| 9 | Waktu | : Agustus 2018 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Untuk Menganalisis Efektivitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>) Tinjauan Terhadap Efek Toksik Senyawa Kobalt (Co) pada Sel PBMC |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. drg. Dessy Rachmawati, M.Kes
2. drg. Tantin Ermawati, M.Kes |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an Dekan
Wakil Dekan I,

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

A.4 Surat Ijin Penelitian



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

Nomor : 3060 /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	: Elma Farisah
2	NIM	: 151610101017
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Baturaden I No. 2 Jember
6	Judul Penelitian	: Efektivitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>) Tinjauan Terhadap Efek Toksik Senyawa Kobalt (Co) pada Sel PBMC
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: Autoclave, Centrifuge, Inkubator, Shaker, Incubator, Laminar Flow Cabinet, Microplate cell, Mikroskop inverted, Object glass
9	Waktu	: Agustus 2018 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Menganalisis Efektivitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>) Tinjauan Terhadap Efek Toksik Senyawa Kobalt (Co) pada Sel PBMC
11	Dosen Pembimbing	: 1. drg. Dessy Rachmawati, M.Kes 2. drg. Tantin Ermawati, M.Kes

20 AUG 2018

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an. Dekan
Wakil Dekan I,



Dr. Ida Susilawati, M.Kes
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
NIP. 196109031986022001

A.5 Informed Consent

SURAT PERSETUJUAN

INFORMED CONSENT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Indah Pratiwi

Umur : 21 tahun

Jenis kelamin : Perempuan

Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari :

Nama : Elma Farisah

NIM : 151610101017

Fakultas : Kedokteran Gigi

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

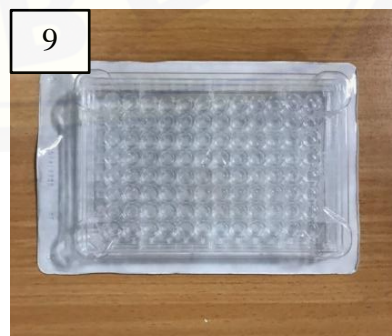
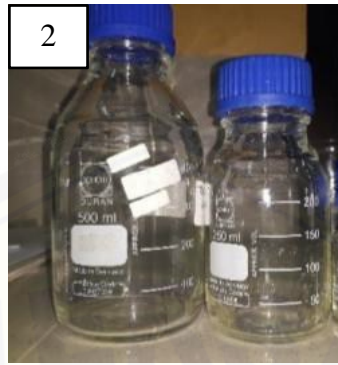
Surat persetujuan ini saya tulis dengan sebenarnya tanpa ada suatu paksaan dari pihak manapun. Dengan ini saya menyatakan sanggup menjadi subyek penelitian ini.

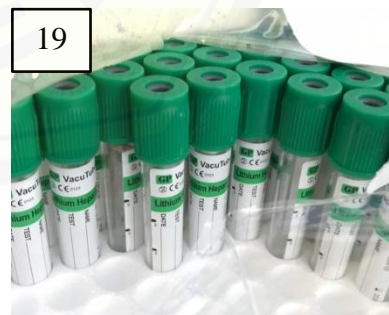
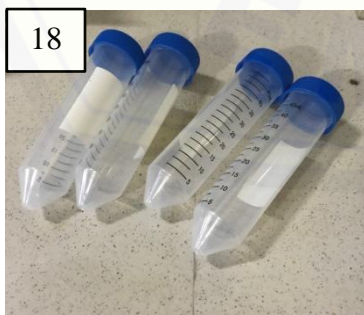
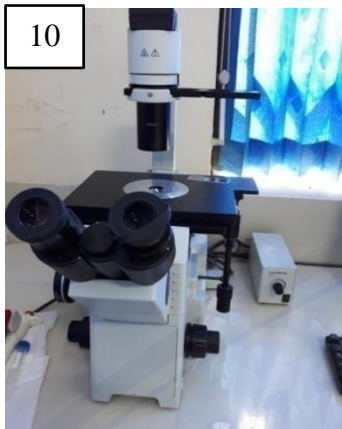
Jember,

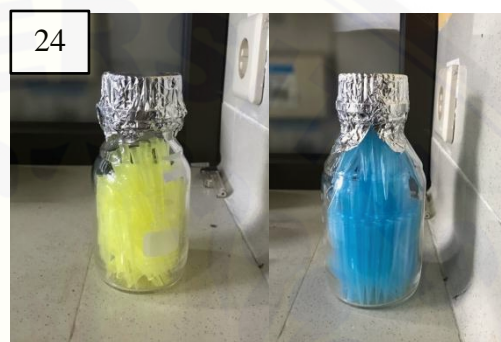
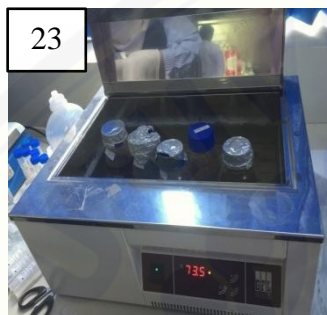
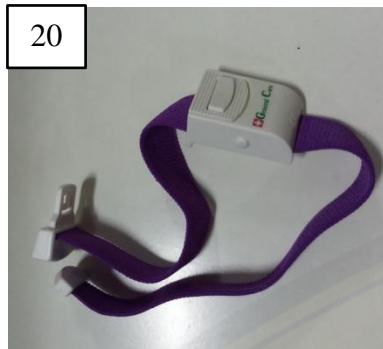
Yang menyatakan



(Indah Pratiwi)

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



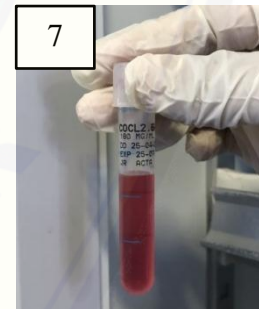
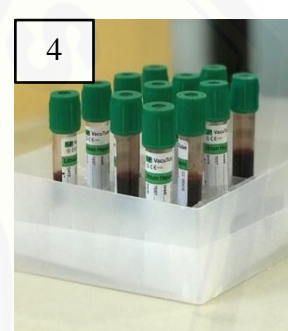


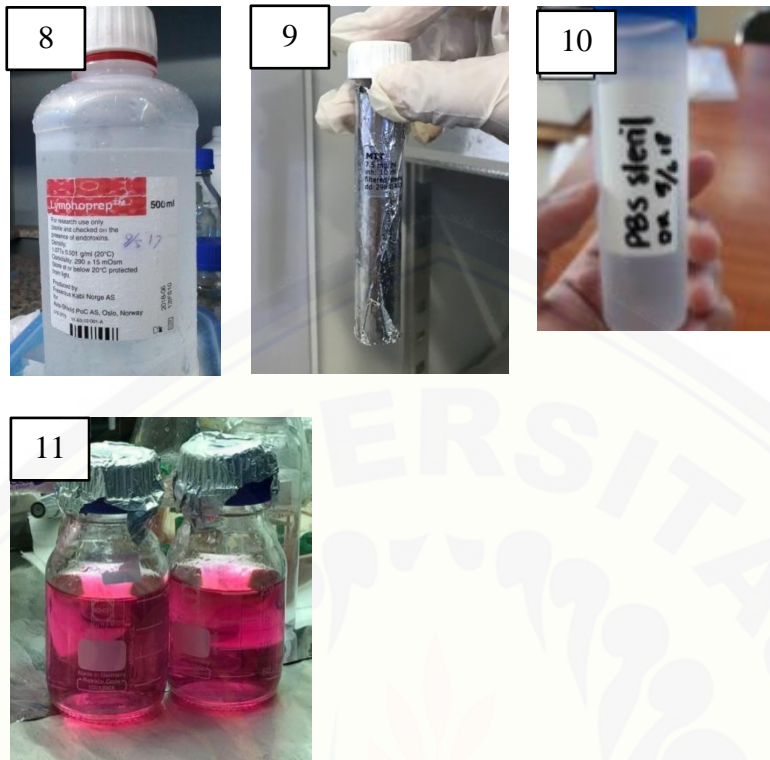
Keterangan Gambar:

1. *Autoclave*
2. *Botol Duran*
3. *Centrifuge* (Eppendorf Centrifuge 5810R)
4. *ELISA Reader*
5. *Erlemeyer*
6. *Gelas ukur*
7. *Incubator Shaker* (LabTech)
8. *Laminar Flow Cabinet* (Dwyer)
9. *Microplate-96 well*
10. *Mikroskop inverted* (Olympus)
11. *Neraca Timbang*
12. *Oven* (Binder)
13. *Pipet mikro* (Humapette)
14. *Rak Tabung*
15. *Syringe 3 ml* (Terumo Syringe)

16. *Syringe filter* 0.2 μ m (Sartorius Stedim)
17. Tabung *ependorf*
18. Tabung *Falcon* (Biologix)
19. Tabung heparin
20. Tourniquet
21. *UV sterilizer*
22. *Vortex*
23. *Water bath*
24. *Yellow tip* dan *blue tip*

B.2. Bahan Penelitian





Keterangan Gambar :

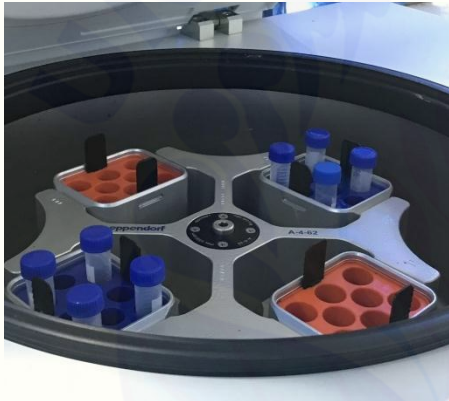
1. Alkohol 70%
2. Alumunium foil
3. Aquadest steril
4. Darah vena perifer
5. DMSO (*Dimethylsulfoxide*)
6. Ekstrak biji kopi robusta
7. Larutan $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
8. *Lymphoprep*
9. MTT (3-(4,5 dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)
10. PBS (*Phosphate Buffer Saline*)
11. RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Media*)

C. Foto Penelitian

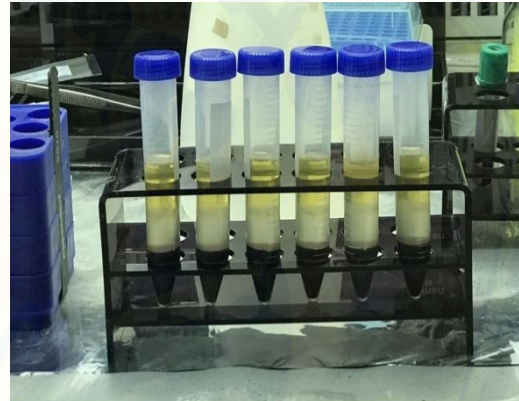
Pengambilan darah

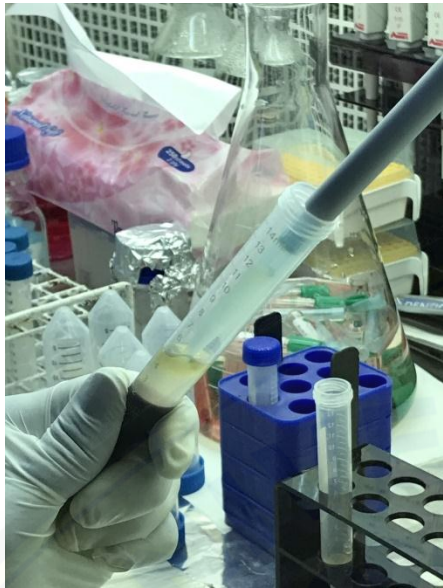


Menimbang ekstrak biji kopi robusta untuk dilakukan pengenceran



Sentrifugasi 10 menit

Terbentuk 4 lapisan yaitu plasma, PBMC, *lymphoprep* dan eritrosit



Mengambil lapisan PBMC



Inkubasi selama 3 jam dalam inkubator *shaker*



Pembacaan absorbansi menggunakan ELISA *reader* setelah diberikan MTT

D. Analisis Data

Analisis Data Hasil Penelitian dengan uji MTT

% Viabilitas			
Kelompok	Mean	N	Std. Deviation
Kontrol Sel	99.2950	6	.79188
Kontrol Kobalt	71.9717	6	2.44901
Kontrol Kopi 31,25	83,0017	6	2.18558
Kontrol Kopi 62,5	84.4167	6	2.18422
Kontrol Kopi 125	86,4750	6	2.48409
Kopi 31,25 + Kobalt	81,5433	6	1.73589
Kopi 62,5 + Kobalt	83.8367	6	1.40010
Kopi 125 + Kobalt	88.0400	6	1.93282
Total	84.8225	48	1.89544

a. Uji Normalitas *Saphiro-Wilk*

	Kelompok	Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.
% Viabilitas	Kontrol Sel	.842	6	.136
	Kontrol Kobalt	.988	6	.982
	Kontrol Kopi 31,25	.879	6	.267
	Kontrol Kopi 62,5	.946	6	.711
	Kontrol Kopi 125	.915	6	.470
	Kopi 31,25 + Kobalt	.975	6	.925
	Kopi 62,5 + Kobalt	.933	6	.604
	Kopi 125 + Kobalt	.966	6	.867

b. Uji Homogenitas *Levene Test*

% Viabilitas			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.645	7	40	.004

c. Uji Beda *Kruskal Wallis*

% Viabilitas	
Chi-Square	33.708
Df	7
Asymp. Sig.	.000

d. Uji Beda Lanjutan *Mann Whitney*

1. Kelompok kontrol sel dan kelompok kontrol kobalt

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

2. Kelompok kontrol sel dan kelompok kontrol kopi 31,25

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

3. Kelompok kontrol sel dan kelompok kopi 62,5

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

4. Kelompok kontrol sel dan kelompok kopi 125

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

5. Kelompok kontrol kobalt dan kelompok kontrol kopi 31,25

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

6. Kelompok kontrol kobalt dan kelompok kontrol kopi 62,5

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

7. Kelompok kontrol kobalt dan kelompok kontrol kopi 125

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

8. Kelompok kontrol kopi 31,25 dan kelompok kontrol kopi 62,5

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	14.000
Wilcoxon W	35.000
Z	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.589 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

9. Kelompok kontrol kopi 31,25 dan kelompok kontrol kopi 125

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	29.000
Z	-1.601
Asymp. Sig. (2-tailed)	.109
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.132 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

10. Kelompok kontrol kopi 62,5 dan kelompok kontrol kopi 125

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	14.000
Wilcoxon W	35.000
Z	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.589 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

11. Kelompok kontrol sel dan kelompok kopi 31,25 + kobalt

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

12. Kelompok kontrol sel dan kelompok kopi 62,5 + kobalt

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

13. Kelompok kontrol sel dan kelompok kopi 125 + kobalt

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.887
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

14. Kelompok kontrol kobalt dan kelompok kopi 31,25 + kobalt

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

15. Kelompok kontrol kobalt dan kelompok kopi 62,5 + kobalt

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

16. Kelompok kontrol kobalt dan kelompok kopi 125 + kobalt

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

17. Kelompok kopi 31,25 + kobalt dan kelompok kopi 62,5 + kobalt

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-2.242
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

18. Kelompok kopi 31,25 + kobalt dan kelompok kopi 125 + kobalt

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

19. Kelompok kopi 62,5 + kobalt dan kelompok kopi 125 + kobalt

Test Statistics^a

	Viabilitas
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	23.000
Z	-2.562
Asymp. Sig. (2-tailed)	.010
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.009 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

