



**EFEK PEMBERIAN SEDUHAN KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)
TERHADAP SEL MAKROFAG DAN LIMFOSIT PADA
MODEL TIKUS PERIODONTITIS**

SKRIPSI

**Oleh
Favinas Octa Nuri Tsalats
NIM 161610101093**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**EFEK PEMBERIAN SEDUHAN KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)
TERHADAP SEL MAKROFAG DAN LIMFOSIT PADA
MODEL TIKUS PERIODONTITIS**

SKRIPSI

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

Oleh

**Favinas Octa Nuri Tsalats
NIM 161610101093**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Jaenuri dan Ibunda Yayuk Werdi Arini yang selalu memberikan doa, dukungan, nasehat, dan motivasi dalam penyelesaian skripsi ini;
2. Kakak-kakakku yang selalu memberikan dukungan dan semangat;
3. Para guru TK, SD, SMP, SMA, dan dosen yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat;
4. Semua teman-teman FKG angkatan 2016, kakak tingkat, adik tingkat yang telah berjuang bersama-sama di almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember ini;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTTO

Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan, 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.

(Al-Insyirah (94): 5-8)^{*)}

Sesungguhnya Allah memiliki kekuasaan langit dan bumi. Dia menghidupkan dan mematikan. Tidak ada pelindung dan penolong bagimu selain Allah.

(At-Taubah (9): 116)^{*)}

^{*)} Kementerian Agama Republik Indonesia. 2014. *Al-Qur'an dan Terjemahannya Juz 1 s/d 30*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Favinas Octa Nuri Tsalats

NIM : 161610101093

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Sel Makrofag dan Limfosit pada Model Tikus Periodontitis” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan 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 sebenar-benarnya tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 Mei 2020

Yang menyatakan,

Favinas Octa Nuri Tsalats

NIM 161610101093

SKRIPSI

**EFEK PEMBERIAN SEDUHAN KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)
TERHADAP SEL MAKROFAG DAN LIMFOSIT PADA
MODEL TIKUS PERIODONTITIS**

Oleh

**Favinas Octa Nuri Tsalats
NIM 161610101093**

Dosen Pembimbing Utama : drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc.

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Depi Praharani, M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Sel Makrofag dan Limfosit pada Model Tikus Periodontitis” ini telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Sabtu, 30 Mei 2020

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

drg. Nadie Fatimatuzzahro, MD.Sc.
NIP 198204242008012022

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

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drg. Rendra Christedy Prasetya, MD.Sc.
NIP 198305312008011003

drg. Depi Praharani, M.Kes.
NIP 196801221997022001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost.
NIP 196901121999601001

RINGKASAN

EFEK PEMBERIAN SEDUHAN KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP SEL MAKROFAG DAN LIMFOSIT PADA MODEL TIKUS PERIODONTITIS; Favinas Octa Nuri Tsalats, 161610101093, 2020, 74 halaman, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyakit periodontal memiliki prevalensi cukup tinggi di masyarakat dengan prevalensinya pada semua kelompok umur di Indonesia adalah 96,58%. Salah satu dari penyakit periodontal adalah periodontitis yang merupakan inflamasi pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik atau kumpulan dari mikroorganisme spesifik seperti *Porphyromonas gingivalis*. Periodontitis mengakibatkan kerusakan progresif ligamen periodontal dan tulang alveolar yang ditandai terjadinya kehilangan perlekatan dengan terbentuknya poket periodontal atau resesi gingiva, resorpsi tulang alveolar, hingga meningkatnya mobilitas gigi yang pada akhirnya dapat menyebabkan tanggalnya gigi.

Pada proses inflamasi terjadi infiltrasi sel-sel mononuklear yaitu makrofag dan limfosit. Makrofag adalah sel yang berperan penting dalam sistem imunitas tubuh untuk melawan patogen. Salah satu peran utama makrofag adalah fagositosis yang dapat memicu aktivasi dari makrofag sebagai salah satu pertahanan tubuh yang kuat, tetapi apabila makrofag teraktivasi secara berlebihan justru dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Limfosit merupakan sel inflamasi kronis yang bersifat spesifik sebagai respons imun *host* terhadap adanya suatu jejas saat terjadi inflamasi yang bersifat kronis. Limfosit dapat mensekresi RANKL yang akan berikatan dengan RANK dan menyebabkan terjadinya diferensiasi dan aktivasi osteoklas sehingga jumlah osteoklas akan meningkat dan terjadi resorpsi tulang.

Proses inflamasi di jaringan dapat dihambat dengan adanya bahan-bahan alami yang memiliki kandungan antiinflamasi, salah satunya adalah kopi. Kopi memiliki kandungan senyawa aktif yang penting seperti kafein, asam klorogenat,

asam kafeat, dan asam ferulat yang memiliki efek sebagai antiinflamasi. Jenis kopi robusta memiliki kandungan kafein dan asam klorogenat yang lebih besar daripada kopi arabika.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan yang digunakan *the post test only control group design*. Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Sampel penelitian ini adalah tikus Wistar jantan sebanyak 20 ekor tikus yang terbagi secara acak dalam 5 kelompok, yaitu: kelompok normal (N) (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang tidak diinduksi *P. gingivalis*, tidak diberikan seduhan kopi robusta, dan dieutanasia pada hari ke-15; kelompok P5-A (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* dan dieutanasia pada hari ke-19; kelompok P5-B (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis*, diberi seduhan kopi robusta dan dieutanasia pada hari ke-19; kelompok P7-A (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* dan dieutanasia pada hari ke-21; kelompok P7-B (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis*, diberi seduhan kopi robusta dan dieutanasia pada hari ke-21.

Hasil uji *one way ANOVA* untuk sel makrofag menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($\alpha < 0,05$) dan uji LSD menunjukkan perbedaan yang signifikan pada beberapa kelompok ($\alpha < 0,05$). Hasil uji Kruskal Wallis untuk sel limfosit menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($\alpha < 0,05$) dan uji Mann-Whitney yang menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada beberapa kelompok ($\alpha < 0,05$). Tikus periodontitis yang tidak diberi seduhan kopi robusta jumlah sel makrofag dan limfositnya lebih banyak dibandingkan dengan kelompok periodontitis yang diberi seduhan kopi robusta.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) dapat menurunkan jumlah sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT karena hanya dengan ridho dan karuniaNya semata penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Sel Makrofag dan Limfosit pada Model Tikus Periodontitis” sebagai persyaratan menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Kedua orangtua terhebat saya: Ayahanda Jaenuri dan Ibunda Yayuk Werdi Arini yang selalu sabar dalam mendidik, senantiasa mendoakan, dan tiada henti mendukung serta memberi kasih sayang kepada saya;
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah menyediakan waktu dan selalu sabar membimbing, memberi saran dan motivasi hingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan;
4. drg. Depi Praharani M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah membimbing dengan penuh perhatian dan kesabaran, memberi saran dan motivasi hingga terselesaikannya penulisan skripsi ini;
5. drg. Nadie Fatimatuzzahro, MD.Sc., selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan masukan pemikiran dan saran yang sangat membangun dalam memperbaiki penulisan skripsi ini;
6. drg. Leni Rokhma Dewi, Sp.PM., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang dengan sabar dan penuh perhatian dalam membimbing dan selalu memberikan pengarahan, saran, dan motivasi kepada saya;

7. drg. Fazlur Rachman Nuri Al-Fashih dan drg. Farrahdina Nuri Arini yang selalu menjadi motivator saya dan selalu mendukung saya untuk melangkah terus dan tidak pernah putus asa;
8. Mas Rhiza, Mbak Lid, Mas Ryan, Mbak Ayu, Mbak Reni, Mas Taufik, Mbak Dita, Mas Andri, Mbak Er yang selalu mendoakan dan memberikan semangat;
9. Sahabat Skripsi Kopi yaitu Astrid, Pintan, Ghafran, dan Rizky yang selalu menemani dan membantu dalam proses berlangsungnya penelitian dan pengerjaan skripsi saya dan selalu memberikan semangat dan motivasi kepada saya;
10. Teman-teman Tutorial Baik (Faridah, Saras, Fitri, Syifa, Yenny, Ejak, Nadiah, Raquel) yang selalu memberikan saya semangat;
11. Atik, Lifa, Mbak Dania, Qotrun dan teman-teman Histo Membara (Syafira, Dhesya, Innanisa, Septi, Dita, Ocik, Acim, Mita) yang selalu membantu dan memberikan semangat kepada saya;
12. Teman-teman FKG 2016 yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, terimakasih atas kerja samanya;
13. Bu Wahyu selaku staf Laboratorium Histologi dan Pak Agus selaku staf Laboratorium Farmakologi Bagian Biomedik FKG Universitas Jember, Pak Erwan dan Mas Ivan selaku staf Laboratorium *Bioscience* RSGM Universitas Jember, serta Pak Edy yang telah membantu dalam kelancaran pelaksanaan penelitian saya;
14. Semua pihak yang turut terlibat secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Pada kesempatan ini, penulis juga ingin menyampaikan bahwa penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun diharapkan demi perbaikan skripsi ini menjadi lebih baik lagi. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca semua.

Jember, 30 Mei 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Periodontitis	4
2.1.1 Etiologi Periodontitis.....	5
2.1.2 Patogenesis Periodontitis.....	5
2.2 Inflamasi	7
2.2.1 Inflamasi Akut	8

2.2.2 Inflamasi Kronis	9
2.3 Kopi Robusta	13
2.3.1 Habitat Tanaman Kopi Robusta	14
2.3.2 Morfologi Tanaman Kopi Robusta.....	14
2.3.3 Kandungan Biji Kopi Robusta.....	15
2.4 Pengaruh Kopi terhadap Sel Makrofag dan Limfosit	18
2.5 Kerangka Konsep	20
2.6 Hipotesis	21
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Jenis Penelitian	22
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.2.1 Waktu Penelitian	22
3.2.2 Tempat Penelitian.....	22
3.3 Variabel Penelitian	22
3.3.1 Variabel Bebas.....	22
3.3.2 Variabel Terikat.....	23
3.3.3 Variabel Terkendali	23
3.4 Definisi Operasional	23
3.5 Sampel Penelitian	24
3.5.1 Kriteria Sampel Penelitian.....	24
3.5.2 Besar Sampel Penelitian	24
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	26
3.6.1 Alat Penelitian	26
3.6.2 Bahan Penelitian.....	26
3.7 Prosedur Penelitian	26
3.7.1 Persiapan Penelitian.....	26
3.7.2 Identifikasi Tanaman Kopi Robusta.....	26
3.7.3 Identifikasi Bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i>	27

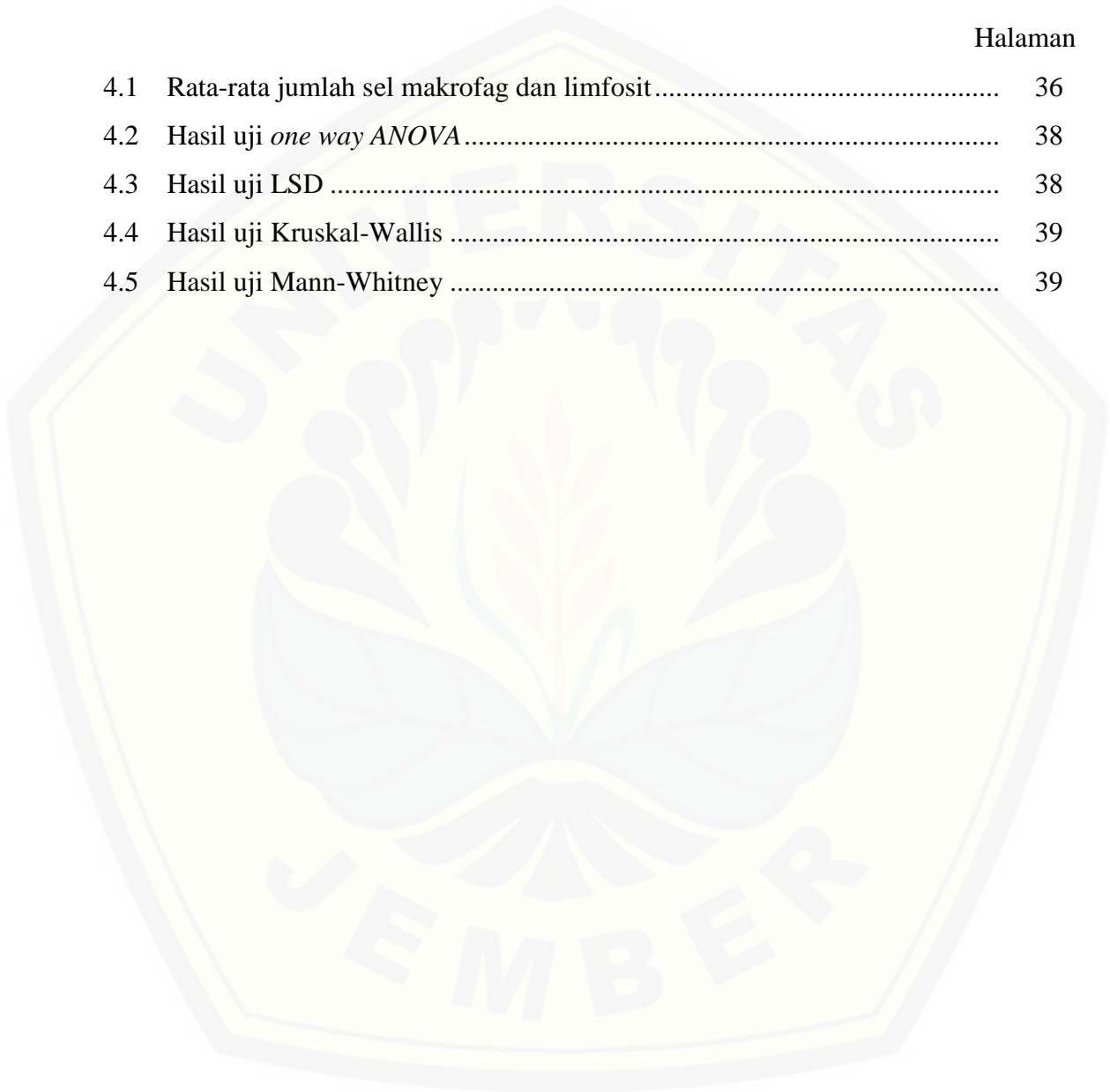
3.7.4 Pembuatan Suspensi <i>Porphyromonas gingivalis</i>	27
3.7.5 Pembuatan Seduhan Kopi Robusta	27
3.7.6 Persiapan Hewan Coba.....	28
3.7.7 Pelaksanaan Penelitian	28
3.7.8 Pembuatan Sediaan Histologis	29
3.7.9 Pengamatan dan Penghitungan Jumlah Sel Makrofag dan Limfosit.....	32
3.8 Analisis Data	33
3.9 Alur Penelitian	34
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1 Hasil Penelitian	35
4.2 Analisis Data	37
4.2.1 Analisis Data Jumlah Sel Makrofag.....	37
4.2.2 Analisis Data Jumlah Sel Limfosit.....	39
4.3 Pembahasan	40
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	44
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45
LAMPIRAN.....	52

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Gambaran klinis dari periodontitis, terlihat adanya pembengkakan dan warna kemerahan pada gingiva serta terjadi resesi gingiva	4
2.2 Gambaran radiografis dari periodontitis, terlihat adanya resorpsi tulang alveolar.....	5
2.3 Makrofag yang terlihat menggunakan TEM (<i>transmission electron microscope</i>).....	10
2.4 Makrofag (M) yang terlihat dengan pewarnaan HE (hematoksilin eosin).	10
2.5 Sel limfosit	11
2.6 Penampilan buah kopi robusta	14
2.7 Struktur buah kopi robusta.....	15
2.8 Struktur kimia asam klorogenat	16
2.9 Struktur kimia asam kafeat	16
2.10 Struktur kimia asam ferulat.....	17
2.11 Struktur kimia flavonoid	17
2.12 Struktur kimia kafein	18
2.13 Kerangka konsep.....	20
3.1 Sediaan histologi gigi molar pertama rahang kiri bawah tikus.....	32
3.2 Alur penelitian	34
4.1 Sediaan histologi sel makrofag (tanda panah merah) dan limfosit (tanda panah hitam) pada jaringan gingiva bagian bukal rahang kiri bawah tikus dengan pewarnaan HE pada perbesaran 400x dan skala 1:500 μ m.....	35
4.2 Grafik diagram batang rata-rata jumlah sel makrofag	37
4.3 Grafik diagram batang rata-rata jumlah sel limfosit	37

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Rata-rata jumlah sel makrofag dan limfosit.....	36
4.2 Hasil uji <i>one way ANOVA</i>	38
4.3 Hasil uji LSD	38
4.4 Hasil uji Kruskal-Wallis	39
4.5 Hasil uji Mann-Whitney	39



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A: Surat keterangan <i>ethical clearence</i>	52
Lampiran B: Surat ijin penelitian.....	53
Lampiran C: Surat keterangan identifikasi tanaman kopi robusta.....	56
Lampiran D: Surat keterangan identifikasi bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	57
Lampiran E: Alat dan bahan penelitian	58
Lampiran F: Foto hasil penelitian (sediaan histologi)	61
Lampiran G: Data hasil penghitungan jumlah sel makrofag dan limfosit	67
Lampiran H: Hasil analisis data	68

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal memiliki prevalensi cukup tinggi di masyarakat dengan prevalensinya pada semua kelompok umur di Indonesia adalah 96,58%. Salah satu dari penyakit periodontal adalah periodontitis (Nandya & Augustina, 2015; Kurniawati *et al.*, 2016); merupakan penyakit yang berkembang cepat, dan mempengaruhi sekitar 10,5% hingga 12% dari populasi di dunia. Prevalensi periodontitis meningkat seiring bertambahnya usia. Pada pasien usia 40 tahun atau lebih sekitar 11% hingga 30% mengalami periodontitis parah (Newman *et al.*, 2019). Menurut data RISKESDAS tahun 2018, persentase kasus periodontitis yang ada di Indonesia sebesar 74,1% (Kementrian Kesehatan RI, 2018).

Periodontitis merupakan inflamasi yang terjadi pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik atau kumpulan dari mikroorganisme spesifik seperti *Porphyromonas gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, dan *Treponema denticola*. Periodontitis dapat mengakibatkan kerusakan pada jaringan pendukung gigi seperti ligamen periodontal dan tulang alveolar dengan meningkatnya pembentukan *probing depth*, resesi, atau keduanya. Pengendalian proses inflamasi dalam periodontitis diperlukan untuk menurunkan terjadinya kerusakan jaringan (Newman *et al.*, 2019).

Pada proses inflamasi terjadi infiltrasi sel-sel mononuklear yaitu makrofag dan limfosit (Kumar *et al.*, 2015). Makrofag adalah sel yang berperan penting dalam sistem imunitas tubuh untuk melawan patogen. Salah satu peran utama makrofag adalah fagositosis. Adanya fagositosis ini dapat memicu aktivasi makrofag untuk mensintesis berbagai mediator inflamasi, antara lain *interleukin 1 (IL-1)* dan *tumor necrosis factor- α (TNF- α)* (Haniastuti, 2009). Mediator-mediator tersebut menjadikan

makrofag sebagai salah satu pertahanan tubuh yang kuat, akan tetapi apabila makrofag teraktivasi secara berlebihan justru dapat menyebabkan kerusakan jaringan (Kumar *et al.*, 2015).

Limfosit merupakan sel inflamasi kronis yang bersifat spesifik sebagai respons imun *host* terhadap adanya suatu jejas saat terjadi inflamasi yang bersifat kronis (Dimas *et al.*, 2014). Limfosit dapat mensekresi *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL). RANKL adalah ligan yang berikatan dengan *receptor activator of nuclear factor- κ B* (RANK) yang merupakan reseptor permukaan sel yang diekspresikan oleh sel-sel progenitor osteoklas. Berikatannya RANKL pada RANK menyebabkan terjadinya diferensiasi dan aktivasi osteoklas sehingga jumlah osteoklas akan meningkat dan terjadi resorpsi tulang (Newman *et al.*, 2019).

Proses inflamasi di jaringan dapat dihambat dengan adanya bahan-bahan alami yang memiliki kandungan antiinflamasi. Salah satu bahan alami yang telah dilaporkan mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antiinflamasi adalah kopi. Saat ini minum kopi sudah menjadi gaya hidup masyarakat termasuk di Indonesia. Kopi sebagai minuman memiliki berbagai khasiat untuk kesehatan dan hal ini telah dibuktikan dari penelitian-penelitian yang pernah dilakukan, termasuk terhadap kesehatan gigi dan mulut (Chismirina *et al.*, 2014).

Kopi memiliki kandungan senyawa aktif yang penting seperti kafein, asam klorogenat, asam kafeat dan asam ferulat yang memiliki efek sebagai antiinflamasi (Affonso *et al.*, 2016; Fatimatuzzahro & Prasetya, 2018). Di Indonesia kopi yang dibudidayakan secara umum ada dua jenis yaitu kopi arabika dan kopi robusta. Menurut Chismirina *et al* (2014), kopi robusta memiliki kandungan kafein dan asam klorogenat yang lebih besar daripada kopi arabika, yaitu kafein 1-2% dan asam klorogenat 7,0-10,5%, sedangkan kopi arabika hanya mengandung kafein 0,4-2,4% dan asam klorogenat 5-7,5%. Kandungan kafein sebagai senyawa aktif ditemukan paling banyak pada seduhan kopi (Fatimatuzzahro & Prasetya, 2018).

Berdasarkan uraian di atas penulis ingin melakukan penelitian eksperimental menggunakan hewan coba untuk mengetahui pengaruh yang dimiliki seduhan kopi robusta terhadap sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan yaitu apakah pemberian seduhan kopi robusta memiliki pengaruh terhadap sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari pemberian seduhan kopi robusta terhadap sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang dapat diperoleh dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan pengetahuan tentang pengaruh pemberian seduhan kopi robusta terhadap periodontitis.
2. Berdasarkan penelitian ini diharapkan kopi dapat dijadikan sebagai salah satu bahan dasar obat antiinflamasi, khususnya di bidang kedokteran gigi.
3. Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk pengembangan penelitian-penelitian sejenis selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

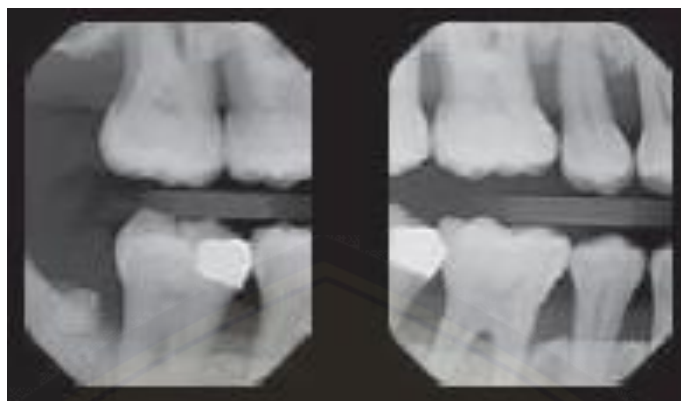
2.1 Periodontitis

Periodontitis adalah penyakit inflamasi pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik atau kelompok mikroorganisme spesifik (Reddy, 2017). Terdapat tiga klasifikasi dari periodontitis, yaitu periodontitis kronis, *aggressive periodontitis*, dan periodontitis yang bermanifestasi dari penyakit sistemik. Periodontitis kronis merupakan jenis periodontitis yang paling sering terjadi dari ketiga jenis periodontitis tersebut dan banyak ditemukan pada orang dewasa, meskipun juga dapat terjadi pada anak-anak dan remaja (Newman *et al.*, 2019).

. Karakteristik klinis yang ditemukan pada saat kondisi periodontitis dapat berupa adanya plak supragingiva dan subgingiva, pembengkakan margin gingiva, perdarahan pada *probing*. Periodontitis dapat mengakibatkan kerusakan progresif ligamen periodontal dan tulang alveolar yang ditandai terjadinya kehilangan perlekatan dengan terbentuknya poket periodontal atau resesi gingiva (Gambar 2.1), resorpsi tulang alveolar (Gambar 2.2), hingga meningkatnya mobilitas gigi yang pada akhirnya dapat menyebabkan tanggalnya gigi (Newman *et al.*, 2019).



Gambar 2.1 Gambaran klinis dari periodontitis, terlihat adanya pembengkakan dan warna kemerahan pada gingiva serta terjadi resesi gingiva (Newman *et al.*, 2019).



Gambar 2.2 Gambaran radiografis dari periodontitis, terlihat adanya resorpsi tulang alveolar (Newman *et al.*, 2019).

2.1.1 Etiologi Periodontitis

Periodontitis dapat disebabkan oleh bakteri Gram negatif anaerob seperti *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, dan *Fusobacterium nucleatum* (Sell *et al.*, 2017). Bakteri Gram negatif memiliki lipopolisakarida (LPS) yang terdapat pada lapisan luar membrannya. LPS ini dapat memicu terjadinya serangkaian peristiwa-peristiwa yang dapat meningkatkan produksi dari mediator inflamasi. Selain LPS, faktor virulensi lain yang dapat mengakibatkan terjadinya periodontitis adalah fimbria dan gingipain yang dapat menstimulasi respon imun *host* seperti sekresi dari mediator-mediator inflamasi (Newman *et al.*, 2019).

2.1.2 Patogenesis Periodontitis

Pada patogenesis periodontitis, terjadi keterlibatan dari *P. gingivalis* yang menghasilkan dua jenis *cysteine proteases* yang lebih dikenal sebagai gingipain. Gingipain ini dapat mengganggu respons imun terhadap inflamasi dan meningkatkan kerusakan jaringan. Gingipain dapat menstimulasi sekresi sitokin melalui aktivasi *protease-activated receptors* (PARs). Gingipain ini termasuk *lysine-specific* gingipain Kgp dan *argine specific* gingipain RgpA dan RgpB. Sebagai contohnya, RgpB dapat mengaktifkan dua jenis PARs (PAR-1 dan PAR-2), sehingga dapat menstimulasi dari sekresi sitokin. Selain itu Rgp dan Kgp juga

dapat menstimulasi sekresi IL-6 dan IL-8 dari monosit melalui aktivasi PAR-1, PAR-2, dan PAR-3 (Newman *et al.*, 2019).

Fimbria dari *P. gingivalis*, juga berperan dalam periodontitis. Fimbria dari *P. gingivalis* dapat menstimulasi respons imun, seperti sekresi IL-6, dan komponen struktural fimbria utama dari *P. gingivalis*, FimA, telah terbukti menstimulasi NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) dan IL-8. Monosit juga dapat terstimulasi sehingga mensekresi IL-6, IL-8, dan TNF- α . Fimbria bakteri penting untuk memodifikasi dan merangsang respons imun dalam periodonsium (Newman *et al.*, 2019).

Bakteri Gram negatif seperti *P. gingivalis*, dilapisi oleh dua membran yang kaya akan endotoksin. Membran ini memiliki bagian lipid dan polisakarida yang sering disebut dengan lipopolisakarida (LPS) (Mani *et al.*, 2018). Sel epitel merupakan sel yang pertama kali berinteraksi dengan LPS. Terjadinya periodontitis dimulai ketika LPS dari bakteri dikenali oleh TLR-4 (*toll-like receptors 4*). TLR-4 ini memiliki peranan penting dalam mengenali LPS. Interaksi tersebut akan memicu respons inflamasi dan memicu aktivasi sel epitel untuk memproduksi IL-1 β , TNF- α , IL-6 dan IL-8. Pada waktu yang bersamaan, faktor virulen bakteri yang telah berdifusi dan dengan adanya produksi mediator inflamasi menstimulasi sel-sel makrofag/monosit, fibroblas, dan sel mast untuk memproduksi dan melepaskan sitokin proinflamasi (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12), prostaglandin (PGE2), histamin serta leukotrien (Dumitrescu & Kawamura, 2010).

Sitokin disekresi oleh sel inflamasi seperti neutrofil, makrofag dan limfosit. Sitokin memiliki efek yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan dalam inflamasi kronis, seperti TNF- α , interleukin (IL-1 β) dan IL-6, dalam lesi periodontal, mengatur serangkaian peristiwa destruktif yang terjadi pada jaringan periodontal. Peristiwa ini termasuk produksi dari mediator-mediator inflamasi, rekrutmen osteoklas, dan diferensiasi melalui *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL) (Sell *et al.*, 2017). Misalnya, TNF- α dapat menyebabkan peningkatan aktivitas osteoklas sehingga terjadi resorpsi tulang alveolar (Newman *et al.*, 2019).

Osteoklas distimulasi oleh sitokin proinflamasi untuk meresorpsi tulang. Osteoklas adalah sel multinukleasi yang terbentuk dari sel progenitor dan makrofag. Resorpsi tulang ini terjadi apabila osteoklas diaktifkan oleh berbagai mediator (IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE2). IL-1 β and TNF- α mengatur ekspresi dari RANK, dan sel T mengekspresikan RANKL yang akan berikatan langsung dengan RANK (*receptor activator of nuclear factor- κ B*). RANK merupakan reseptor permukaan sel pada sel-sel progenitor osteoklas, sedangkan RANKL merupakan molekul mirip sitokin yang merupakan ligan untuk RANK dan menyebabkan osteoklas berdiferensiasi penuh menjadi *mature*. Pada periodontitis, terjadi peningkatan dari sitokin proinflamasi dan juga peningkatan dari infiltrasi sel T yang menyebabkan peningkatan pembentukan osteoklas dewasa sehingga terjadi resorpsi tulang alveolar (Newman *et al.*, 2019).

2.2 Inflamasi

Inflamasi adalah respons jaringan vaskular terhadap infeksi dan jaringan yang rusak yang membawa sel-sel dan molekul pertahanan *host* dari sirkulasi ke bagian-bagian yang membutuhkan, untuk menghilangkan agen penyebab. Inflamasi merupakan respons protektif yang penting untuk kelangsungan hidup, berfungsi untuk membersihkan *host* dari penyebab awal cedera sel (misalnya mikroba dan racun) dan konsekuensi dari cedera tersebut (misalnya sel dan jaringan nekrotik). Leukosit, antibodi, dan protein komplemen bersirkulasi dalam darah, dimana mereka dapat dengan cepat dikirim ke bagian mana pun dari tubuh. Proses inflamasi mengantarkan sel-sel dan protein ini ke jaringan yang rusak atau nekrotik dan agen asing, seperti mikroba, dan mengaktifkan sel dan molekul yang direkrut, yang kemudian berfungsi untuk menghilangkan zat berbahaya atau yang tidak diinginkan. Tanpa inflamasi, infeksi akan tidak terkendali, luka tidak akan pernah sembuh, dan jaringan yang terluka mungkin tetap menjadi luka bernanah permanen. Inflamasi terdiri dari inflamasi akut dan inflamasi kronis, dimana respons awal yang cepat terhadap infeksi dan kerusakan jaringan disebut inflamasi akut. Respons ini biasanya berkembang dalam hitungan menit atau jam dan berdurasi pendek, berlangsung selama beberapa jam atau beberapa hari.

Sedangkan inflamasi kronis memiliki durasi yang lebih lama dan berhubungan dengan lebih banyak kerusakan jaringan, adanya limfosit dan makrofag, proliferasi pembuluh darah (Kumar *et al.*, 2015).

2.2.1 Inflamasi Akut

Inflamasi akut memiliki tiga komponen utama, yaitu pelebaran pembuluh darah kecil yang menyebabkan peningkatan aliran darah, peningkatan permeabilitas mikrovaskulatur yang memungkinkan protein plasma dan leukosit meninggalkan sirkulasi, dan emigrasi leukosit dari mikrosirkulasi, akumulasi dalam fokus cedera, dan aktivasi untuk menghilangkan agen penyebab. Reaksi vaskular terhadap inflamasi akut terdiri dari perubahan aliran darah dan permeabilitas pembuluh darah, keduanya dirancang untuk memaksimalkan pergerakan protein plasma dan leukosit keluar dari sirkulasi dan masuk ke tempat infeksi atau cedera. Perubahan aliran darah dan permeabilitas vaskular dengan cepat diikuti oleh masuknya leukosit ke dalam jaringan. Leukosit ini melakukan fungsi utama untuk menghilangkan agen penyebab. Leukosit yang paling penting dalam inflamasi adalah leukosit yang mampu melakukan fagositosis, yaitu neutrofil dan makrofag. Leukosit ini mencerna dan menghancurkan bakteri dan mikroba lainnya, serta jaringan nekrotik dan zat asing. Leukosit juga menghasilkan faktor pertumbuhan yang membantu perbaikan (Kumar *et al.*, 2015).

Reaksi vaskular dan seluler bertanggung jawab atas tanda dan gejala respons inflamasi. Peningkatan aliran darah ke daerah yang terluka dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang mengarah ke akumulasi cairan ekstrasvaskuler yang kaya protein plasma, yang dikenal sebagai edema. Kemerahan (rubor), kehangatan (kalor), dan pembengkakan (tumor) pada inflamasi akut disebabkan oleh peningkatan aliran darah dan edema. Leukosit yang bersirkulasi, awalnya didominasi neutrofil, melekat pada endotel melalui adhesi molekul, melintasi endotel, dan bermigrasi ke lokasi cedera di bawah pengaruh agen kemotaktik. Leukosit yang diaktifkan oleh agen penyebab dan oleh mediator endogen dapat melepaskan metabolit dan protease toksik secara ekstraseluler, menyebabkan kerusakan jaringan. Selama kerusakan, dan sebagian

sebagai akibat pembebasan prostaglandin, neuropeptida, dan sitokin, salah satu gejala lokal adalah nyeri (dolor) (Kumar *et al.*, 2015).

2.2.2 Inflamasi Kronis

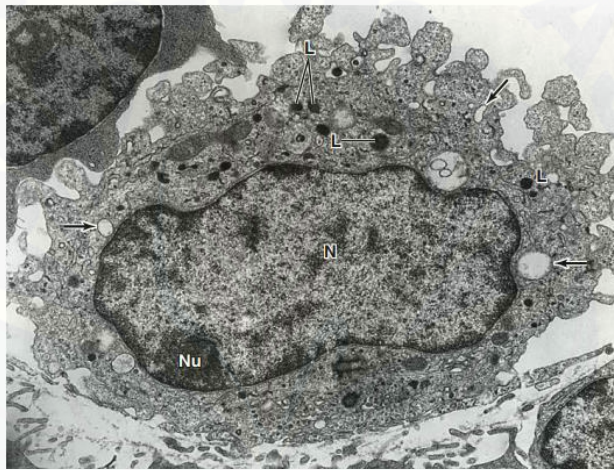
Inflamasi kronis adalah respons dari durasi yang berkepanjangan dari inflamasi atau cedera jaringan (minggu atau bulan). Inflamasi kronis dapat disebabkan oleh infeksi yang persisten dari mikroorganisme yang sulit untuk dihilangkan seperti virus, fungi atau parasit tertentu, serta kontak yang terlalu lama dengan agen yang toksik, baik endogen maupun eksogen. Inflamasi kronis ditandai oleh adanya infiltrasi sel mononuklear, yang meliputi makrofag dan limfosit (Kumar *et al.*, 2015).

a. Makrofag

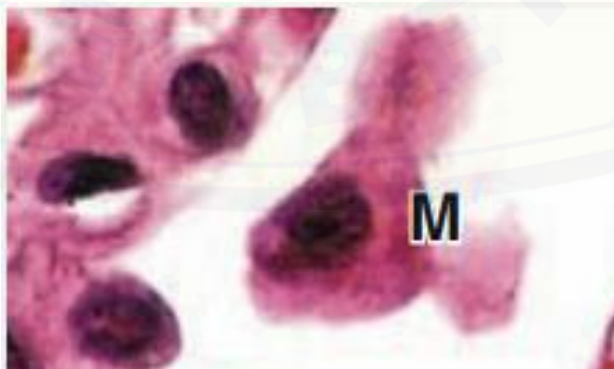
Secara histologi, makrofag berbentuk tidak beraturan, berpenampang sekitar 10-30 μm , permukaan sel tidak rata dan memiliki tonjolan-tonjolan seperti jari, nukleus berbentuk oval atau seperti ginjal (Gambar 2.2). Pada Gambar 2.3, dapat dilihat bentuk makrofag dengan nukleus berbentuk seperti ginjal, berwarna keunguan dan sitoplasma berwarna merah muda transparan. Makrofag mempunyai membran plasma yang berlipat-lipat; hal ini menunjukkan sifat sel yang dapat bergerak dan memfagositosis. Makrofag berasal dari sel stem sumsum tulang yang masuk ke dalam sirkulasi sebagai monosit yang kemudian masuk ke jaringan ikat. Setelah diaktivasi oleh *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) sel tersebut menjadi matang sebagai makrofag, dengan masa hidup normal sekitar dua bulan (Wangko & Karundeng, 2014).

Makrofag merupakan sel dominan yang terdapat dalam sebagian besar inflamasi kronis. Makrofag mempunyai fungsi fagositosis yang bertujuan untuk mengeliminasi partikel ekstraseluler, sel yang mati atau rusak dan bakteri patogen (Kumar *et al.*, 2015, Hirayama *et al.*, 2017). Makrofag memfagositosis bahan asing atau yang sudah tidak diperlukan oleh tubuh dengan cara menghancurkannya melalui sistem enzim lisosom yang terdapat dalam sitoplasma sel makrofag (Wangko & Karundeng., 2014). Selain itu, makrofag juga memulai proses perbaikan jaringan dan terlibat dalam

pembentukan bekas luka dan fibrosis. Makrofag mengeluarkan mediator inflamasi, seperti sitokin (TNF, IL-1, kemokin, dan lain-lain) dan eikosanoid. Mediator-mediator inflamasi yang dikeluarkan oleh makrofag menjadikan makrofag sebagai pertahanan tubuh yang kuat dalam melawan agen-agen perusak, tetapi hal ini juga dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang cukup besar apabila makrofag teraktivasi secara tidak tepat atau berlebihan. Sehingga salah satu ciri khas dari inflamasi kronis adalah penghancuran jaringan karena adanya aktivitas dari makrofag (Kumar *et al.*, 2015). Saat terjadi inflamasi, infiltrasi makrofag meningkat terutama pada hari ke-3 sampai ke-5 (Prasetya, 2013).



Gambar 2.3 Makrofag yang terlihat menggunakan TEM (*transmission electron microscope*). Nukleus (N); nukleolus (Nu); lisosom sekunder (L) (10.000x) (Junqueira & Mescher, 2016).

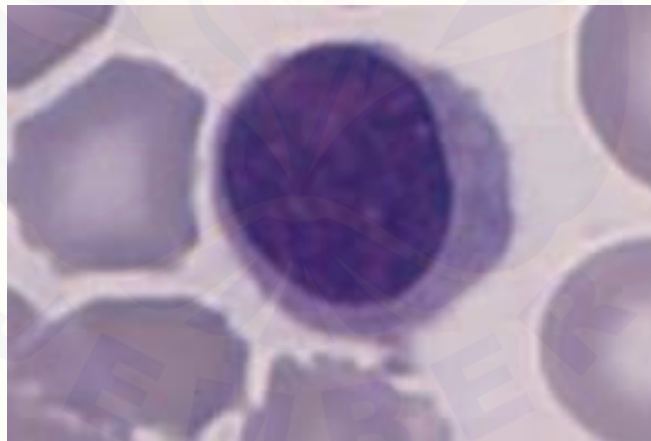


Gambar 2.4 Makrofag (M) yang terlihat dengan perwarnaan HE (hematoksilin eosin) (Junqueira & Mescher, 2016).

b. Limfosit

Limfosit bervariasi dalam ukuran dari sel yang lebih kecil dari eritrosit sampai ke sel yang hampir dua kali lebih besar. Pada limfosit kecil, nukleus yang padat menempati sebagian besar sitoplasma, yang tampak seperti tepian basofilik tipis di sekitar nukleus. Sitoplasma limfosit biasanya agranular. Pada limfosit besar, sitoplasma basofilik lebih berlimpah dan inti yang lebih besar dan lebih pucat dapat mengandung satu atau dua nukleoli. Pada Gambar 2.4 tampak bentuk limfosit dengan sitoplasma dan nukleus yang besar hampir menutupi sitoplasmanya. Sebagian besar limfosit di darah, sekitar 90% merupakan limfosit kecil (Eroschenko & Di Fiore, 2013).

Limfosit spesifik untuk sejumlah besar antigen ada sebelum adanya paparan antigen, dan ketika antigen masuk, limfosit secara selektif mengaktifkan sel spesifik antigen. Ada sekitar 10^{12} limfosit pada orang dewasa yang sehat dan diperkirakan bahwa limfosit ini mampu mengenali 10^7 hingga 10^9 antigen yang berbeda (Kumar *et al.*, 2015).



Gambar 2.5 Sel limfosit (Junquiera & Mescher, 2016)

Limfosit digolongkan menjadi 2 kelompok, yaitu sel limfosit T dan B. Sel limfosit T dan B secara morfologis sulit untuk dibedakan di bawah mikroskop cahaya, hanya penanda protein yang berbeda pada permukaan sel limfosit T dan B yang memungkinkan sel-sel ini untuk dibedakan (Eroschenko & Di Fiore, 2013).

1) Sel limfosit T

Sel T terbentuk di sumsum tulang dan matang di kelenjar timus. Sel T yang telah meninggalkan timus akan beredar dalam darah untuk mengenali antigen-antigen. Setelah mengenali antigennya, sel T akan menghancurkan mikroorganisme dengan aksi sitotoksik (Eroschenko & Di Fiore, 2013).

Peningkatan mediator proinflamasi saat terjadi inflamasi dapat memicu sel T untuk mengekspresikan *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANKL). Produksi RANKL oleh sel T yang berlebih dapat menyebabkan resorpsi tulang (Chickanna *et al.*, 2015). *Naïve T helper cells* (Sel T CD4) dapat meningkatkan inflamasi dan mempengaruhi sifat reaksi inflamasi karena kemampuannya untuk mengeluarkan sitokin. Sel ini memperkuat reaksi inflamasi awal yang diinduksi oleh mikroba dan sel-sel mati (Kumar *et al.*, 2015). Sel T CD4 dibagi menjadi 3 bagian yang dapat mengeluarkan berbagai jenis sitokin dan menimbulkan berbagai jenis inflamasi (Kumar *et al.*, 2015; Sell *et al.*, 2017).

- a. Sel-sel *T-helper 1* (Th-1) menghasilkan sitokin interferon- γ (IFN- γ), yang dapat mengaktifkan makrofag.
- b. Sel-sel *T-helper 2* (Th-2) mensekresi IL-4, IL-5, dan IL-13, yang merekrut dan mengaktifkan eosinofil dan bertanggung jawab untuk jalur alternatif aktivasi makrofag.
- c. Sel *T-helper 17* (Th-17) mensekresi IL-17 dan sitokin lain, yang menginduksi sekresi kemokin yang bertanggung jawab untuk merekrut neutrofil (dan monosit) ke dalam reaksi.

Sel Th-1 dan Th-17 terlibat dalam pertahanan melawan banyak jenis bakteri dan virus dan pada penyakit autoimun. Sel-sel Th-2 penting dalam pertahanan melawan parasit cacing dan alergi (Kumar *et al.*, 2015).

Limfosit dan makrofag berinteraksi dalam dua arah, dan interaksi ini memainkan peran penting dalam penyebaran inflamasi kronis. Makrofag menampilkan antigen pada sel T, mengekspresikan molekul membran (*costimulator*), dan memproduksi sitokin (IL-12 dan lainnya) yang merangsang respons sel T. Sel T yang teraktivasi menghasilkan sitokin,

yang mengaktifkan makrofag, menaikkan lebih banyak *antigen presenting cell* (APC) dan sekresi sitokin. Hasilnya adalah siklus reaksi seluler yang memicu dan mempertahankan adanya inflamasi kronis (Kumar *et al.*, 2015).

2) Sel limfosit B

Sel B (bursal atau *bone marrow*) merupakan kumpulan populasi sel yang mengekspresikan berbagai reseptor immunoglobulin (Ig) di permukaan selnya untuk mengenali berbagai macam epitop spesifik dari antigen (Levani, 2018). Sel B menetap dan matang di sumsum tulang. Sel B akan mengenali antigennya dan menjadi aktif yang kemudian akan berdiferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan antibodi untuk menghancurkan zat asing. Sel B teraktivasi lainnya akan menjadi sel B memori untuk pertahanan di masa depan terhadap antigen yang sama (Eroschenko & Di Fiore, 2013). Sel B juga memproduksi RANKL dan meningkatkan osteoklastogenesis (Chickanna *et al.*, 2015).

2.3 Kopi Robusta

Kopi merupakan tanaman perkebunan yang sudah lama dibudidayakan. Tanaman kopi membutuhkan waktu 3 tahun dari saat perkecambahan hingga menjadi tanaman berbunga dan menghasilkan buah. Ada empat jenis kelompok kopi yang dikenal, yaitu kopi arabika, kopi robusta, kopi liberika, dan kopi ekselsa. Kopi robusta merupakan kopi yang sebagian besar dibudidayakan di Indonesia, sekitar 90% dan sisanya merupakan kopi arabika (Rahardjo, 2012).

Menurut Rahardjo (2012), taksonomi tanaman kopi robusta secara lengkap adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Super Divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Sub Kelas : Asteridae
Ordo : Rubiales

Famili : Rubiaceae
Genus : Coffea
Spesies : *Coffea* sp. (*Coffea canephora* var. *robusta*)

2.3.1 Habitat Tanaman Kopi Robusta

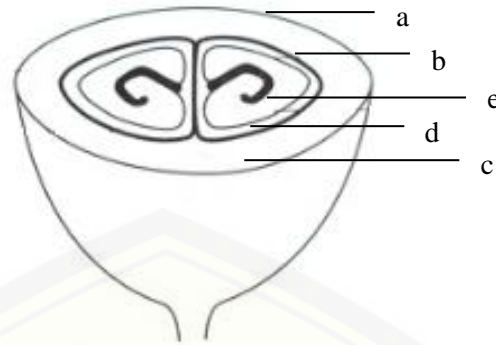
Kopi robusta berasal dari hutan-hutan katulistiwa di Afrika, dari pantai barat sampai Uganda. Tanaman ini lebih banyak dibudidayakan di Indonesia yang daerahnya didominasi dataran rendah (Sulistyaningtyas, 2017). Kopi robusta dapat tumbuh pada ketinggian 300-600 m di atas permukaan laut dengan curah hujan 1.500-3000 mm/ th dengan suhu 24-30°C dan pH tanah 5,5-6,0 (Kahpi, 2018).

2.3.2 Morfologi Tanaman Kopi Robusta

Kopi robusta memiliki bentuk daun bulat seperti telur dengan ujung sedikit meruncing. Bagian atas dari daun terlihat mengkilat, tepi rata, dan pertulangan pertulangan menyirip. Selain itu, daunnya tumbuh berhadapan dengan batang, cabang, dan ranting-rantingnya (Najiyati & Danarti, 2012). Buah kopi robusta berukuran besar, berdompolan rapat, warna hijau pucat, dan berwarna merah ketika masak seperti pada Gambar 2.5 (Prastowo *et al.*, 2010). Buah kopi terdiri atas tiga bagian, yaitu kulit buah (*epicarp*), daging buah (*mesocarp*), dan kulit buah (*endocarp*). Buah yang terbentuk akan matang selama 7-12 bulan. Setiap buah kopi memiliki dua biji kopi (Rahardjo, 2012). Adapun susunan buah kopi dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Penampilan buah kopi robusta (Prastowo *et al.*, 2010).



Gambar 2.7 Struktur buah kopi robusta. (a) *Epicarp*; (b) *Endocarp*; (c) *Mesocarp*; (d) Kulit ari; (e) Biji kopi (Wintgens, 2009).

2.3.3 Kandungan Biji Kopi Robusta

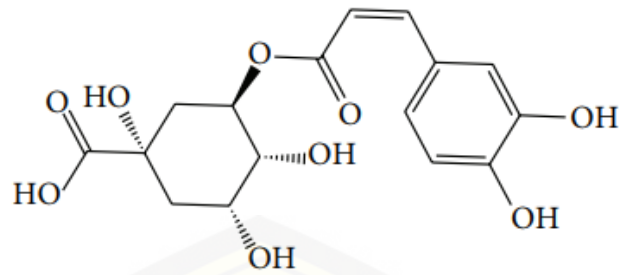
Biji kopi robusta banyak dimanfaatkan kegunaannya karena memiliki kandungan senyawa-senyawa yang bermanfaat untuk tubuh. Senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam biji kopi salah satunya adalah polifenol dan alkaloid yang menurut penelitian-penelitian sebelumnya memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi.

a. Senyawa polifenol

1) Asam klorogenat

Asam klorogenat adalah suatu senyawa yang termasuk dalam komponen fenolik dengan rumus molekul $C_{16}H_{18}O_9$ (Gambar 2.7), mempunyai sifat yang larut dalam air dan terbentuk dari esterifikasi *quinic acid* dan *transcinnamic acid* tertentu seperti asam kafeat, asam ferulat, dan *pcoumaric acid* (Farhaty & Muchtaridi, 2016). Jumlah asam klorogenat yang terkandung dalam kopi mencapai 90% dari total fenol (Wigati *et al.*, 2019).

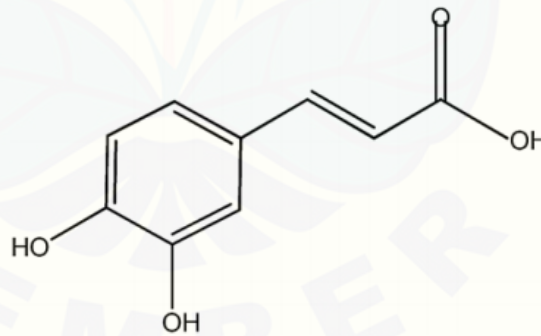
Asam klorogenat telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang cukup kuat, antiinflamasi, antibakteri dan antivirus (Wigati *et al.*, 2018). Asam klorogenik memiliki aktivitas antiinflamasi yang kuat dengan menurunkan sekresi dari sitokin proinflamasi. Sitokin proinflamasi ini antara lain TNF- α dan IL-6. Asam klorogenat mengurangi produksi TNF- α dengan menekan ekspresi COX-2 (Jung *et al.*, 2017).



Gambar 2.8 Struktur kimia asam klorogenat (Nuhu, 2014)

2) Asam kafeat

Asam kafeat adalah senyawa fenolik yang memiliki rumus molekul $C_9H_8O_4$ dan struktur *3,4-dihydroxycinnamic acid* (Gambar 2.8). Asam ini banyak ditemukan di buah-buahan atau sayur-sayuran. Asam kafeat memiliki banyak aktivitas biologis seperti efek antioksidan, antikanker, antivirus, antiinflamasi, dan antidiabetes (Yang *et al.*, 2013). Asam kafeat dapat menghambat ekspresi dari IL-8, IL1 β , IL-6, and TNF- α (Liu *et al.*, 2014). Selain itu, asam kafeat juga dapat menekan aktivasi NF κ B yang mempunyai peran penting dalam proses inflamasi (Yang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Stähli *et al.*, 2019).

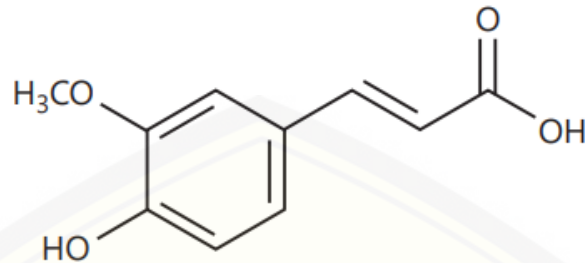


Gambar 2.9 Struktur kimia asam kafeat (Magnani *et al.*, 2014)

3) Asam ferulat

Asam ferulat termasuk ke dalam senyawa fenolik dengan rumus molekul $C_{10}H_{10}O_4$ (Gambar 2.9). Asam ferulat memiliki toksisitas yang rendah dan memiliki efek antiinflamasi, antioksidan, antimikroba dan antikanker (Zduńska *et al.*, 2018). Asam ferulat dapat menghambat ekspresi dari NF-

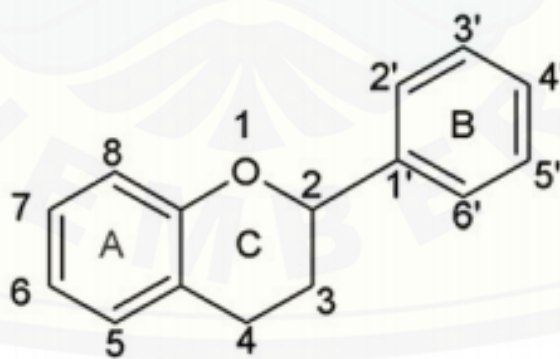
κ B dan COX-2 serta dapat menghambat beberapa sitokin proinflamasi seperti IL-1 β dan IL-6 (Zhang *et al.*, 2018).



Gambar 2.10 Struktur kimia asam ferulat (Zduńska *et al.*, 2018)

4) Flavonoid

Flavonoid terdiri dari sekelompok besar senyawa polifenol yang memiliki struktur benzo- γ -pyrone (Gambar 2.10) dan terdapat banyak pada tanaman (Kumar & Pandey, 2013). Flavonoid memiliki efek antiinflamasi, antioksidan, antikanker, antibakteri dan antivirus (Kumar & Pandey, 2013; Panche *et al.*, 2016). Flavonoid menghambat pelepasan enzim siklooksigenase secara ireversibel (prostaglandin sintetase), yang akan mengurangi pembentukan prostaglandin dan menekan proses inflamasi. Penekanan pada proses inflamasi ini menghasilkan penurunan jumlah sel neutrofil (Putri *et al.*, 2017).



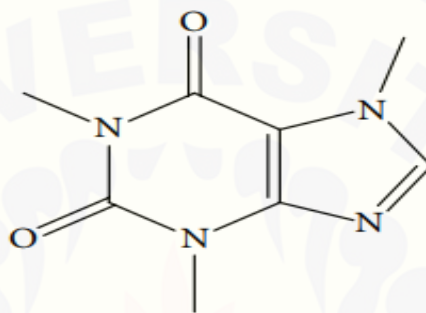
Gambar 2.11 Struktur kimia flavonoid (Panche *et al.*, 2016)

b. Senyawa alkaloid

Senyawa alkaloid yang terkandung dalam kopi robusta adalah kafein. Kafein adalah senyawa alkaloid yang termasuk jenis metilxanthine (1,3,7-trimetilxanthine) atau $C_8H_{10}N_4O_2$ (Gambar 2.11). Kafein dalam kondisi

murni berupa serbuk putih berbentuk kristal prisma hexagonal, dan merupakan senyawa tidak berbau, serta berasa pahit (Nuhu, 2014; Tanauma, 2016).

Kafein dapat menurunkan $\text{TNF-}\alpha$ dan IL-6 yang tersekresi karena adanya induksi dari LPS. Kafein mempunyai efek antiinflamasi dengan meregulasi aktivitas dari NF κ B yang dapat mengekspresikan COX-2 dan sitokin (Jung *et al.*, 2017).



Gambar 2.12 Struktur kimia kafein (Nuhu, 2014)

2.4 Pengaruh Kopi terhadap Sel Makrofag dan Limfosit

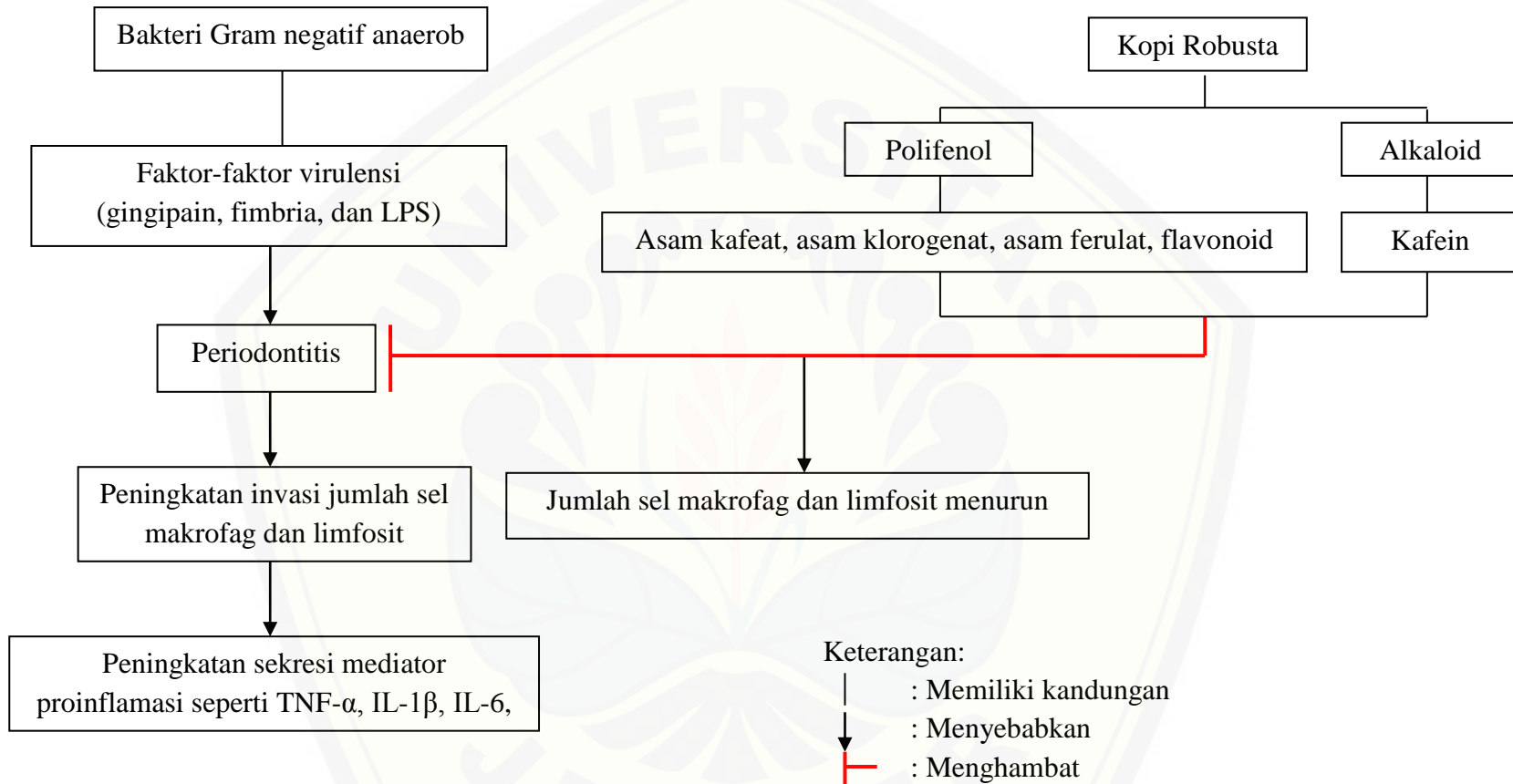
Periodontitis merupakan penyakit inflamasi pada jaringan pendukung gigi yang dapat disebabkan oleh akumulasi bakteri plak yang mengandung Gram negatif anaerob, seperti *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *T. denticola*, dan *A. actinomycetemcomitans*. *P. gingivalis* berkaitan erat dengan terjadinya periodontitis kronis dengan mengeluarkan LPS yang dapat dikenali oleh sistem imun *host*. LPS ini akan menstimulasi respons inflamasi dalam jaringan sehingga terjadi peningkatan pelepasan sitokin proinflamasi ($\text{TNF-}\alpha$, IL- 1β , IL-6, PGE2) yang diproduksi oleh sebagian besar tipe sel, termasuk sel-sel inflamasi (neutrofil, makrofag, dan limfosit) (Newman *et al.*, 2019).

Kopi memiliki kandungan senyawa aktif seperti senyawa polifenol dan alkaloid yang mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi. Senyawa polifenol dan alkaloid dalam kopi memiliki kemampuan untuk menghambat produksi sitokin proinflamasi oleh sel makrofag dan limfosit dan mengontrol aktivitas NF κ B (Ermawati, 2015; Jung *et al.*, 2017; Putri *et al.*, 2017). Polifenol dapat

mempengaruhi sistem enzimatik yang terlibat dalam proses inflamasi. *Tyrosine* dan *serine-threonine* merupakan enzim yang diketahui terlibat dalam proses aktivasi sel seperti proliferasi sel limfosit T dan aktivasi sel limfosit B, sehingga jumlah dari sel limfosit yang terlibat dalam proses inflamasi dapat terkontrol (Hussain *et al.*, 2016).

Pada saat kondisi inflamasi, kadar dari sitokin proinflamasi akan meningkat. Berdasarkan Ermawati (2015), pemberian gel ekstrak kopi robusta yang memiliki aktivitas antiinflamasi dapat menghambat ekspresi TNF- α yang berarti menurunkan derajat inflamasi. TNF- α dapat diproduksi oleh berbagai sel antara lain makrofag, neutrofil, limfosit dan sel mast. Menurut Prasetya (2013), penghambatan dari mediator inflamasi seperti IL-1 dan TNF- α mampu menurunkan infiltrasi dari makrofag.

2.5 Kerangka Konsep



Gambar 2.13 Kerangka konsep

2.6 Hipotesis

Seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) dapat menurunkan jumlah sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan yang digunakan *the post test only control group design*, yaitu melakukan pengamatan atau pengukuran setelah perlakuan dan hasilnya dibandingkan dengan kontrol (Notoatmodjo, 2014).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2019 - selesai

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di:

- a. Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember untuk identifikasi tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*).
- b. Laboratorium Farmakologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk aklimatisasi dan proses perlakuan hewan coba.
- c. Laboratorium Mikrobiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk identifikasi dan pembuatan suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis*.
- d. Laboratorium Histologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk *processing* jaringan dan pembuatan preparat histologi.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

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

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dari penelitian ini adalah:

a. Bakteri *P. gingivalis*

Penelitian menggunakan bakteri *P. gingivalis* strain ATCC 33277.

b. Konsentrasi suspensi bakteri *P. gingivalis*

Konsentrasi suspensi bakteri *P. gingivalis* yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 2×10^9 CFU/ml.

c. Kriteria hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian adalah tikus putih Wistar jantan dengan berat badan 180-200 gram, berumur 2-3 bulan, dan kondisi umum baik.

d. Pemeliharaan hewan coba

Semua kelompok diberikan pakan standar dan minum secara *ad libitum*, serta diadaptasi selama satu minggu sebelum perlakuan dilakukan.

e. Eutanasia hewan coba

Hewan coba dilakukan eutanasia dengan teknik inhalasi yang menggunakan *ethyl ether*.

3.4 Definisi Operasional

1. Seduhan kopi robusta

Seduhan kopi robusta adalah sediaan kopi berupa seduhan yang dibuat dengan melarutkan bubuk kopi robusta murni dalam air. Pemberian seduhan kopi robusta dilakukan satu kali sehari secara sondase pada tikus sebanyak 3,6 ml/hari setiap sore selama 14 hari.

2. Model tikus periodontitis

Model tikus periodontitis adalah hewan coba tikus yang dibuat mengalami periodontitis dengan cara diinduksi *P. gingivalis*. Kondisi periodontitis yang

terjadi ditandai dengan adanya warna kemerahan pada gingiva, resesi gingiva, dan pada gambaran radiografis terlihat adanya resorpsi tulang alveolar.

3. Jumlah sel makrofag

Makrofag adalah sel yang berukuran besar dengan sel yang berbentuk tidak teratur, memiliki nukleus berbentuk bulat atau seperti ginjal yang berwarna keunguan dan sitoplasma berwarna merah muda transparan (Junquiera & Mescher, 2016). Pengamatan makrofag dilakukan pada jaringan gingiva gigi molar pertama kiri bawah bagian bukal. Jumlah makrofag diamati secara histologis menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dan menggunakan pewarna HE.

4. Jumlah sel limfosit

Limfosit merupakan sel tunggal dengan bentuk bulat dan inti berwarna ungu gelap, inti berbentuk bulat yang hampir memenuhi sitoplasma yang berwarna merah muda pucat yang hampir tidak terlihat (Junquiera dan Mescher, 2016). Pengamatan limfosit dilakukan pada jaringan gingiva gigi molar pertama kiri bawah bagian bukal. Jumlah limfosit diamati secara histologis menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dan menggunakan pewarna HE.

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah hewan coba tikus dengan kriteria inklusi sebagai berikut:

- a. Tikus putih Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan
- b. Berat badan \pm 180-200 gram
- c. Usia tikus \pm 2-3 bulan
- d. Tikus dalam kondisi sehat

Kriteria eksklusi adalah tikus yang mati selama penelitian dan dinyatakan *drop out* sehingga diganti dengan tikus lain yang sesuai dengan kriteria inklusi.

3.5.2 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari penghitungan rumus sebagai berikut (Daniel, 2005).

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

Keterangan:

n : besar sampel tiap kelompok

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

σ : standar deviasi sampel

d : kesalahan yang masih dapat ditoleransi

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

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

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

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

$$n \geq 4$$

Berdasarkan rumus di atas, jumlah sampel minimum yang harus digunakan adalah 4 sampel untuk masing-masing kelompok. Pada penelitian ini penulis menggunakan 20 ekor tikus sebagai sampel yang terbagi secara acak dalam 5 kelompok dengan rincian sebagai berikut:

- a. Kelompok normal (N) (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang tidak diinduksi *P. gingivalis*, tidak diberikan seduhan kopi robusta, dan dieutanasia pada hari ke-15.
- b. Kelompok P5 (8 ekor tikus) yaitu kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* yang dibagi menjadi 2 sub kelompok:
 - 1) Kelompok P5-A (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* dan dieutanasia pada hari ke-19.
 - 2) Kelompok P5-B (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis*, diberi seduhan kopi robusta robusta dan dieutanasia pada hari ke-19.
- c. Kelompok P7 (8 ekor tikus) yaitu kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* yang dibagi menjadi 2 sub kelompok:
 - 1) Kelompok P7-A (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* dan dieutanasia pada hari ke-21.

- 2) Kelompok P7-B (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis*, diberi seduhan kopi robusta robusta dan dieutanasia pada hari ke-21.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Oven, *centrifuge*, *handscoon* (Sensi), masker, lemari es, *ice box*, tampon steril, *plastis filling instrument* (Dentica), pisau model kecil, lap meja, *rat dental chair*, kandang hewan coba, wadah minum, *cutter*, *syringe* 1 ml, pinset anatomis, *scalpel*, gunting bedah, meja bedah hewan, *object glass*, *cover glass*, kuas kecil, alat cetak parafin, *waterbath*, toples kecil, pensil, spidol, timbangan digital, rak pengecatan, mikrotom, *cassette tissue*, mikroskop cahaya binokular (Olympus), kamera mikroskop (Optilab), *tuberculine syringe* 30 gauge.

3.6.2 Bahan Penelitian

Tikus putih Wistar jantan dengan berat badan \pm 180-200 gram dan usia \pm 2-3 bulan, *P. gingivalis* strain ATCC 33277 (Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember), bubuk kopi robusta (Perkebunan Kopi Rakyat Garahan, Jember), pakan standar (Turbo, Indonesia), air minum, *blood agar*, BHI-B (*Brain Heart Infusion Broth*), *ethyl ether*, formalin 10%, (Olympus), aquades steril, *hematoxylin eosin*, *xylol*, alkohol, parafin, ketamin HCl, asam formiat 10%, tisu, kertas saring.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Persiapan Penelitian

Persiapan pertama yang dilakukan adalah pengajuan *ethical clearance* ke Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember (Lampiran A).

3.7.2 Identifikasi Tanaman Kopi Robusta

Identifikasi tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) dilakukan di Laboratorium Tanaman Politeknik Jember (Lampiran C).

3.7.3 Identifikasi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Identifikasi *P. gingivalis* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember (Lampiran D).

3.7.4 Pembuatan Suspensi *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis dibiakkan pada media *blood agar* untuk menumbuhkan koloni dari bakteri tersebut. Kemudian koloni *P. gingivalis* yang telah dibiakkan diambil sebanyak 1-2 ose dan diletakkan pada 1 ml BHI-B yang dicampur dengan vitamin K dan hemin. Media BHI-B yang telah terisi dengan koloni *P. gingivalis* ini kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Selanjutnya mengambil sebanyak 200 µl suspensi bakteri dan memasukkan dalam NaCl 0,45% sebanyak 1 ml, kemudian dihomogenkan lagi menggunakan *vortex*. Berdasarkan pada penelitian pendahuluan, konsentrasi *P. gingivalis* untuk periodontitis eksperimental ditentukan sebesar 2×10^9 CFU/ml (Alibasyah *et al.*, 2018).

3.7.5 Pembuatan Seduhan Kopi Robusta

Pada manusia, di dalam 1 cangkir kopi dengan 200 ml air mengandung 10 gram bubuk kopi. Bubuk kopi dilarutkan dalam air mendidih (100°C). Konstanta konversi dosis dari manusia (70 kg) ke tikus (200 gram) adalah 0,018. Setelah dilakukan konversi ke tikus dosis kopi menjadi 10 gram/hari x 0,018 = 0,18 gram/hari (Prakoso *et al.*, 2017). Dosis tersebut dikonversi ke tikus dengan penghitungan sebagai berikut (Yustisiani & Andari, 2017):

$$\frac{10 \text{ gram}}{200 \text{ ml}} = \frac{0,18 \text{ gram}}{X}$$

$$X = 3,6 \text{ ml}$$

Bubuk kopi sebanyak 0,18 gram kemudian dilarutkan ke dalam 3,6 ml air mendidih ditunggu hingga suhunya turun. Seduhan kopi robusta tersebut kemudian disaring sehingga ampas kopi tidak ikut terambil. Sesuai dengan hasil konversi dosis ke tikus maka dilakukan sondase pada tikus sebanyak 3,6 ml/hari setiap sore selama 14 hari.

3.7.6 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus dengan kriteria inklusi yang sudah ditentukan. Sebelum penelitian, tikus diaklimatisasi dengan lingkungan selama satu minggu sambil diamati kesehatannya. Setelah diaklimatisasi, tikus ditimbang berat badannya. Selanjutnya hewan coba dikelompokkan menjadi 5 kelompok secara acak.

3.7.7 Pelaksanaan Penelitian

a. Induksi *P. gingivalis*

Induksi *P. gingivalis* dilakukan untuk membuat model tikus periodontitis. *P. gingivalis* diinjeksikan pada sulkus gingiva gigi molar pertama kiri bawah bagian bukal 0,05 ml dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml. Injeksi dilakukan 3 hari sekali selama 14 hari untuk menciptakan kondisi periodontitis (Ermawati, 2015). Kondisi periodontitis ini ditandai dengan adanya warna kemerahan pada gingival dan pada pemeriksaan radiografi terlihat adanya resorpsi tulang alveolar (Reddy, 2017).

b. Pembagian kelompok hewan coba

Kelompok hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok dengan rincian perlakuan sebagai berikut:

- 1) Kelompok normal (N) (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang tidak diinduksi *P. gingivalis* dan tidak diberikan seduhan kopi robusta secara sondase kemudian dieutanasia pada hari ke-15.
- 2) Kelompok P5 yaitu kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* sebanyak 0,05 ml dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml sebanyak 3 hari sekali selama 14 hari, terdiri dari 8 ekor tikus, kemudian dibagi menjadi 2 sub kelompok:
 - a) Kelompok P5-A (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* sebanyak 0,05 ml dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml sebanyak 3 hari sekali selama 14 hari dan dijadikan sebagai kontrol, kemudian dieutanasia pada hari ke-19.
 - b) Kelompok P5-B (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* sebanyak 0,05 ml dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml sebanyak 3 hari sekali selama 14 hari dan diberi seduhan kopi

robusta dimulai sejak hari ke-1 sebanyak 3,6 ml/hari setiap sore secara sondase kemudian dieutanasia pada hari ke-19.

- 3) Kelompok P7 yaitu kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* sebanyak 0,05 ml dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml sebanyak 3 hari sekali selama 14 hari, terdiri dari 8 ekor tikus, kemudian dibagi menjadi 2 sub kelompok:
 - a) Kelompok P7-A (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* sebanyak 0,05 ml dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml sebanyak 3 hari sekali selama 14 hari dan dijadikan sebagai kontrol, kemudian dieutanasia pada hari ke-21.
 - b) Kelompok P7-B (4 ekor tikus) merupakan kelompok tikus yang diinduksi *P. gingivalis* sebanyak 0,05 ml dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml sebanyak 3 hari sekali selama 14 hari dan diberi seduhan kopi robusta dimulai sejak hari ke-1 sebanyak 3,6 ml/hari setiap sore secara sondase kemudian dieutanasia pada hari ke-21.

3.7.8 Pembuatan Sediaan Histologis

Kelompok hewan coba dilakukan eutanasia menggunakan teknik inhalasi yaitu dengan meletakkan kapas yang sudah ditetesi *ethyl ether* ke dalam ruang atau kotak yang tertutup. Volume eter yang digunakan ± 5 ml selama 6-10 menit (Miranda *et al.*, 2011).

Setelah dieutanasia, rahang kiri bawah hewan coba dipotong mulai dari mesial gigi insisivus sampai bagian posterior kiri tikus beserta jaringan lunak (gingiva) bagian bukal dan lingual. Potongan rahang bawah tersebut harus segera difiksasi untuk mencegah terjadinya degenerasi. Fiksasi dilakukan dengan menggunakan larutan formalin 10% selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan tahap dekalsifikasi jaringan menggunakan asam formiat 10% selama 7 hari dengan cara potongan rahang bawah diambil dari larutan fiksasi kemudian dicuci menggunakan *xylol*. Setelah itu potongan rahang bawah dimasukkan dalam larutan dekalsifikasi sampai jaringan lunak mudah dipotong dengan cara ditusuk menggunakan jarum sampai dapat menembus jaringan dan menembus tulang. Rendaman asam formiat 10% diganti setiap 3 hari sekali.

Rahang bawah tikus yang telah dipotong kemudian dibuat sediaan histologi dengan prosedur sebagai berikut (Tim Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, 2007):

a. Dehidrasi

Dehidrasi merupakan proses penarikan air dari potongan organ dengan cara merendam ke dalam larutan alkohol. Proses perendaman dilakukan dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi. Tahapan dehidrasi sebagai berikut:

- 1) Alkohol 70% selama 15 menit
- 2) Alkohol 80% selama 1 jam
- 3) Alkohol 95% selama 2 jam
- 4) Alkohol absolut selama 1 jam
- 5) Alkohol absolut selama 1 jam
- 6) Alkohol absolut selama 1 jam

b. *Clearing*

Proses *clearing* bertujuan untuk menghilangkan alkohol sebelum jaringan ditanam pada parafin. Jaringan direndam dalam larutan *xylol* sebanyak 3 kali masing-masing selama 1 jam.

c. Infiltrasi (impregnasi)

Impregnasi merupakan proses infiltrasi bahan parafin dalam jaringan pada suhu 50°C-60°C. Jaringan diletakkan pada *cassette tissue* yang sudah diberi label sebagai identitas sampel, kemudian dimasukkan ke dalam parafin sebanyak 3 kali masing-masing selama 2 jam.

d. Pembuatan blok (*embedding*)

Proses *embedding* merupakan proses penanaman jaringan ke dalam parafin cair pada alat cetak blok. Tahap pertama adalah alat cetak disiapkan dan diletakkan di atas permukaan kaca. Alat dan alas kaca diolesi dengan gliserin agar dapat memudahkan dalam pemisahan alat cetak dengan blok parafin yang kaku. Kemudian parafin cair dituangkan ke dalam alat cetak blok hingga penuh pada permukaannya, lalu jaringan yang telah diimpregnasi dimasukkan ke dalamnya. Selanjutnya didiamkan beberapa menit hingga parafin mengeras. Apabila sudah cukup keras, alat cetak dilepaskan dan blok parafin diberi label.

e. *Sectioning*

Pemotongan jaringan dilakukan dengan arah potong bukal lingual dan menggunakan mikrotom. Berikut tahapan pemotongan jaringan:

- 1) Meletakkan blok parafin pada mikrotom.
- 2) Pisau mikrotom harus dalam keadaan bersih, kemudian pisau dipasang pada posisinya.
- 3) Mengatur indikator yang menunjukkan ketebalan pemotongan sebesar 6 μm .
- 4) Memindahkan hasil sayatan berupa pipa tipis dengan hati-hati dalam *water bath* dengan temperatur tetap 56 °C- 58 °C menggunakan pinset kecil agar sayatan jaringan dapat mengambang dengan baik.
- 5) Hasil sayatan diseleksi dan dipindahkan di atas *object glass* dan diberi label sesuai dengan label yang berada pada blok.
- 6) Sediaan jaringan dibiarkan kering selama minimal 12 jam, lalu dilakukan pengecatan.

f. Pengecatan

Proses pengecatan dilakukan menggunakan *hematoxylin eosin* dengan tahapan sebagai berikut:

1) Deparafinisasi

Proses deparafinisasi dilakukan dengan merendam sediaan jaringan dalam larutan *xylol* selama 2-3 menit dan dilakukan sebanyak 2 kali.

2) Rehidrasi

Rehidrasi dilakukan dengan merendam sediaan jaringan secara berurutan mulai dari perendaman dengan alkohol absolut dan alkohol 95% masing-masing sebanyak 2 kali selama 3 menit. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 10 menit.

3) Pengecatan

Sediaan jaringan dilakukan pengecatan dengan *Hematoxylin* selama 15 menit, kemudian dibilas menggunakan air mengalir selama 20 menit. Selanjutnya dilakukan pengecatan dengan menggunakan eosin selama 15 detik-20 menit.

4) Dehidrasi

Tahap dehidrasi dilakukan secara berurutan dari perendaman dengan alkohol 95% kemudian alkohol absolut sebanyak 2 kali masing-masing selama 2-3 menit.

5) *Clearing*

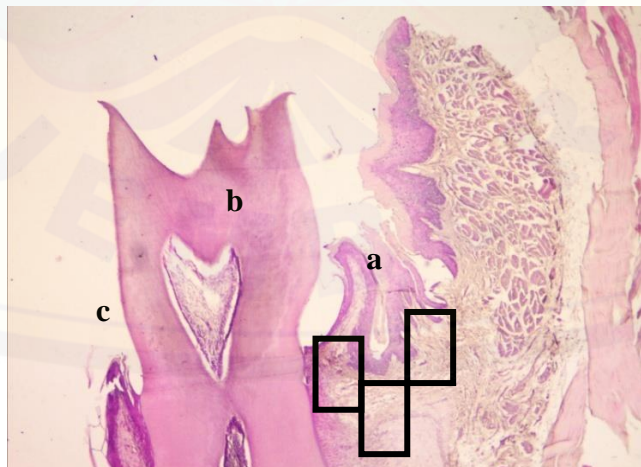
Sediaan jaringan direndam dalam larutan *xylol* selama 3 menit sebanyak 3 kali.

6) *Mounting*

Sediaan jaringan dilakukan *mounting* dengan entelan selama 5 menit kemudian ditutup dengan *cover glass*.

3.7.9 Pengamatan dan Penghitungan Jumlah Sel Makrofag dan Limfosit

Data penelitian diperoleh dari pengamatan histologi dari tiap sediaan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Satu sediaan diamati pada 3 lapang pandang (Gambar 3.1). Pengamatan dilakukan oleh 3 pengamat yang terlebih dahulu disamakan persepsinya dengan tujuan mendapatkan hasil yang akurat. Jumlah makrofag dan limfosit tiap sediaan ditentukan dengan jumlah rata-rata hasil pengamatan 3 pengamat dari 3 lapang pandang. Hasil penghitungan jumlah makrofag dan limfosit dari semua kelompok dan dimasukkan dalam *Dummy Table*.

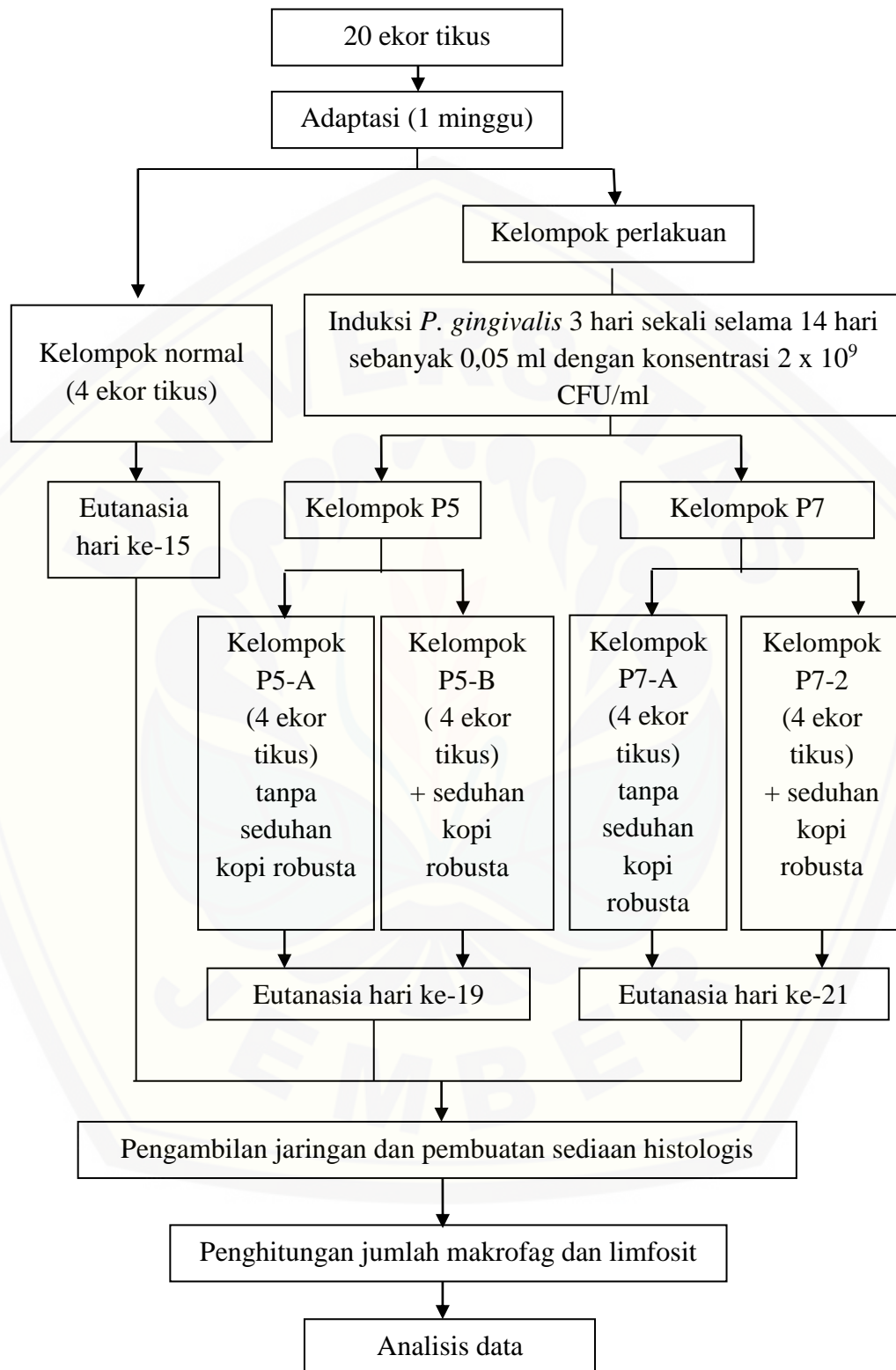


Gambar 3.1 Sediaan histologi gigi molar pertama rahang kiri bawah tikus. (a) Jaringan gingiva bagian bukal; (b) Gigi; (c) Jaringan gingiva bagian lingual. Tiga lapang pandang pengamatan (kotak hitam) (Dokumentasi pribadi).

3.8 Analisis Data

Analisis data didahului dengan melakukan uji normalitas dan homogenitas. Uji normalitas menggunakan Shapiro-wilk dan uji homogenitas menggunakan *Levene Test* ($\alpha > 0,05$). Apabila kedua uji menunjukkan data berdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji statistik parametrik menggunakan *one way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan masing-masing kelompok ($\alpha < 0,05$) kemudian dilanjutkan uji LSD (*least significance difference*) untuk mengetahui besarnya perbedaan antar kelompok ($\alpha < 0,05$). Tetapi apabila data tidak berdistribusi normal atau tidak homogen maka dilakukan uji statistik nonparametrik Kruskal Wallis ($\alpha < 0,05$) dan dilanjutkan dengan uji statistik Mann-Whitney ($\alpha < 0,05$).

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) dapat menurunkan jumlah sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan terkait dengan hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis dan durasi pemberian seduhan kopi robusta yang lebih efektif dalam menghambat proses inflamasi.
2. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai efek pemberian seduhan kopi robusta terhadap ekspresi mediator inflamasi lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Affonso, R. C. L., Voytena, A. P. L., Fanan, S., Pitz, H., Coelho, D. S., Horstmann, A. L., ... & Ribeiro-do-Valle, R. M. 2016. Phytochemical composition, antioxidant activity, and the effect of the aqueous extract of coffee (*Coffea arabica L.*) bean residual press cake on the skin wound healing. *Oxidative Medicine and Cellular longevity*, <https://doi.org/10.1155/2016/1923754>.
- Alibasyah, Z. M., Ningsih, D. S., & Ananda, S. F. 2018. Daya hambat minuman probiotik yoghurt susu sapi terhadap *Porphyromonas gingivalis* secara *in vitro*. *Journal Of Syiah Kuala Dentistry Society*, 2(3), 65-75.
- Amalina, R. (2020). Perbedaan jumlah *Actinobacillus actinomycetemcomitans* pada periodontitis agresif berdasarkan jenis kelamin. *Majalah Ilmiah Sultan Agung*, 49(124), 36-49.
- Arango Duque, G., & Descoteaux, A. 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 5(491), 1-12.
- Chickanna, R., Prabhuji, M. L. V., & Nagarjuna, M. S. V. 2015. Host-bacterial interplay in periodontal disease. *Journal of the International Clinical Dental Research Organization*, 7(1), 44.
- Chismirina, S., Andayani, R., & Ginting, R. 2014. Pengaruh kopi arabika (*Coffea Arabica*) dan kopi robusta (*Coffea Canephora*) terhadap viskositas saliva secara *in vitro*. *Cakradonya Dental Journal*, 6(2), 687-691.
- Choi, S., Jung, S., & Ko, K. S. 2018. Effects of coffee extracts with different roasting degrees on antioxidant and anti-inflammatory systems in mice. *Nutrients*, 10(3), 363.
- Daniel, W. 2005. *Biostatic A Foundation for Analytic in The Health Science 6th Edition*. Canada: John Wiley dan Sons, Inc.
- Dimas, U. B. S., Arina, Y. M. D., Amin, M. N. 2014. Pengaruh ekstrak daun pepaya terhadap jumlah sel limfosit pada gingiva tikus wistar jantan yang mengalami periodontitis (The effect of papaya leaves extract to the

number of lymphocytes cells to the male-wistar rat's gingiva that undergo periodontitis). *Pustaka Kesehatan*, 2(1), 50-57.

Ditya, A. P. P. 2019. Efek ekstrak polifenol biji kopi robusta (*coffea robusta*) terhadap jumlah sel limfosit pada tikus periodontitis yang diinduksi *Porphyromonas gingivalis*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Dumitrescu, A. L., & Kawamura, M. 2010. Etiology of periodontal disease: dental plaque and calculus. In *Etiology and Pathogenesis of Periodontal disease* (pp. 1-38). Berlin Heidelberg: Springer.

Erić, Ž. 2019. Proinflammatory cytokines in a newborn: a literature review. *Signa Vitae-A Journal in Intensive Care and Emergency Medicine*, 15(2).

Ermawati, T. 2015. Potensi gel ekstrak biji kopi robusta (*Coffea robusta*) terhadap ekspresi TNF- α pada tikus periodontitis yang diinduksi *Porphyromonas gingivalis*. *Repository Universitas Jember*.

Eroschenko, V. P., & Di Fiore, M. S. 2013. *Difiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Farah, A., & de Paula Lima, J. 2019. Consumption of chlorogenic acids through coffee and health implications. *Beverages*, 5(1), 11.

Farhaty, N., & Muchtaridi, M. 2016. Tinjauan kimia dan aspek farmakologi senyawa asam klorogenat pada biji kopi. *Farmaka*, 14(1), 214-227.

Fatimatuzzahro, N., & Prasetya, R. C. 2018. Efek seduhan kopi robusta terhadap profil lipid darah dan berat badan tikus yang diinduksi diet tinggi lemak. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 30(1), 7-11.

Haniastuti, T. 2009. Penurunan aktivitas fagositosis sel makrofag mencit setelah distimulasi minyak atsiri kencur terhadap *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Dentika Dental Journal*, 14(1), 11-14.

Hirayama, D., Iida, T., & Nakase, H. 2017. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 92.

- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. 2016. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>.
- Hwang, S. J., Kim, Y. W., Park, Y., Lee, H. J., & Kim, K. W. 2014. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation Research*, 63(1), 81-90.
- Jung, S., Kim, M. H., Park, J. H., Jeong, Y., & Ko, K. S. 2017. Cellular antioxidant and anti-inflammatory effects of coffee extracts with different roasting levels. *Journal of Medicinal Food*, 20(6), 626-635.
- Junqueira, L. C., & Mescher, A. L. 2016. *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas*. New York: McGraw-Hill Medical.
- Kahpi, A. 2018. Budidaya dan produksi kopi di sulawesi bagian selatan pada abad ke-19. *Lensa Budaya: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Budaya*, 12(1), 13-26.
- Kementrian Kesehatan RI. 2018. Laporan Nasional RISKESDAS. p: 207
- Kumar V, Abbas A, Fausto N. 2015. *Pathologic Basis of Disease*. New York: Elsevier.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.
- Kurniawati, I., Pujiastuti, P., & Dharmayanti, A. W. S. 2016. Kadar kalsium (Ca) dalam cairan krevikular gingiva pada penderita periodontitis kronis. *Odonto: Dental Journal*, 2(2), 8-13.
- Levani, Y. 2018. Perkembangan Sel Limfosit B Dan Penandanya Untuk Flowcytometry. *Jurnal Berkala Ilmiah Kedokteran dan Kesehatan*, 1(5), 50-57.
- Liang, N., & Kitts, D. D. 2016. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*, 8(1), 16.

- Liu, M., Song, S., Li, H., Jiang, X., Yin, P., Wan, C., ... & Xu, J. 2014. The protective effect of caffeic acid against inflammation injury of primary bovine mammary epithelial cells induced by lipopolysaccharide. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2856-2865.
- Magnani, C., Isaac, V. L. B., Correa, M. A., & Salgado, H. R. N. 2014. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. *Analytical Methods*, 6(10), 3203-3210.
- Mani, A., James, R., & Mani, S. 2018. Etiology and pathogenesis of aggressive periodontitis: a mini review. *Galore International Journal of Health Sciences and Research*, 3(2), 4-8.
- Miranda, E. G. D., Nascimento, V. P. D., Waisberg, D. R., Sousa, M. W. G. D., Lima, M. F. M. B., Silva, D. D. S., & Waisberg, J. 2011. Equipamento para anestesia inalatória em ratos com oferta simultânea de anestésico e oxigênio. *Acta Cirurgica Brasileira*, 26(2), 140-143.
- Najiyati, S., dan Danarti. 2012. *Kopi: Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Nandya, M. E., & Augustina, E. F. 2015. Status kesehatan jaringan periodontal pada pasien diabetes mellitus tipe 2 dibandingkan dengan pasien non diabetes mellitus berdasarkan gpi. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
- Newman, M. G., Takei, H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. A. 2019. *Newman and Carranza's Clinical Periodontology 13th Edition*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
- Notoatmodjo, S. 2014. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT Rineka Cipta.
- Nuhu, A. A. 2014. Bioactive micronutrients in coffee: recent analytical approaches for characterization and quantification. *International Scholarly Research Notices*. <https://doi.org/10.1155/2014/384230>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(e47), 1-15.

- Prakoso, L. O., Yusmaini, H., Thadeus, M. S., & Wiyono, S. 2017. Perbedaan efek ekstrak buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dan ekstrak buah naga putih (*Hylocereus undatus*) terhadap kadar kolesterol total tikus putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Gizi dan Pangan*, 12(3), 195-202.
- Prasetya, R. C. 2013. Sel makrofag gingiva tikus wistar jantan yang diinduksi periodontitis setelah pemberian ekstrak etanolik kulit manggis. *Dentofasial*, 12(3), 135-138.
- Prastowo, B., E. Karmawati, Rubijo, dan Siswanto. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Putri, K., Darsono, L., & Mandalas, H. 2017. Anti-inflammatory properties of mangosteen peel extract on the mice gingival inflammation healing process. *Padjadjaran Journal of Dentistry*, 29(3), 190-195.
- Rahardjo, Pudji. 2012. *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Reddy, S. 2017. *Essentials of Clinical Periodontology & Periodontics*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publisher.
- Sell, A. M., de Alenca, J. B., Laguila, J. E., & Silva, C. O. 2017. Periodontitis – A Useful Reference: Chapter 7 Immunopathogenesis of Chronic Periodontitis. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69045>.
- Stähli, A., Maheen, C. U., Strauss, F. J., Eick, S., Sculean, A., & Gruber, R. 2019. Caffeic acid phenethyl ester protects against oxidative stress and dampens inflammation via heme oxygenase 1. *International Journal of Oral Science*, 11(1), 6.
- Sulistyaningtyas, A. R. 2017. Pentingnya pengolahan basah (*wet processing*) buah kopi robusta (*Coffea robusta Lindl. Ex. De. Will*) untuk menurunkan resiko kecacatan biji hijau saat coffee grading. *Prosiding Seminar Nasional & Internasional*, 1(1), 90-94.
- Tanauma, H. A. 2016. Aktivitas antibakteri ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap bakteri *Escherichia coli*. *PHARMACON*, 5(4), 243-251.

- Tim Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. 2007. *Petunjuk Praktikum Patologi Anatomi Degenerasi dan Rahang*. Jember: Laboratorium Patologi Anatomi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Wangko, S., & Karundeng, R. 2014. Komponen sel jaringan ikat. *Jurnal Biomedik*, 6(3), S1-7.
- Wigati, E. I., Pratiwi, E., Nissa, T. F., & Utami, N. F. 2019. Uji karakteristik fitokimia dan aktivitas antioksidan biji kopi robusta (*Coffea canephora pierre*) dari Bogor, Bandung dan Garut dengan metode Dpph (1, 1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl). *FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 8(1), 59-66.
- Wintgens, J. N. 2009. *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production 2nd Edition*. Weinheim: Wiley-VCH
- Yang, W. S., Jeong, D., Yi, Y. S., Park, J. G., Seo, H., Moh, S. H., ... & Cho, J. Y. 2013. IRAK1/4-targeted anti-inflammatory action of caffeic acid. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2013/518183>
- Yudina, M. S., Gumay, A. R., & Muniroh, M. 2019. Efek pemberian ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap jumlah limfosit tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi Azoxymethane: studi di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu 4 Universitas Gadjah Mada. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, 8(1), 255-266.
- Yustisiani, A., & Andari, D. 2017. Pengaruh Pemberian Kopi Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Pada Tikus Putih Strain Wistar Diabetes Mellitus Tipe 2. *Saintika Medika: Jurnal Ilmu Kesehatan dan Kedokteran Keluarga*, 9(1), 38-45.
- Zduńska, K., Dana, A., Kolodziejczak, A., & Rotsztejn, H. 2018. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(6), 332-336.
- Zhang, S., Wang, P., Zhao, P., Wang, D., Zhang, Y., Wang, J., ... & Jiao, Y. 2018. Pretreatment of ferulic acid attenuates inflammation and oxidative stress in a rat model of lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress

syndrome. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 3. <https://doi.org/10.1177/0394632017750518>.



LAMPIRAN

Lampiran A: Surat keterangan *ethical clearence*



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.628/UN25.8/KEPK/DL/2019

Title of research protocol : "The Effects of Robusta Coffee (*Coffea canephora*) Brewing on Macrophage and Lymphocyte Cells in Rat Models of Periodontitis"

Document Approved : Research Protocol

Principal investigator : Favinas Octa Nuri Tsalats

Member of research : -

Responsible Physician : Favinas Octa Nuri Tsalats

Date of approval : November 2019 - Selesai

Place of research : 1. Lab. *Farmakologi* Bag. Biomedik FKG UNEJ
2 Lab. *Bioscience* RSGM UNEJ
3. Lab. *Histologi* Bag. Biomedik FKG UNEJ

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, November 14th 2019

Dean of Faculty of Dentistry
Universitas Jember

(*dra. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros.*)

Chairperson of Research Ethics Committee
Faculty of Dentistry Universitas Jember

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

Lampiran B: Surat ijin penelitian



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

Nomor : 7305/UN25.8.TL/2019
Perihal : Ijin Penelitian

04 DEC 2019

Kepada Yth
Ketua Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

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

- 1 Nama : Favinas Octa Nuri Tsalats
- 2 NIM : 161610101093
- 3 Semester/Tahun : VII/2019
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Jl. Mastrip 2 No. 29C
- 6 Judul Penelitian : Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Sel Makrofag dan Limfosit pada Model Tikus Periodontitis
- 7 Lokasi Penelitian : Laboratorium Farmakologi Ruang Hewan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 8 Data/alat yg di pinjam : -
- 9 Waktu : November 2019 s/d Selesai
- 10 Tujuan Penelitian : Untuk mengetahui pengaruh dari pemberian seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis
- 11 Dosen Pembimbing : 1. drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc
2. drg. Depi Praharani, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



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



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

Nomor : 7304/UN25.8.TL/2019
Perihal : Ijin Pembuatan Suspensi Bakteri

04 DEC 2019

Kepada Yth
Direktur RSGM Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

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

- 1 Nama : Favinas Octa Nuri Tsalats
- 2 NIM : 161610101093
- 3 Semester/Tahun : VII/2019
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Jl. Mastrip 2 No. 29C
- 6 Judul Penelitian : Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Sel Makrofag dan Limfosit pada Model Tikus Periodontitis
- 7 Lokasi Penelitian : Laboratorium *Bioscience* RSGM Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 8 Data/alat yg di pinjam : -
- 9 Waktu : Desember 2019 s/d Selesai
- 10 Tujuan Penelitian : Untuk mengetahui pengaruh pemberian seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis
- 11 Dosen Pembimbing :
 1. drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc
 2. drg. Depi Praharani, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an, Dekan
Wakil Dekan I
Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes., Sp. OF (K)
NIP. 196811251999032001



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

Nomor : 1306/UN25.8.TL/2019
Perihal : Ijin Identifikasi Bakteri

04 DEC 2019

Kepada Yth
Ketua Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

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

- 1 Nama : Favinas Octa Nuri Tsalats
- 2 NIM : 161610101093
- 3 Semester/Tahun : VII/2019
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Jl. Mastrip 2 No. 29C
- 6 Judul Penelitian : Efek Pemberian Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Sel Makrofag dan Limfosit pada Model Tikus Periodontitis
- 7 Lokasi Penelitian : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 8 Data/alat yg di pinjam : -
- 9 Waktu : Desember 2019 s/d Selesai
- 10 Tujuan Penelitian : Untuk mengetahui pengaruh dari pemberian seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap sel makrofag dan limfosit pada model tikus periodontitis
- 11 Dosen Pembimbing :
 1. drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc
 2. drg. Depi Praharani, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an. Dekan
Wakil Dekan I
Dr., drg. Masniari Novita, M.Kes., Sp. OF (K)
NIP. 196811251999032001

Lampiran C: Surat keterangan identifikasi tanaman kopi robusta

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



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

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

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 24/PL17.3.1.02/LL/2019

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 5737/UN25.8/TL/2019 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Favinas Octa Nuri Tsalats
NIM : 161610101093
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, 12 September 2019

Ka. Laboratorium Tanaman



Ir. Lilik Mastuti, MP

NIP. 195808201987032001

Lampiran D: Surat keterangan identifikasi bakteri *Porphyromonas gingivalis*

**LABORATORIUM MIKROBIOLOGI
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

SURAT KETERANGAN

Sehubungan dengan keperluan penelitian yang dilakukan oleh :

Nama : Favinas Octa Nuri Tsalat
NIM : 161610101093
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember

Kami menerangkan bahwa identifikasi terhadap isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis* dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan hasil "coccobacillus Gram negatif".

Mengetahui,
Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi



(drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed)
NIP. 198006032006042002

Penanggung Jawab Lab. Mikrobiologi



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

Lampiran E: Alat dan bahan penelitian

E.1 Alat penelitian



Rat dental chair



Tuberculin syringe 1 ml



Kanul sondase



Jarum 30 Gauge



Plastic filling instrumen & pisau malam



Set alat bedah



Timbangan digital



Tissue cassette



Tissue processing



Rotary mikrotom



Mikroskop cahaya binokular



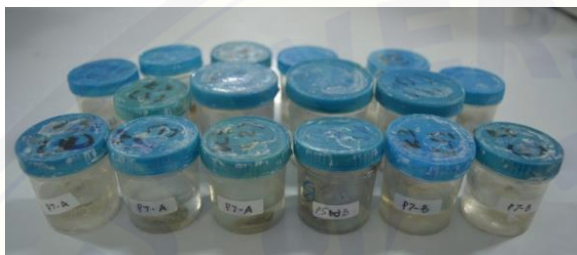
Optilab 3.0



Bunsen



Slide warmer



Tempat jaringan



Chamber



Water bath

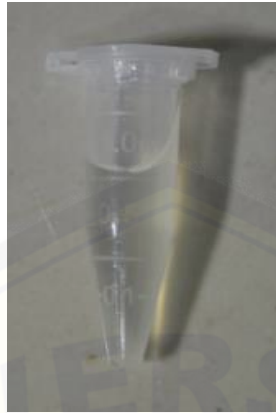


Kandang & tempat minum tikus

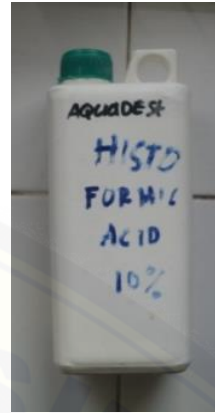
E.2 Bahan penelitian



Bubuk kopi robusta



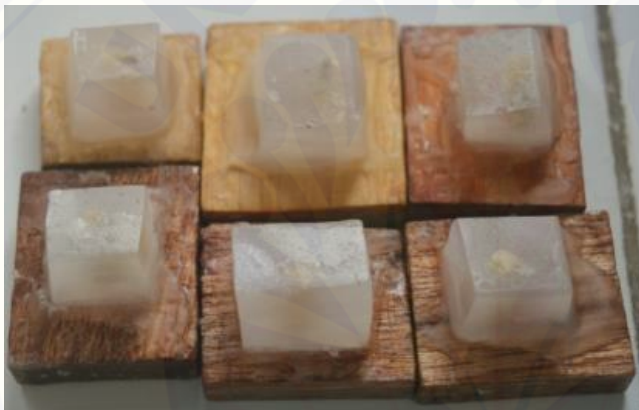
Bakteri *P. gingivalis*



Asam formiat



Entelan



Blok parafin



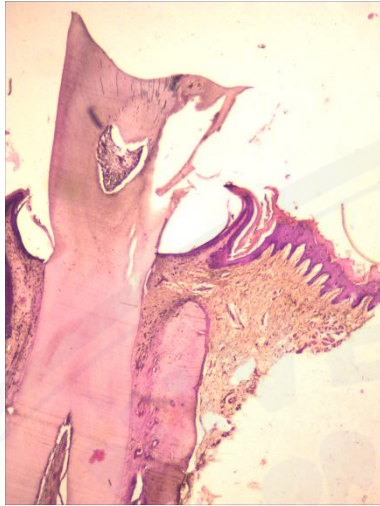
Pewarna HE



Tisu

Lampiran F: Foto hasil penelitian (sediaan histologi)

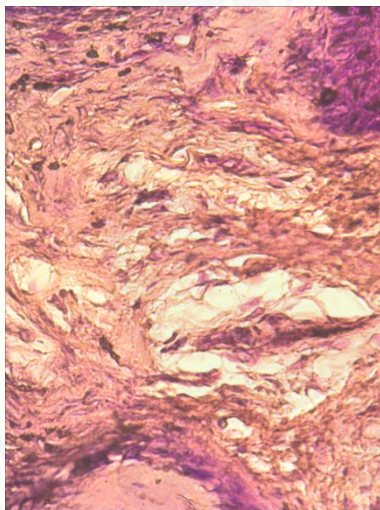
F.1 Kelompok normal



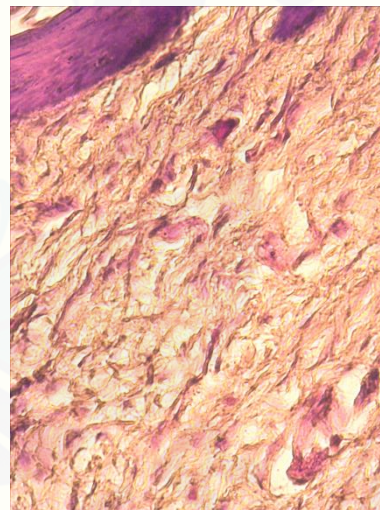
Perbesaran 40x



Perbesaran 100x

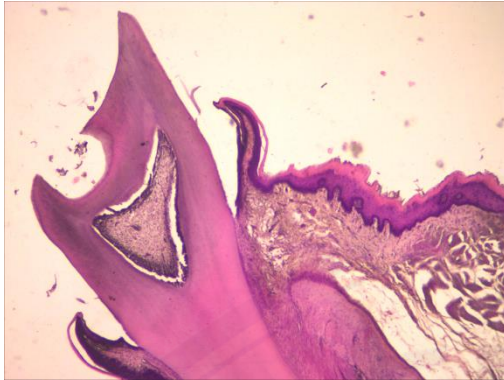


Perbesaran 400x

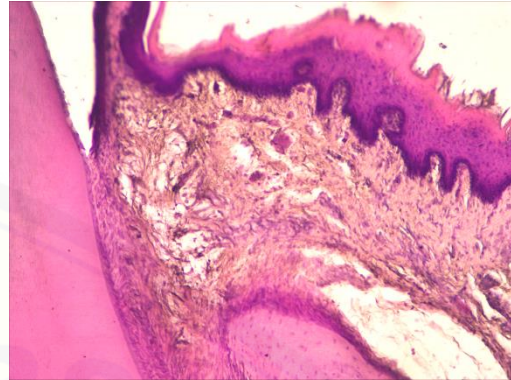


Perbesaran 400x

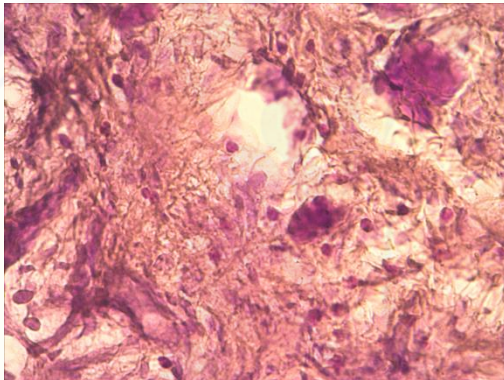
F.2 Kelompok P5-A



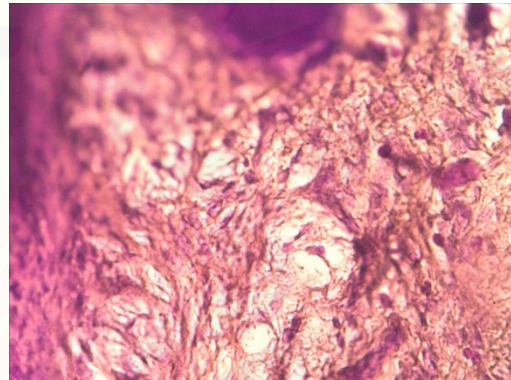
Perbesaran 40x



Perbesaran 100x



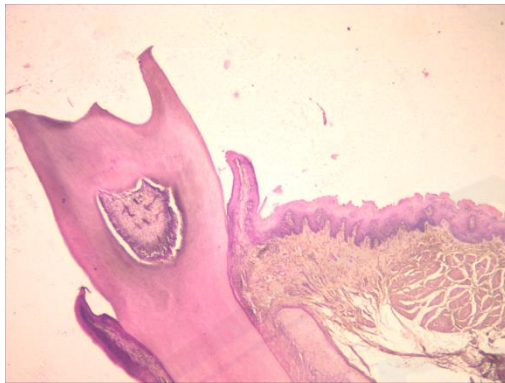
Perbesaran 400x



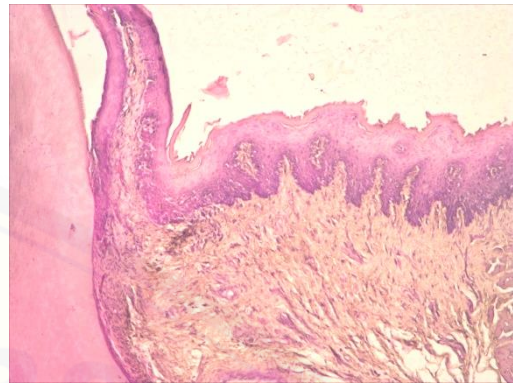
Perbesaran 400x



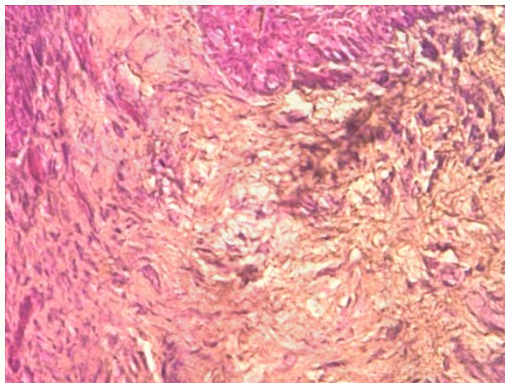
F.3 Kelompok P5-B



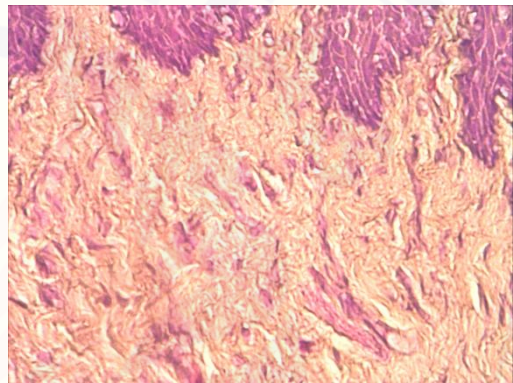
Perbesaran 40x



Perbesaran 100x



Perbesaran 400x



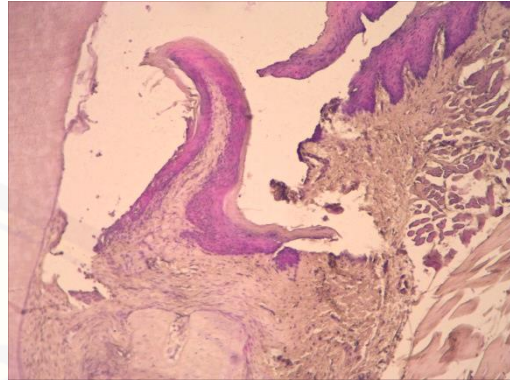
Perbesaran 400x



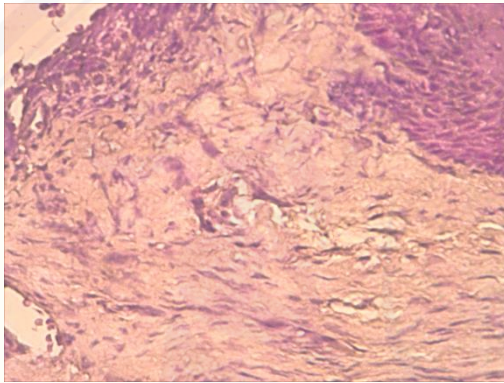
F.4 Kelompok P7-A



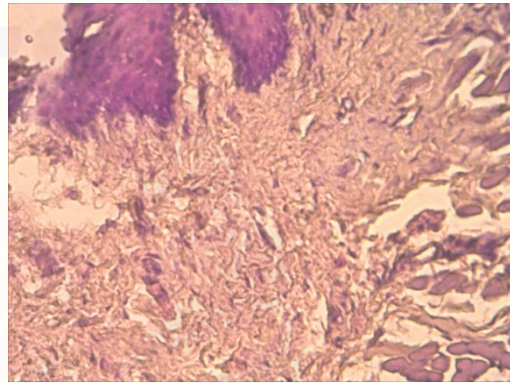
Perbesaran 40x



Perbesaran 100x

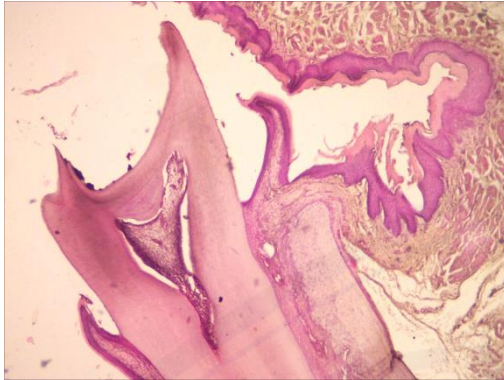


Perbesaran 400x

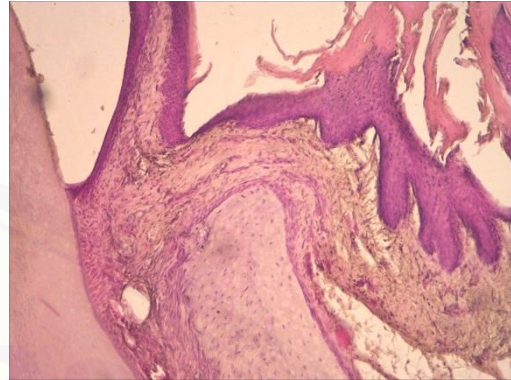


Perbesaran 400x

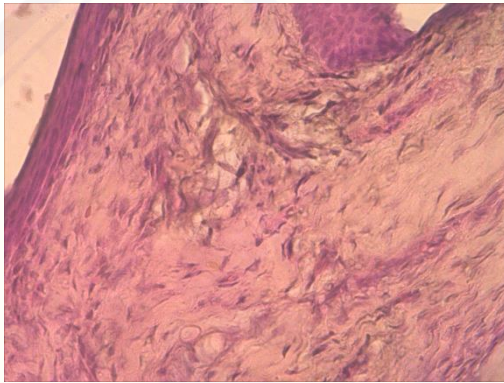
F.5 Kelompok P7-B



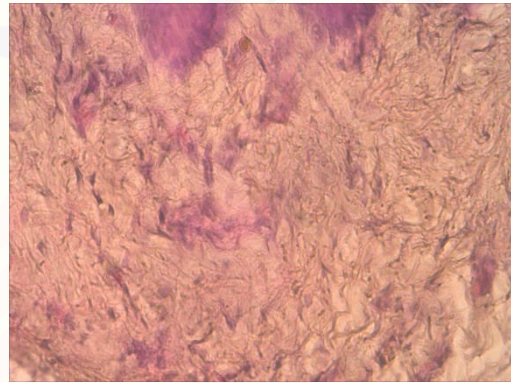
Perbesaran 40x



Perbesaran 100x



Perbesaran 400x



Perbesaran 400x



Lampiran G: Data hasil penghitungan jumlah sel makrofag dan limfosit**G.1 Jumlah sel makrofag**

Kelompok		Jumlah makrofag			Total jumlah makrofag	Rata-rata jumlah makrofag
		Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3		
N	N1	0	2	2	4	1,3
	N2	1	2	2	5	1,7
	N3	0	2	1	3	1,0
	N4	1	1	2	4	1,3
P5-A	P5-A1	3	2	4	9	3,0
	P5-A2	5	3	4	12	4,0
	P5-A3	4	4	6	14	4,7
	P5-A4	6	6	9	21	7,0
	P5-A5	2	4	6	12	4,0
P5-B	P5-B1	2	3	2	7	2,3
	P5-B2	3	6	4	13	4,3
	P5-B3	2	2	4	8	2,7
	P5-B4	2	4	3	9	3,0
	P5-B5	1	2	4	7	2,3
P7-A	P7-A1	2	5	7	14	4,7
	P7-A2	7	6	12	25	8,3
	P7-A3	4	5	8	17	5,7
	P7-A4	5	4	8	17	5,7
	P7-A5	3	2	7	12	4,0
P7-B	P7-B1	3	1	11	15	5,0
	P7-B2	2	6	6	14	4,7
	P7-B3	5	7	4	16	5,3
	P7-B4	2	4	3	9	3,0
	P7-B5	0	3	3	6	2,0

G.2 Jumlah sel limfosit

Kelompok		Limfosit			Total jumlah limfosit	Rata-rata jumlah limfosit
		Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3		
N	N1	1	4	0	5	1,7
	N2	2	5	1	8	2,7
	N3	2	5	1	8	2,7
	N4	4	3	0	7	2,3
P5-A	P5-A1	6	6	7	19	6,3
	P5-A2	7	6	6	19	6,3
	P5-A3	6	7	5	18	6,0
	P5-A4	18	24	24	66	22,0
	P5-A5	6	10	4	20	6,7
P5-B	P5-B1	3	6	3	12	4,0
	P5-B2	5	12	7	24	8,0
	P5-B3	4	6	7	17	5,7
	P5-B4	5	8	6	19	6,3
	P5-B5	4	5	8	17	5,7
P7-A	P7-A1	8	11	12	31	10,3
	P7-A2	13	16	15	44	14,7
	P7-A3	8	9	14	31	10,3
	P7-A4	6	9	20	35	11,7
	P7-A5	6	5	19	30	10,0
P7-B	P7-B1	5	5	11	21	7,0
	P7-B2	4	11	4	19	6,3
	P7-B3	9	8	12	29	9,7
	P7-B4	4	7	3	14	4,7
	P7-B5	3	8	3	14	4,7

Lampiran H: Hasil analisis data**H.1 Jumlah sel makrofag****Uji normalitas data jumlah sel makrofag**

Kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rerata	Kelompok	.285	4	.	.935	4	.625
Jumlah	normal						
Makrofag	Kelompok P5-A	.258	5	.200*	.885	5	.333
	Kelompok P5-B	.261	5	.200*	.823	5	.123
	Kelompok P7-A	.295	5	.178	.902	5	.422
	Kelompok P7-B	.288	5	.200*	.875	5	.289

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji homogenitas data jumlah sel makrofag**Levene's Test of Equality of Error Variances^{a,b}**

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Rerata	Based on Mean	1.405	4	19	.270
Jumlah	Based on Median	.713	4	19	.593
Makrofag	Based on Median and with adjusted df	.713	4	14.0 71	.597
	Based on trimmed mean	1.383	4	19	.277

Uji *one way* ANOVA**ANOVA****Rerata Jumlah Makrofag**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	48.983	4	12.246	7.545	.001
Within Groups	30.836	19	1.623		
Total	79.818	23			

Uji LSD**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Rerata Jumlah Makrofag

LSD

(I) Kelompok perlakuan	(J) Kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok normal	Kelompok P5-A	-3.2150*	.8546	.001	-5.004	-1.426
	Kelompok P5-B	-1.5950	.8546	.077	-3.384	.194
	Kelompok P7-A	-4.3550*	.8546	.000	-6.144	-2.566
	Kelompok P7-B	-2.6750*	.8546	.006	-4.464	-.886
Kelompok P5-A	Kelompok normal	3.2150*	.8546	.001	1.426	5.004
	Kelompok P5-B	1.6200	.8057	.059	-.066	3.306
	Kelompok P7-A	-1.1400	.8057	.173	-2.826	.546
	Kelompok P7-B	.5400	.8057	.511	-1.146	2.226
Kelompok P5-B	Kelompok normal	1.5950	.8546	.077	-.194	3.384
	Kelompok P5-A	-1.6200	.8057	.059	-3.306	.066
	Kelompok P7-A	-2.7600*	.8057	.003	-4.446	-1.074
	Kelompok P7-B	-1.0800	.8057	.196	-2.766	.606
Kelompok P7-A	Kelompok normal	4.3550*	.8546	.000	2.566	6.144
	Kelompok P5-A	1.1400	.8057	.173	-.546	2.826
	Kelompok P5-B	2.7600*	.8057	.003	1.074	4.446
	Kelompok P7-B	1.6800	.8057	.051	-.006	3.366
Kelompok P7-B	Kelompok normal	2.6750*	.8546	.006	.886	4.464
	Kelompok P5-A	-.5400	.8057	.511	-2.226	1.146
	Kelompok P5-B	1.0800	.8057	.196	-.606	2.766
	Kelompok P7-A	-1.6800	.8057	.051	-3.366	.006

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

H.2 Jumlah sel limfosit

Uji normalitas data jumlah sel limfosit

Tests of Normality

	Kelompok perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rerata	Kelompok normal	.271	4	.	.848	4	.220
jumlah sel	Kelompok P5-A	.453	5	.001	.585	5	.000
limfosit	Kelompok P5-B	.234	5	.200*	.952	5	.754
	Kelompok P7-A	.313	5	.124	.780	5	.055
	Kelompok P7-B	.206	5	.200*	.884	5	.330

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji homogenitas data jumlah sel limfosit

Test of Homogeneity of Variances

		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Rerata	Based on Mean	3.573	4	19	.025
jumlah sel	Based on Median	.506	4	19	.732
limfosit	Based on Median and with adjusted df	.506	4	5.072	.736
	Based on trimmed mean	2.580	4	19	.070

Uji Kruskal-Wallis

Test Statistics^{a,b}

	Rerata jumlah sel limfosit
Kruskal-Wallis H	16.374
df	4
Asymp. Sig.	.003

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok perlakuan

Uji Mann-Whitney**Kelompok normal dan kelompok P5-A****Test Statistics^a**

	Rerata jumlah sel limfosit
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.470
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok perlakuan

b. Not corrected for ties.

Kelompok normal dan kelompok P5-B**Test Statistics^a**

	Rerata jumlah sel limfosit
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.470
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok perlakuan

b. Not corrected for ties.

Kelompok normal dan kelompok P7-A**Test Statistics^a**

	Rerata jumlah sel limfosit
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.470
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok perlakuan

b. Not corrected for ties.

Kelompok normal dan kelompok P7-B**Test Statistics^a**

	Rerata jumlah sel limfosit
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.470
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok perlakuan

b. Not corrected for ties.

Kelompok P5-A dan kelompok P5-B**Test Statistics^a**

	Rerata jumlah sel limfosit
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	21.000
Z	-1.379
Asymp. Sig. (2-tailed)	.168
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok perlakuan

b. Not corrected for ties.

Kelompok P5-A dan kelompok P7-A**Test Statistics^a**

	Rerata jumlah sel limfosit
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	20.000
Z	-1.576
Asymp. Sig. (2-tailed)	.115
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.151 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok perlakuan

b. Not corrected for ties.

Kelompok P5-A dan kelompok P7-B**Test Statistics^a**

	Rerata jumlah sel limfosit
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.596
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok perlakuan

b. Not corrected for ties.

Kelompok P5-B dan kelompok P7-A**Test Statistics^a**

	Rerata jumlah sel limfosit
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.627
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok perlakuan

b. Not corrected for ties.

Kelompok P5-B dan kelompok P7-B**Test Statistics^a**

	Rerata jumlah sel limfosit
Mann-Whitney U	10.500
Wilcoxon W	25.500
Z	-.422
Asymp. Sig. (2-tailed)	.673
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok perlakuan

b. Not corrected for ties.

Kelompok P7-A dan kelompok P7-B**Test Statistics^a**

	Rerata jumlah sel limfosit
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.627
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok perlakuan

b. Not corrected for ties.

