



**EFEK PEMBERIAN GEL EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA  
(*Coffea canephora*) TERHADAP JUMLAH OSTEOLAS  
DAN OSTEOKLAS PADA TULANG ALVEOLAR  
MODEL TIKUS PERIODONTITIS**

**SKRIPSI**

Oleh

**Pintan Qorina Destianingrum  
NIM 161610101102**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**



**EFEK PEMBERIAN GEL EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA  
(*Coffea canephora*) TERHADAP JUMLAH OSTEOLAS  
DAN OSTEOKLAS PADA TULANG ALVEOLAR  
MODEL TIKUS PERIODONTITIS**

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Pintan Qorina Destianingrum  
NIM 161610101102**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**

## PERSEMBAHAN

Alhamdulillah Wasyukurillah, segala puji bagi Allah SWT karena dengan limpahan rahmat, hidayah dan kasih sayang-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini dengan lancar. Skripsi ini saya persembahkan untuk:

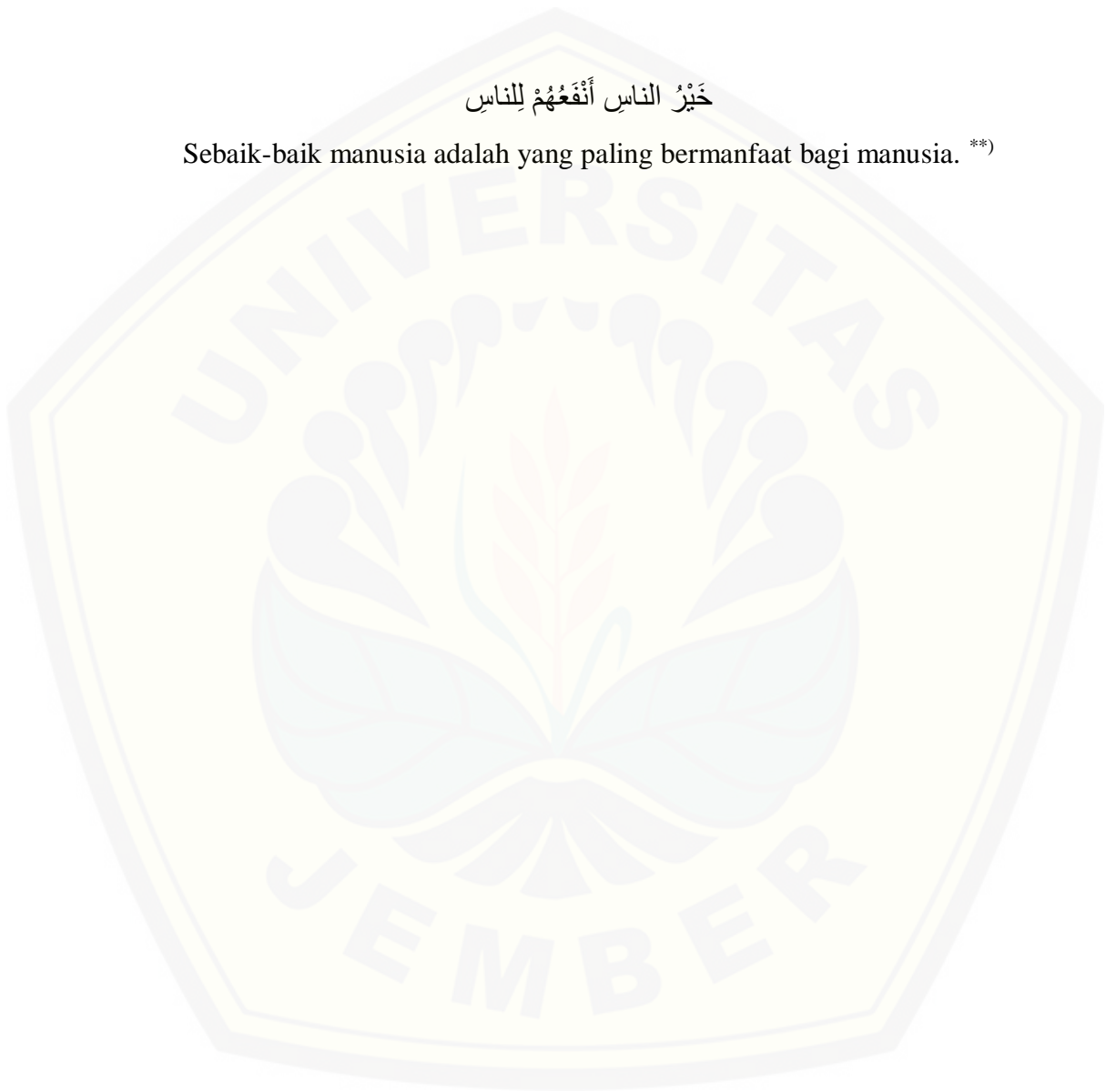
1. Keluarga kecil kami Ibuk Prihatin, Bapak Subandi, Mbak Winda tercinta yang telah memberikan dukungan, semangat, kasih sayang, perhatian, dan pengorbanan yang begitu besar serta doa yang tak pernah putus untuk anak dan saudaranya;
2. Guru-guru saya sejak dari taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi, guru-guru mengaji saya yang telah mendidik dan membimbing selama ini;
3. Almamater tercinta Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

**MOTTO**

Jika Kau Bukan Anak Raja, Juga Bukan Anak Ulama Besar, Maka Menulislah. \*)

خَيْرُ النَّاسِ أَنْفَعُهُمْ لِلنَّاسِ

Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi manusia. \*\*)



---

\*) Imam Al-Ghazali.

\*\*) HR. Ahmad, ath-Thabrani, ad-Daruqutni. Hadits ini dihasankan oleh al-Albani dalam Shahihul Jami' no: 3289.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Pintan Qorina Destianingrum

NIM : 161610101102

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul "Efek Pemberian Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Jumlah Osteoblas dan Osteoklas Pada Tulang Alveolar Model Tikus Periodontitis" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan kepada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 8 Juni 2020

Yang menyatakan,

Pintan Qorina D

NIM 161610101102

**SKRIPSI**

**EFEK PEMBERIAN GEL EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA  
(*Coffea canephora*) TERHADAP JUMLAH OSTEOKLAS DAN  
OSTEOBLAS PADA TULANG ALVEOLAR  
MODEL TIKUS PERIODONTITIS**

Oleh

Pintan Qorina Destianingrum  
NIM 161610101102

Dosen Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Nadie Fatimatuzzahro., M.DSc

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul "Efek Pemberian Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Jumlah Osteoblas dan Osteoklas Pada Tulang Alveolar Model Tikus Periodontitis" telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin, 8 Juni 2020

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

Prof. Dr. drg. Herniyati., M.Kes  
NIP. 195909061985032001

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

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drg. Tantin Ermawati., M.Kes  
NIP. 198003222008122003

drg. Nadie FatimatuZZahro., M.DSc  
NIP.198204242008012022

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

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

## RINGKASAN

**Efek Pemberian Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Jumlah Osteoblas dan Osteoklas Pada Tulang Alveolar Model Tikus Periodontitis;** Pintan Qorina Destianingrum, 161610101102; 2020: 71 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Periodontitis adalah suatu penyakit peradangan pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme tertentu, salah satunya *Porphyromonas gingivalis*. *P.gingivalis* dapat menginduksi makrofag dan fibroblas untuk menghasilkan sitokin pro inflamasi seperti *interleukin-1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ) , *interleukin-6* (IL-6) , *tumor necrosis factor-  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan *prostaglandin E-2* (PGE-2) yang dapat menyebabkan resorpsi tulang alveolar dengan menurunkan jumlah osteoblas dan meningkatkan osteoklas. Osteoklas merupakan sel motil bercabang, sangat besar dan berinti banyak. Pembentukan dan aktivasi osteoklas salah satunya diperankan oleh *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL) yang diekspresikan oleh osteoblas. Osteoblas adalah sel pembentuk tulang yang berasal dari *mesenchymal stem cells*. Sitokin pro inflamasi yang terbentuk pada proses inflamasi dapat menstimulasi osteoblas untuk meningkatkan produksi RANKL dan menurunkan produksi *osteoprotegerin* (OPG). Jika inflamasi terus berlanjut OPG akan sedikit mengikat RANKL sehingga RANKL mudah berikatan dengan *receptor activator of nuclear factor kappa-B* (RANK) pada prekursor osteoklas sehingga osteoklas menjadi aktif dan menyebabkan kerusakan tulang. Kerusakan tulang dan jaringan akan terus berlangsung selama inflamasi tetap terjadi, sehingga untuk mencegah kerusakan yang lebih parah dan mempercepat perbaikan tulang diperlukan suatu obat antiinflamasi.

Biji kopi robusta (*Coffea canephora*) telah diteliti mengandung senyawa aktif, yaitu polifenol, alkaloid dan saponin yang bersifat antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta



terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas pada tulang alveolar model tikus periodontitis.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post-test only control group design*. Penelitian ini menggunakan 28 ekor tikus yang dibagi menjadi 7 kelompok; kelompok kontrol (KN), kelompok kontrol negatif K(-)7 dan K(-)14, kelompok kontrol positif K(+)7 dan K(+)14, kelompok gel ekstrak kopi 50% (KP7 dan KP14). Sebanyak 4 ekor tikus wistar dalam setiap kelompok dilakukan dekaputasi pada hari ke-22 dan ke-29 setelah induksi bakteri dan pemberian topikal gel plasebo, gel aloclair dan gel ekstrak biji kopi robusta 50%, selanjutnya dilakukan pengambilan rahang bawah kiri tikus dan dilakukan *processing* jaringan kemudian diberi pewarnaan HE. Penghitungan jumlah osteoblas dan osteoklas dilakukan dalam 5 lapang pandang berbeda menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

Data hasil penelitian disajikan dalam rerata jumlah osteoblas dan osteoklas lalu diuji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan didapatkan data berdistribusi normal lalu uji homogenitas menggunakan *Levene* dan menunjukkan data yang homogen. Data lalu dilakukan uji parametrik *Two Way Anova* dengan hasil terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) sehingga dilanjutkan uji LSD. Hasil uji LSD osteoblas didapatkan bahwa jumlah osteoblas pada KP14 berbeda bermakna dengan K(-)7, K(-)14, K(+)7 dan K(+)14, tetapi tidak berbeda bermakna dengan KN hal ini menunjukkan bahwa jumlah osteoblas pada KP14 sudah mendekati normal. Jumlah osteoklas pada kelompok KP7 dan KP14 berbeda bermakna dengan K(-)7 dan K(-)14. Penurunan osteoklas pada KP7 menunjukkan bahwa proses inflamasi sudah mengalami penurunan. Penurunan inflamasi akan diiringi dengan peningkatan osteoblas yang berfungsi memperbaiki kerusakan tulang. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) dapat meningkatkan jumlah osteoblas dan menurunkan osteoklas pada tulang alveolar model tikus periodontitis.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul "Efek Pemberian Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Jumlah Osteoblas dan Osteoklas Pada Tulang Alveolar Model Tikus Periodontitis". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Allah SWT atas izin-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini;
2. drg. R Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros selaku dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. drg.Tantin Ermawati., M.Kes selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Nadie Fatimatuzzahro., M.DSc selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah membimbing dan memberikan arahan kepada penulis;
4. Prof. Dr. drg. Herniyati., M.Kes dan drg. Zahara Meilawaty., M.Kes selaku Dosen Penguji yang telah memberikan masukan, saran dan kritik yang membangun dalam penyusunan skripsi ini;
5. Seluruh dosen dan karyawan FKG Universitas Jember;
6. Bapak Subandi dan Ibuk Prihatin yang selalu memberikan doa, kasih sayang dan bimbingan;
7. Kakak saya Mbak Winda yang saya sayangi dan telah memberikan dukungan untuk tetap semangat dan sabar;
8. Sahabat-sahabat saya Amalia, Shofi, Ulul, Khusnul yang selalu memberikan doa, motivasi, kejutan dan tempat berbagi;
9. Keluarga "kita bersama" Astrid , Yumna, Julia atas keceriaan, doa dan motivasinya;
10. Teman-teman CRIALS yang telah berjuang bersama;
11. Favinas, Gafran, Rizkur, teman-teman lab histo dan lab hewan sebagai partner riset yang selalu mendukung dan menyemangati satu sama lain;

12. Mbak Nila, Mbak Ucik, Rorintha dan teman-teman Kos 18 yang seperti keluarga selama di Jember;
13. Teman-teman seperjuangan DEXTRA angkatan 2016 di KFG UNEJ;
14. B.Wahyu, B.Itus, P.Agus, P.Erwan, B.Ning, B.Azizah yang telah membantu dalam penelitian saya;
15. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Semoga penulisan skripsi ini dapat bermanfaat dalam pengembangan ilmu pendidikan dan kesehatan. Penulis menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini.

Jember, Juni 2020

Penulis

DAFTAR ISI

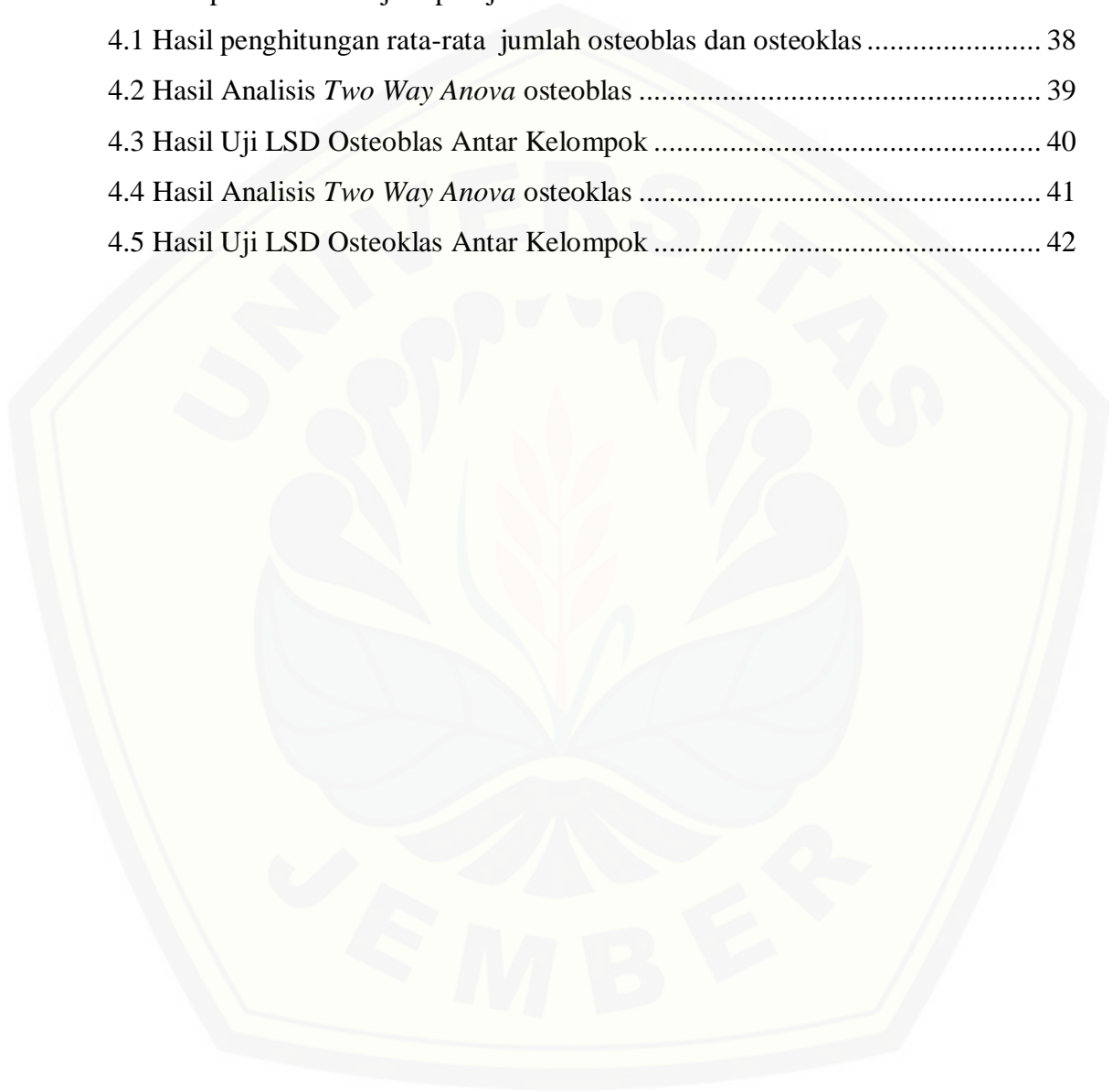
|  | Halaman |
|--|---------|
| <b>HALAMAN JUDUL</b> .....   | i       |
| <b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....   | ii      |
| <b>HALAMAN MOTTO</b> .....   | iii     |
| <b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....  | iv      |
| <b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....  | v       |
| <b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....  | vi      |
| <b>RINGKASAN</b> .....   | vii     |
| <b>PRAKATA</b> .....   | ix      |
| <b>DAFTAR ISI</b> .....  | xi      |
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....  | xiv     |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....   | xv      |
| <br>   |         |
| <b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....  | 1       |
| <b>1. 1 Latar Belakang</b> .....   | 1       |
| <b>1. 2 Rumusan Masalah</b> .....  | 3       |
| <b>1. 3 Tujuan Penelitian</b> .....                                      | 3       |
| <b>1. 4 Manfaat Penelitian</b> .....                                     | 3       |
| <b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....                                     | 4       |
| <b>2. 1 Periodontitis</b> .....  | 4       |
| 2.1.1 Pengertian Periodontitis .....                                     | 4       |
| 2.1.2 Etiologi Periodontitis .....                                       | 4       |
| <b>2. 2 <i>Porphyromonas gingivalis</i></b> .....                        | 4       |
| 2.2.1 Taksonomi .....  | 4       |
| 2.2.2 Karakteristik <i>P.gingivalis</i> .....                            | 5       |
| 2.2.3 Faktor Virulensi <i>P.gingivalis</i> .....                         | 5       |
| 2.2.4 Mekanisme Resorpsi Tulang Alveolar Oleh <i>P. gingivalis</i> ..... | 7       |
| <b>2. 3 Tulang Alveolar</b> .....  | 10      |
| 2.3.1 Pengertian Tulang Alveolar .....                                   | 10      |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3.2 Sel Pada Tulang Alveolar .....                            | 11        |
| 2.3.3 <i>Remodeling</i> Tulang Alveolar .....                   | 13        |
| <b>2. 4 Kopi Robusta (<i>Coffea Canephora</i>) .....</b>        | <b>14</b> |
| 2.4.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta .....                    | 15        |
| 2.4.2 Kandungan Biji Kopi Robusta.....                          | 16        |
| 2.4.3 Perananan Ekstrak Biji Kopi Robusta Terhadap Tulang ..... | 16        |
| <b>2. 5 Aloclair Gel .....</b>                                  | <b>17</b> |
| <b>2. 6 Kerangka Konsep .....</b>                               | <b>20</b> |
| <b>2. 7 Penjelasan Kerangka Konsep .....</b>                    | <b>21</b> |
| <b>2. 8 Hipotesis.....</b>                                      | <b>21</b> |
| <b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>                            | <b>22</b> |
| <b>3. 1 Jenis Penelitian .....</b>                              | <b>22</b> |
| <b>3. 2 Rancangan Penelitian .....</b>                          | <b>22</b> |
| <b>3. 3 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>                   | <b>22</b> |
| 3.3.1 Tempat Penelitian .....                                   | 22        |
| 3.3.2 Waktu Penelitian.....                                     | 22        |
| <b>3. 4 Variabel Penelitian .....</b>                           | <b>23</b> |
| <b>3. 5 Definisi Operasional .....</b>                          | <b>23</b> |
| 3.5.1 Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta .....                       | 23        |
| 3.5.2 Model Tikus Periodontitis .....                           | 23        |
| 3.5.3 Osteoblas .....   | 23        |
| 3.5.4 Osteoklas .....   | 24        |
| <b>3. 6 Sampel Penelitian .....</b>                             | <b>24</b> |
| 3.6.1 Besar Sampel Penelitian.....                              | 24        |
| 3.6.2 Kriteria Sampel Penelitian .....                          | 25        |
| <b>3. 7 Alat dan Bahan Penelitian.....</b>                      | <b>25</b> |
| 3.7.1 Alat Penelitian .....                                     | 25        |
| 3.7.2 Bahan Penelitian .....                                    | 26        |
| <b>3. 8 Prosedur Penelitian .....</b>                           | <b>26</b> |
| 3.8.1 <i>Etical Clearance</i> .....                             | 26        |
| 3.8.2 Persiapan Hewan Coba .....                                | 26        |

|                       |  |           |
|-----------------------|--|-----------|
| 3.8.3                 | Pembagian Kelompok Hewan Coba .....                  | 26        |
| 3.8.4                 | Pembuatan Suspensi <i>P.gingivalis</i> .....         | 27        |
| 3.8.5                 | Pembuatan Model Tikus Periodontitis .....            | 27        |
| 3.8.6                 | Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta .....        | 28        |
| 3.8.7                 | Aplikasi Topikal Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta ..... | 28        |
| 3.8.8                 | Dekaputasi Sampel .....                              | 29        |
| 3.8.9                 | Tahap Dekalsifikasi Jaringan .....                   | 29        |
| 3.8.10                | Pembuatan Sediaan Histologi.....                     | 30        |
| 3.8.11                | Tahap Penghitungan Sel Osteoblas dan Osteoklas ..... | 31        |
| <b>3.9</b>            | <b>Analisis Data</b> .....                           | <b>32</b> |
| <b>3.10</b>           | <b>Alur Penelitian</b> .....                         | <b>33</b> |
| <b>BAB 4.</b>         | <b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....                    | <b>34</b> |
| <b>4.1</b>            | <b>Hasil Penelitian</b> .....                        | <b>34</b> |
| 4.1.1                 | Analisis Data Jumlah Osteoblas .....                 | 39        |
| 4.1.2                 | Analisis Data Jumlah Osteoklas .....                 | 41        |
| <b>4.2</b>            | <b>Pembahasan</b> .....                              | <b>42</b> |
| <b>BAB 5.</b>         | <b>KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....                    | <b>47</b> |
| <b>5.1</b>            | <b>Kesimpulan</b> .....                              | <b>47</b> |
| <b>5.2</b>            | <b>Saran</b> .....                                   | <b>47</b> |
| <b>DAFTAR PUSTAKA</b> | .....  | <b>48</b> |
| <b>LAMPIRAN</b>       | .....  | <b>52</b> |

**DAFTAR TABEL**

|   | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 Komposisi kimia biji kopi hijau Arabika dan Robusta .....         | 17      |
| 4.1 Hasil penghitungan rata-rata jumlah osteoblas dan osteoklas ..... | 38      |
| 4.2 Hasil Analisis <i>Two Way Anova</i> osteoblas .....               | 39      |
| 4.3 Hasil Uji LSD Osteoblas Antar Kelompok .....                      | 40      |
| 4.4 Hasil Analisis <i>Two Way Anova</i> osteoklas .....               | 41      |
| 4.5 Hasil Uji LSD Osteoklas Antar Kelompok .....                      | 42      |



**DAFTAR GAMBAR**

|   | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 Morfologi <i>P.gingivalis</i> menggunakan mikroskop elektron.....                   | 6       |
| 2.2 Mekanisme kerja ikatan RANKL dengan RANK untuk menginduksi osteoklastogenesis ..... | 10      |
| 2.3 Histologi tulang.....   | 12      |
| 2.4 Mekanisme <i>remodeling</i> tulang .....  | 14      |
| 2.5 Biji Kopi Robusta ( <i>C. canephora</i> ).....                                      | 16      |
| 4.1 Gambaran histologi osteoblas pada kelompok KN.....                                  | 34      |
| 4.2 Gambaran histologi osteoblas dan osteoklas pada kelompok K(-).....                  | 35      |
| 4.3 Gambaran histologi osteoblas dan osteoklas pada kelompok K(+).....                  | 36      |
| 4.4 Gambaran histologi osteoblas pada kelompok KP .....                                 | 37      |
| 4.5 Grafik rata-rata jumlah osteoblas dan osteoklas tiap kelompok.....                  | 38      |



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal termasuk penyakit dengan prevalensi tinggi di dunia. Menurut *World Dental Federation* tahun 2018, penyakit periodontal sudah menyerang hampir 50% dari seluruh populasi di dunia. Persentase penduduk Indonesia yang mengalami penyakit gigi dan jaringan periodontal menurut Riskesdas tahun 2007 dan 2013 mengalami peningkatan dari 23,2 % menjadi 25,9 %. Penyakit periodontal yang sering terjadi adalah gingivitis dan periodontitis (Saputri, 2018).

Periodontitis adalah suatu penyakit radang kronis pada jaringan pendukung gigi yang disebabkan infeksi dari periodontopatogen, salah satunya yaitu bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Newman *et al.*, 2015), yang mengarah pada kerusakan tulang, kegoyangan gigi bahkan kehilangan gigi lebih awal (Laperin *et al.*, 2016). Penyebab utama dari kerusakan jaringan berasal dari aktivasi respon inflamasi terhadap infeksi bakteri. Respon inflamasi ini ditandai oleh produksi mediator inflamasi, termasuk sitokin dan ROS (Mysak *et al.*, 2014).

Sitokin dan ROS akan diproduksi oleh sel-sel imun seperti limfosit, makrofag, dan neutrofil sebagai bentuk respon terhadap infeksi *P.gingivalis*. Sitokin pro inflamasi seperti IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  dan PGE-2 dapat menyebabkan resorpsi tulang alveolar dengan menurunkan jumlah osteoblas (Mysak *et al.*, 2014) dan menyebabkan hilangnya perlekatan jaringan ikat (Elkadi *et al.*, 2018). ROS turut berperan dalam resorpsi tulang dengan menstimulasi pembentukan osteoklas dan peningkatan aktivitasnya (Bhusari *et al.*, 2014).

Osteoklas merupakan sel motil bercabang, sangat besar dan berinti banyak dimana pembentukan dan aktivasi osteoklas salah satunya diperankan oleh RANKL yang diekspresikan oleh osteoblas (Mescher, 2013). Osteoblas adalah sel pembentuk tulang yang berasal dari *mesenchymal stem cells*. Sitokin pro inflamasi yang terbentuk pada proses inflamasi dapat menstimulasi osteoblas untuk meningkatkan produksi RANKL dan menurunkan produksi OPG. OPG sebagai protein yang dihasilkan osteoblas akan berikatan dengan RANKL untuk

menghambat pembentukan dan aktivasi osteoklas. Jika inflamasi terus berlanjut OPG akan sedikit mengikat RANKL sehingga RANKL mudah berikatan dengan RANK pada prekursor osteoklas dan mengaktifasi osteoklas sehingga terjadi kerusakan tulang (Tang *et al.*, 2016). Kerusakan tulang dan jaringan akan terus berlangsung selama proses inflamasi tetap terjadi, sehingga untuk mencegah kerusakan yang lebih parah dan mempercepat perbaikan tulang diperlukan suatu obat antiinflamasi.

Salah satu obat antiinflamasi yang sering digunakan dalam bidang kedokteran gigi yaitu Aloclair gel. Komposisi dari Aloclair gel diantaranya ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*), asam hyaluronat, *glycyrrhetic acid*, dan *polivinylpyrrolidone* (Kar & Bela, 2018). Asam hyaluronat sebagai antiinflamasi bekerja dengan cara menghambat sintesis prostaglandin, metaloproteinase, dan molekul bioaktif lainnya (Dahiya & Kamal, 2013). Tetapi menurut Shahaudin tahun 2015 asam hyaluronat juga memiliki efek samping yaitu dapat menyebabkan iritasi lokal berupa kemerahan, bengkak dan gatal, untuk itu diperlukan alternatif dari bahan alami berupa gel ekstrak biji kopi robusta.

Kopi robusta (*C. canephora*) merupakan jenis kopi yang banyak dikembangkan di Indonesia. Pada tahun 2015, total luas areal dan produksi kopi robusta di Indonesia masing-masing mencapai 899.627 ha dan 466.492 ton (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2016). Biji kopi robusta memiliki kandungan senyawa aktif yang lebih banyak dibandingkan kopi arabika (Chu, 2012). Biji kopi robusta telah diteliti mengandung senyawa aktif yaitu polifenol yang memiliki efek antiinflamasi, alkaloid yang memiliki efek antioksidan serta saponin yang dapat merangsang proliferasi sel epitel (Farhati & Muchtaridi, 2016).

Tujuan dari perawatan periodontal adalah regenerasi jaringan periodontal yang hilang akibat periodontitis dan mengontrol infeksi untuk mencegah kerusakan yang lebih parah. Kunci keberhasilan regenerasi jaringan periodontal yaitu dengan menstimulasi sel progenitor untuk mengisi defek atau kerusakan. Proses regenerasi jaringan periodontal, meliputi migrasi, perlekatan, proliferasi, dan diferensiasi sel progenitor periodontal (Hardhani *et al.*, 2014). Proses

penyembuhan luka jaringan periodontal, dalam hal ini resorpsi tulang alveolar, akan melibatkan osteoblas dan osteoklas. Ekstrak biji kopi robusta yang mengandung antiinflamasi akan membantu dalam mengontrol infeksi serta meningkatkan proliferasi dan diferensiasi dari osteoblas untuk memperbaiki kerusakan tulang yang terjadi.

Penelitian yang dilakukan Ermawati (2015) tentang potensi gel ekstrak biji kopi robusta terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus periodontitis yang diinduksi *P.gingivalis* menunjukkan bahwa pemberian gel ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 50% lebih efektif untuk menurunkan derajat inflamasi. Hal ini ditandai dengan penurunan ekspresi TNF- $\alpha$  pada hari ke-14. Ekstrak biji kopi robusta dalam sediaan gel dapat mempermudah dalam pengaplikasian pada poket periodontal penderita, menurunkan efek samping, dan dapat menambah daya *bioavailability* (Adha *et al.*, 2017).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah ditulis, dapat dirumuskan permasalahan:

Bagaimana efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas pada tulang alveolar model tikus periodontitis ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas pada tulang alveolar model tikus periodontitis.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi terapi alternatif dari bahan alami berupa gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) yang nantinya dapat digunakan sebagai obat terapi antiinflamasi untuk periodontitis.

2. Memberikan informasi efek pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) terhadap jumlah osteoblas dan osteoklas pada tulang alveolar model tikus periodontitis.
3. Hasil penelitian ini dapat dijadikan acuan untuk penelitian lebih lanjut.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Periodontitis

#### 2.1.1 Pengertian Periodontitis

Periodontitis adalah penyakit peradangan kronis yang disebabkan oleh interaksi antara biofilm subgingiva dan respon imun *host*, yang mengarah pada kerusakan jaringan pendukung gigi. Periodontitis ditandai sebagai penyakit polimikroba yang melibatkan ketidakseimbangan jumlah mikroba flora asli di dalam biofilm subgingiva (Baek *et al.*, 2015). Kerusakan pada jaringan pendukung gigi ditandai dengan terbentuknya poket, resesi gingiva atau keduanya. Periodontitis biasanya diawali dengan gingivitis, tetapi tidak semua gingivitis berkembang menjadi periodontitis (Newman *et al.*, 2015).

#### 2.1.2 Etiologi Periodontitis

Penyebab utama peradangan gingiva adalah bakteri plak. Bakteri tersebut antara lain *P. gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, dan *Ikenella corrodens*. Faktor predisposisi lain termasuk kalkulus, restorasi yang salah, komplikasi terkait dengan terapi ortodontik, penggunaan tembakau dan lain-lain (Newman *et al.*, 2015).

### 2.2 *Porphyromonas gingivalis*

#### 2.2.1 Taksonomi

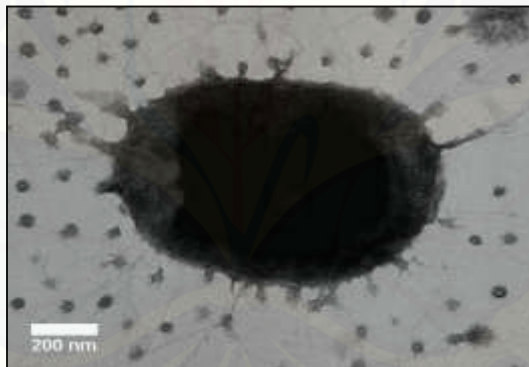
Menurut taksonominya, *P. gingivalis* diklasifikasikan sebagai berikut (Dewhirst, 2015) :

|         |                             |
|---------|-----------------------------|
| Kingdom | : <i>Bacteria</i>           |
| Filum   | : <i>Bacteroidetes</i>      |
| Kelas   | : <i>Bacteroidetes</i>      |
| Ordo    | : <i>Bacteroidetes</i>      |
| Family  | : <i>Porphyromonadaceae</i> |

Genus : *Porphyromonas*  
Spesies : *Porphyromonas gingivalis*

### 2.2.2 Karakteristik *P.gingivalis*

*P. gingivalis* merupakan bakteri anaerob gram negatif berpigmen hitam, dan berbentuk batang dengan panjang 0,5-2  $\mu\text{m}$  yang ditunjukkan pada Gambar 2.1 (Alibasyah *et al.*, 2018). *P. gingivalis* tumbuh dalam media kultur membentuk koloni berdiameter 1-2 mm, konveks, halus dan mengkilat, yang bagian tengahnya menunjukkan gambaran lebih gelap karena produksi protoheme, yaitu suatu substansi yang bertanggung jawab terhadap warna khas koloni ini (How *et al.*, 2016). *P. gingivalis* menghasilkan faktor virulensi dan protease ekstraseluler seperti lipopolisakarida, fimbria, *gingipain* dan lain-lain yang mengakibatkan kerusakan jaringan periodontal (Rafiei *et al.*, 2017).



Gambar 2.1 Morfologi *P.gingivalis* menggunakan mikroskop elektron (Duncan *et al.*, 2002)

### 2.2.3 Faktor Virulensi *P. gingivalis*

Bakteri gram negatif yang paling berperan terhadap terjadinya periodontitis antara lain, *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, dan *Tannerella forsythia*. Bakteri gram negatif pada kondisi normal berkolonisasi di dekat atau di atas margin gingiva dengan melekatkan diri pada reseptor di permukaannya. Bakteri plak kemudian

berkembang pada margin gingiva dan meluas ke subgingiva sehingga menyebabkan kerusakan epitel (Newman *et al.*, 2015).

*P. gingivalis* dapat merusak jaringan dengan berkontak langsung pada permukaan sel *host*. *P. gingivalis* akan mengeluarkan faktor virulensi dan protease ekstraseluler seperti lipopolisakarida, fimbria, *gingipain* dan lain-lain yang mengakibatkan kerusakan jaringan periodontal sehingga dapat menyebabkan perubahan kekebalan bawaan dan respon peradangan (Rafiei *et al.*, 2017). *P. gingivalis* menstimulasi sistem imun yang berusaha menjaga *host* dari infeksi dengan mengaktifkan sel imun seperti neutrofil, makrofag, dan limfosit untuk memerangi bakteri. PMN dan monosit distimulasi untuk memproduksi *matrixmetalloproteinase* (MMP), PGE-2 dan sitokin pro inflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$  (Newman *et al.*, 2015).

a. Lipopolisakarida

Lipopolisakarida (LPS) adalah molekul besar yang terdiri dari komponen lipid (lipid A) dan komponen polisakarida. LPS biasa ditemukan di membran luar bakteri gram negatif, mereka bertindak sebagai endotoksin. TLR-4 (*toll like receptor-4*) yang terletak pada permukaan sel *host*, CD14 (*cluster of differentiation 14*) dan MD-2 (*myeloid differentiation 2*) yang dikenal sebagai antigen limfosit 96 yang dapat mengenali LPS dari bakteri gram negatif sebagai bagian dari kompleks molekul permukaan sel. Interaksi kompleks CD14 / TLR-4 / MD-2 dengan LPS memicu serangkaian peristiwa intraseluler, yang hasilnya yaitu peningkatan produksi mediator inflamasi (terutama sitokin) seperti IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  dan diferensiasi sel imun untuk pengembangan respons imun efektif terhadap patogen (Newman *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan Kaseem *et al* (2015), menunjukkan bahwa LPS dari *P. gingivalis* yang disuntikkan secara subkutan diatas tulang tengkorak tikus dapat menginduksi resorpsi tulang dan pembentukan osteoklas yang berlebihan. Pembentukan osteoklas yang berlebihan mungkin disebabkan oleh efek langsung dari *P. gingivalis* pada progenitor osteoklas atau efek tidak langsung karena peningkatan RANKL.

#### b. Fimbria

Fimbria adalah komponen seperti serat yang memediasi perlekatan bakteri pada berbagai sel *host*, bakteri lain, dan makromolekul dari *host*. Gen FimA, yang mengkodekan FimA (subunit dari fimbria utama), telah diklasifikasikan menjadi 6 jenis (I-V dan Ib) berdasarkan urutan nukleotida (Baek *et al.*, 2015). Fimbria dari *P.gingivalis* dapat menstimulasi respon imun, seperti sekresi IL-6 dan komponen FimA akan menstimulasi *nuclear factor* (NF) -  $\kappa$ B dan IL-8 pada sel epitel gingiva melalui TLR-2. Selain itu, FimA juga menstimulasi monosit untuk mensekresi IL-6, IL-8, dan TNF- $\alpha$  (Newman *et al.*, 2015).

#### c. Gingipain

*Gingipain* termasuk proteinase spesifik ekstraseluler dari *P. gingivalis*. *Gingipain* merupakan faktor virulensi yang terdiri dari *Arg-gingipain* (Rgp) dan *Lys-gingipain* (Kgp), yang dapat menurunkan sejumlah protein *host*, termasuk sitokin / kemokin, imunoglobulin, protein komplemen, dan reseptor sel *host* (Baek *et al.*, 2015). Faktor virulensi ini sangat penting untuk kolonisasi, penetrasi ke jaringan *host*, disregulasi respon imun dan penyakit. *Gingipain*, khususnya proteinase spesifik Kgp sangat penting bagi bakteri untuk menginduksi resorpsi tulang alveolar (Neil *et al.*, 2016).

#### d. Kapsul

*P. gingivalis* dikenal dapat mensintesis kapsul yang terbukti menjadi salah satu faktor virulensi organisme ini. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa *P.gingivalis* yang dienkapsulasi lebih ganas dari pada yang tidak dienkapsulasi. Kapsul ini terkait dengan pelepasan *P.gingivalis* dan penurunan pertahanan imun inang, meningkatkan ketahanan dalam sel inang dan menginduksi ekspresi sitokin tergantung serotipe dalam sel inang (Nakayama & Ohara, 2017).

#### 2.2.4 Mekanisme Resorpsi Tulang Alveolar oleh *P.gingivalis*

Kerusakan jaringan periodontal terjadi secara episodik, intermiten dengan periode tidak aktif yang bergantian dengan periode destruktif yang mengakibatkan hilangnya kolagen dan tulang alveolar serta pendalaman poket periodontal. Ketinggian dan kepadatan tulang alveolar diatur oleh keseimbangan pengaruh



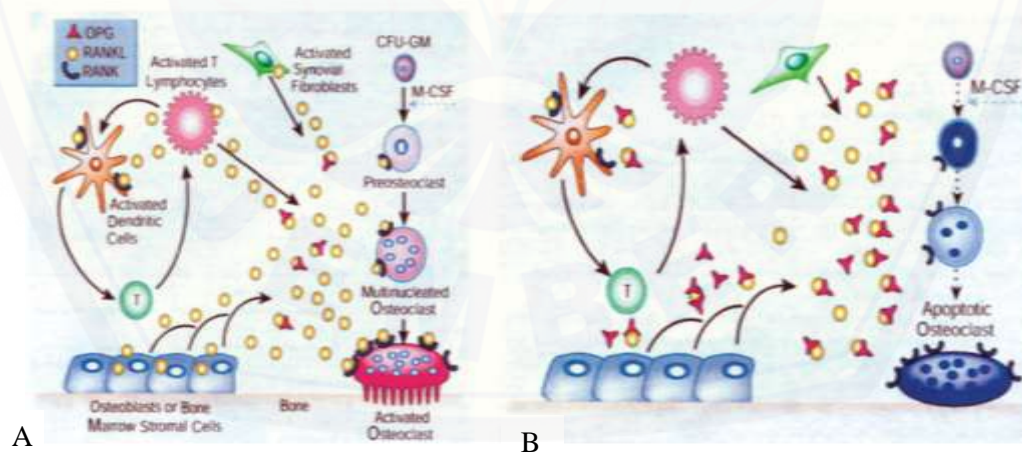
lokal dan sistemik, antara pembentukan dan resorpsi tulang. Ketika resorpsi melebihi dari pembentukan tulang, maka ketinggian dan kepadatan tulang akan berkurang (Newman *et al.*, 2015).

Faktor yang terlibat dalam kerusakan tulang pada penyakit periodontal yaitu bakteri dan *host*. Produk dari bakteri akan menginduksi diferensiasi sel progenitor tulang menjadi osteoklas dan merangsang sel gingiva untuk melepaskan mediator yang memiliki efek sama. Produk bakteri dan mediator inflamasi juga dapat berperan secara langsung pada osteoblas atau progenitornya sehingga menghambat aksi dan menurunkan jumlahnya (Cekici *et al.*, 2014). Beberapa faktor *host* yang dilepaskan oleh sel inflamasi dapat menyebabkan resorpsi tulang alveolar, termasuk prostaglandin yang dihasilkan *host* serta prekursornya, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 dan TNF- $\alpha$  (Newman *et al.*, 2015).

Sitokin berperan penting pada proses peradangan dan sebagai mediator inflamasi dalam penyakit periodontal. Sitokin dihasilkan oleh sebagian besar jenis sel, termasuk sel inflamasi (neutrofil, makrofag, limfosit) dan sel pada jaringan periodonsium (fibroblas dan sel epitel). Diantara sitokin yang banyak diteliti dalam patogenesis penyakit periodontal adalah sitokin pro inflamasi IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  (Newman *et al.*, 2015). TNF- $\alpha$  memainkan peran utama dalam reaksi inflamasi, resorpsi tulang alveolar, dan hilangnya perlekatan jaringan ikat. (Elkadi *et al.*, 2018). TNF- $\alpha$  dapat menyebabkan peningkatan konsentrasi PGE2 dan aktivasi osteoklas melalui ekspresi RANKL. Akibatnya, bersamaan dengan IL-1, dapat menyebabkan resorpsi tulang, menghasilkan pelepasan MMP dan penghancuran matriks ekstraseluler (Shrestha *et al.*, 2017). PGE2 secara langsung juga dapat menginduksi apoptosis dan kematian osteoblas. IL-1 diproduksi oleh makrofag dan sel stroma sumsum. IL-1 memiliki dua bentuk aktif, IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Keduanya merupakan faktor utama aktivasi osteoklas (Alwan, 2015). PGE-2 akan menginduksi osteoblas memproduksi RANKL dan menurunkan produksi OPG. Selain itu, PGE-2 dapat meningkatkan ikatan antara RANKL dan RANK pada prekursor osteoklas (Chen *et al.*, 2018).

Selama terjadi respon inflamasi, sitokin pro inflamasi merangsang ekspresi RANKL pada permukaan osteoblas. Selain osteoblas, RANKL juga diekspresikan

oleh sel lain termasuk fibroblas (Cekici *et al.*, 2014). Resorpsi dan pembentukan tulang diatur oleh konsentrasi RANKL serta reseptornya yaitu RANK pada sel-sel prekursor osteoklas dan OPG (Gambar 2.2). Ketika ekspresi RANKL lebih tinggi dari OPG, RANKL akan mudah untuk mengikat RANK pada prekursor osteoklas sehingga terjadi aktivasi pembentukan osteoklas dan resorpsi tulang (Gambar 2.2 A). Ikatan RANKL pada prekursor osteoklas terjadi pada tahap ketika *hematopoietic stem cells* telah berdiferensiasi dari CFU-GM (*colony forming unit for granulocytes and macrophages*) menjadi CFU-M (*colony forming unit for macrophages*). Pengikatan RANKL dan RANK pada CFU-M diperantarai oleh *macrophage colony stimulating factor* yang akan menginduksi diferensiasi preosteoklas menjadi osteoklas dewasa. Osteoklas dewasa adalah sel terpolarisasi yang mengalami perubahan struktural untuk membentuk ikatan antara permukaan tulang dan membran basal, selain itu juga mengeluarkan enzim litik untuk kerusakan tulang. Ketika konsentrasi OPG lebih tinggi dari RANKL, OPG akan mengikat RANKL dan menghambatnya untuk berikatan dengan RANK (Gambar 2.2 B). Hal ini menyebabkan berkurangnya pembentukan osteoklas (Cochran, 2008).



Gambar 2.2 Mekanisme kerja ikatan RANKL dengan RANK untuk menginduksi osteoklastogenesis (A). Peningkatan OPG (B) sebagai faktor penghambat osteoklastogenesis dan terjadinya apoptosis osteoklas. M-CSF: *macrophage colony-stimulating factor*, CFU-GM : *colony forming unit for granulocytes and macrophages* (Cochran, 2008)

## 2.3 Tulang Alveolar

### 2.3.1 Pengertian Tulang Alveolar

Tulang alveolar merupakan salah satu komponen jaringan periodontal yang menjadi bagian dari maksila dan mandibula. Tulang alveolar terbentuk saat gigi mulai erupsi untuk menyediakan perlekatan bagi ligamen periodontal yang akan terbentuk. Pada keadaan normal puncak tulang alveolar berada di apikal *cemento enamel junction* (CEJ) dengan ujung berbentuk bulat atau sedikit rata (Madukwe, 2014). Tulang alveolar adalah jaringan ikat yang termineralisasi dan terdiri dari 23% jaringan mineral, 37% matriks organik yang sebagian besar adalah kolagen, dan 40% air ( Jiang *et al.*, 2016).

Tulang terdiri dari empat jenis sel yaitu sel osteoblas, sel-sel pelapis tulang, sel osteosit dan sel osteoklas. Tulang memberikan fungsi penting dalam tubuh, seperti penggerak, dukungan dan perlindungan jaringan lunak, penyimpanan kalsium dan fosfat serta penyimpanan sumsum tulang. Jaringan tulang akan mengalami *remodeling* melalui aktivitas dari sel-sel tulang yang meliputi resorpsi tulang oleh osteoklas dan pembentukan tulang oleh osteoblas. Osteosit sebagai mekanosensor dan prekursor dari proses *remodeling* tulang (Silva *et al.*, 2015).

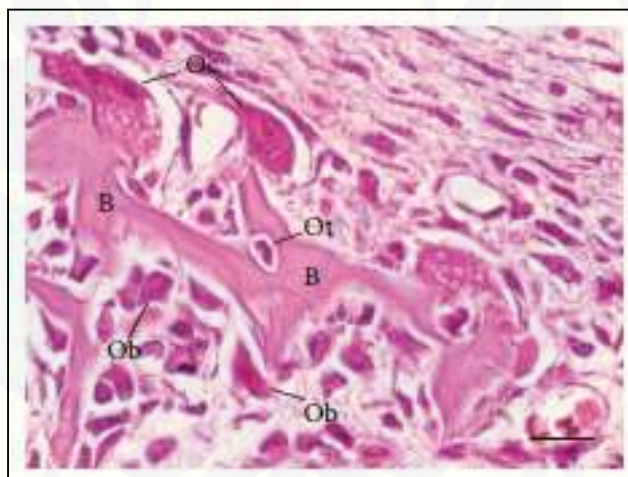
### 2.3.2 Sel Pada Tulang Alveolar

#### a. Osteoblas

Osteoblas adalah sel berbentuk kuboid hingga kolumnar dengan sitoplasma basofilik yang terletak di sepanjang permukaan matriks tulang (Gambar 2.3). Sel ini menyusun 4-6% dari total keseluruhan sel tulang dan berperan dalam proses pembentukan tulang. Sel ini memiliki karakteristik morfologi sel yang mensintesis protein dengan adanya retikulum endoplasma kasar yang banyak dan aparatus golgi yang besar, serta berbagai vesikel sekretori (Silva *et al.*, 2015). Sebagai sel terpolarisasi, komponen matriks disekresikan pada permukaan sel yang bersentuhan dengan matriks tulang yang ada dan menghasilkan lapisan matriks baru (tetapi belum dikalsifikasi) yang disebut osteoid antara lapisan osteoblas dan permukaan tulang yang sudah ada sebelumnya (Mescher, 2013).

Osteoblas berasal dari *mesenchymal stem cells* (MSCs) yang dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, adiposit, kondrosit, atau miosit tergantung pada aktivasi atau penghambatan jalur pensinyalan tertentu. Beberapa molekul pensinyalan yang mengatur diferensiasi osteoblastik meliputi *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ , WNT, Hedgehog, hormon paratiroid, *insulin-like growth factor-1*, *fibroblast growth factors*, and *Notch* (Kapinas & Delany, 2011).

Sel osteoblas berperan mensintesis komponen organik matriks tulang termasuk kolagen tipe I, proteoglikan dan glikoprotein seperti osteonektin. Bila aktivitas sintesis osteoblas menurun, sel tersebut menjadi gepeng dan sifat basofilik pada sitoplasmanya akan berkurang (Mescher, 2013).



Gambar 2.3 Histologi tulang. Pewarnaan HE. Perbesaran 400 x. Oc: osteoklas. Ot: osteosit. B: tulang yang mature. Ob: osteoblas (Silva *et al.*, 2015)

#### b. Osteosit

Osteoblas secara bertahap dikelilingi oleh produk sekresinya sendiri dan menjadi osteosit yang terselubung dalam ruang yang disebut lakuna. Pada saat transisi dari osteoblas menjadi osteosit, sel menjulurkan banyak tonjolan sitoplasma yang panjang dan diselubungi oleh matriks terkalsifikasi. Osteosit dan tonjolannya menempati setiap lakuna dan kanalikuli yang menyebar pada tulang. Dibandingkan dengan osteoblas, osteosit lebih pipih dan berbentuk seperti kenari

tersebut memiliki sedikit RE kasar dan apparatus golgi serta kromatin inti yang lebih padat seperti pada Gambar 2.3 (Mescher, 2013).

#### c. Osteoklas

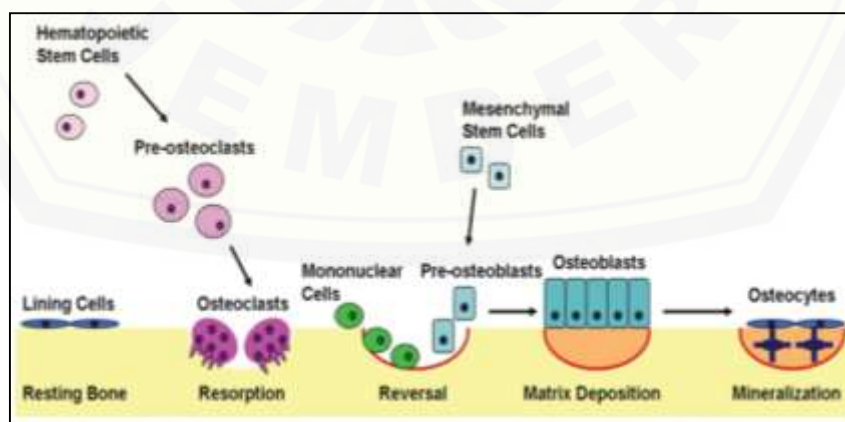
Osteoklas adalah sel motil yang sangat besar dengan nukleus multipel (Gambar 2.3) dan berperan dalam resorpsi matriks selama pertumbuhan dan *remodeling* tulang. Osteoklas berasal dari garis keturunan yang sama dengan monosit/ makrofag. Diferensiasi menjadi osteoklas bergantung pada beberapa molekul pensinyalan ekstraseluler, termasuk *macrophage colony-stimulating factor* (MCSF), RANKL, TNF, *interferon gamma*, dan interleukin (Kapinas & Delany, 2011). Ukuran besar dan kondisi multinukleasi dari osteoklas disebabkan karena sel ini berasal dari fusi sel-sel yang diturunkan dari sumsum tulang. Di area terjadinya resorpsi tulang, osteoklas terdapat di dalam lekukan atau kriptus yang terbentuk akibat kerja enzim pada matriks yang dikenal sebagai *resorption bays*. Osteoklas yang aktif biasanya terletak pada permukaan tepi matriks tulang membentuk batas tepi yang dikelilingi oleh zona sitoplasma yang kaya akan filamen aktin, yang merupakan tempat adhesi pada matriks. Zona adhesi melingkar ini menciptakan lingkungan mikro antara osteoklas dan matriks tempat resorpsi tulang terjadi (Mescher, 2013).

#### 2.3.3 *Remodeling* Tulang Alveolar

*Remodeling* tulang merupakan proses yang terjadi seumur hidup, dimana tulang yang lama akan di resorpsi dan tulang baru akan dibentuk melalui proses yang disebut osifikasi. *Remodeling* meliputi resorpsi tulang yang terus menerus dan diganti dengan sintesis dan mineralisasi matriks untuk membentuk tulang baru. Siklus *remodeling* tulang atau pergantian tulang secara normal membutuhkan proses resorpsi tulang dan pembentukan tulang dalam suatu pola yang terkoordinasi. *Remodelling* tulang dimulai saat osteoklas meresorpsi mineral dan matriks tulang. Sel-sel mononuklear menyiapkan permukaan yang sudah diresorpsi untuk diferensiasi osteoblas yang akan menghasilkan matriks baru. Mineralisasi matriks dan diferensiasi beberapa osteoblas menjadi osteosit melengkapi siklus *remodelling* (Gambar 2.4). Keseimbangan antara resorpsi dan

deposisi tulang ditentukan oleh aktivitas dua jenis sel, yakni osteoblas dan osteoklas.

Osteoklas berperan meresorpsi tulang, sedangkan osteoblas mensintesis tulang baru. Pelepasan sitokin di area *remodeling* akan menarik osteoklas ke permukaan tulang. Osteoklas membentuk ikatan yang memungkinkan untuk melekat pada permukaan tulang. Sebuah ruang antara osteoklas dan jaringan tulang dibawahnya menjadi lingkungan mikro yang terisolasi dimana pompa proton osteoklas melepaskan ion yang menghasilkan lingkungan asam dan melarutkan komponen mineral dari matriks tulang. Matriks organik menjadi terpapar dan terdegradasi oleh *cathepsin K*. Fase kebalikan *remodeling* tulang dimulai dengan sel mononuklear yang mempersiapkan permukaan tulang untuk osteoblas baru dan memberi sinyal untuk merekrut osteoblas. Osteoblas baru akan berkembang dan mengeluarkan matriks ekstraselular yang banyak dalam bentuk kolagen tipe I. Osteoblas akan terus berdiferensiasi sehingga matriksnya akan matang dan termineralisasi. Setelah tulang baru terbentuk, osteoblas dewasa akan mengalami apoptosis, berdiferensiasi menjadi sel-sel pelapis permukaan tulang atau osteosit yang tertanam dalam matriks terkalifikasi. Kesalahan pengaturan diferensiasi osteoklastik atau osteoblastik dapat mengakibatkan disegulasi keseimbangan tulang dan konsekuensi patologis, termasuk osteoporosis (Kapinas & Delany, 2011).



Gambar 2.4 Mekanisme *remodeling* tulang (Kapinas & Delany, 2011)

## 2.4 Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kopi Robusta (*Coffea canephora*) merupakan jenis kopi yang banyak dikembangkan di Indonesia. Pada tahun 2015, total luas areal dan produksi kopi robusta di Indonesia masing-masing mencapai 899.627 ha dan 466.492 ton (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2016). Kabupaten Jember yang berada di Jawa Timur merupakan salah satu daerah dengan potensi perkebunan yang cukup baik, salah satunya kopi. Kabupaten Jember juga memiliki pusat penelitian kopi dan kakao (PUSLITKOKA) yang merupakan sebuah lembaga penelitian tentang kopi dan satu-satunya pusat penelitian kopi di Indonesia. Selain itu, topografi kabupaten Jember sendiri memungkinkan perkebunan kopi dapat berkembang (Yulianto & Kriatianto, 2014).

### 2.4.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Robusta

Klasifikasi tanaman kopi Robusta adalah sebagai berikut (Subandi, 2011) :

|              |                           |
|--------------|---------------------------|
| Kingdom      | : <i>Plantae</i>          |
| Sub kingdom  | : <i>Tracheobionta</i>    |
| Super divisi | : <i>Spermatophyta</i>    |
| Divisi       | : <i>Magnoliophyta</i>    |
| Kelas        | : <i>Magnoliopsida</i>    |
| Sub kelas    | : <i>Asteridae</i>        |
| Ordo         | : <i>Rubiales</i>         |
| Family       | : <i>Rubiaceae</i>        |
| Genus        | : <i>Coffea</i>           |
| Spesies      | : <i>Coffea canephora</i> |
| Varietas     | : <i>Robusta</i>          |

Karakter morfologi yang khas pada kopi robusta adalah tajuk yang lebar, perwatakan besar, ukuran daun yang lebih besar dibandingkan daun kopi arabika, dan memiliki bentuk pangkal tumpul. Selain itu, daunnya tumbuh berhadapan dengan batang, cabang dan ranting-rantingnya (Panggabean, 2011). Biji kopi robusta juga memiliki karakteristik yang membedakan dari biji kopi lain. Biji kopi

robusta memiliki karakteristik yaitu bijinya yang agak bulat, lengkungan bijinya lebih tebal dibandingkan kopi arabika, dan garis tengah dari atas ke bawah hampir rata seperti pada Gambar 2.5 (Subandi, 2011).



Gambar 2.5 Biji Kopi Robusta (*C. canephora*) (Subandi, 2011).

#### 2.4.2 Kandungan Biji Kopi Robusta

Secara umum biji kopi memiliki kandungan senyawa kimia volatil dan nonvolatil. Senyawa volatil biji kopi terdiri dari aldehida, furfural, keton, alkohol, ester, asam format, asam asetat dan berbagai senyawa sulfur dan nitrogen (Hastuti, 2018). Senyawa nonvolatil (tidak mudah menguap) biji kopi terutama terdiri dari air, karbohidrat, serat, protein dan asam amino bebas, lipid, mineral, asam organik, asam klorogenat, trigonelin, dan kafein. Senyawa nonvolatil dari fraksi lipid, asam klorogenat, kafein, trigonelin, serat larut, dan diterpen merupakan yang paling bersifat bioaktif (Chu, 2012).



Tabel 2.1 Komposisi kimia biji kopi hijau Arabika dan Robusta (*C. canephora*)

| Component  | Concentration <sup>a</sup> (g/100 g) |                         |
|--|--------------------------------------|-------------------------|
|  | <i>Coffea arabica</i>                | <i>Coffea canephora</i> |
| <i>Carbohydrates/fiber</i>   |                                      |                         |
| Sucrose  | 6.0–9.0                              | 0.9–4.0                 |
| Reducing sugars  | 0.1                                  | 0.4                     |
| Polysaccharides  | 34–44                                | 48–55                   |
| Lignin   | 3.0                                  | 3.0                     |
| Pectin   | 2.0                                  | 2.0                     |
| <i>Nitrogenous compounds</i>   |                                      |                         |
| Protein/peptides   | 10.0–11.0                            | 11.0–15.0               |
| Free amino acids   | 0.5                                  | 0.8–1.0                 |
| Caffeine   | 0.9–1.3                              | 1.5–2.5                 |
| Trigonelline   | 0.6–2.0                              | 0.6–0.7                 |
| <i>Lipids</i>  |                                      |                         |
| Coffee oil (triglycerides with unsaponifiables, sterols/tocopherols) | 15–17.0                              | 7.0–10.0                |
| Diterpenes (free and esterified)                                     | 0.5–1.2                              | 0.2–0.8                 |
| <i>Minerals</i>  |                                      |                         |
| <i>Acids and esters</i>  |                                      |                         |
| Chlorogenic acids  | 4.1–7.9                              | 6.1–11.3                |
| Aliphatic acids  | 1.0                                  | 1.0                     |
| Quinic acid  | 0.4                                  | 0.4                     |

Sumber : Chu, (2012)

#### 2.4.3 Peranan Ekstrak Biji Kopi Robusta Terhadap Tulang Alveolar

Biji kopi Robusta (*C. canephora*) mengandung senyawa aktif, yaitu polifenol, alkaloid dan saponin. Senyawa polifenol (asam klorogenat) dalam biji kopi Robusta memiliki efek sebagai antiinflamasi, antitoksidan dan antibakteri. Senyawa alkaloid (kafein) memiliki efek sebagai antioksidan, dan senyawa saponin dapat merangsang proliferasi sel epitel (Farhati & Muchtaridi, 2016).

Aktifitas antiinflamasi asam klorogenat yaitu mengurangi efek histamin, bradikinin, dan leukotrin yang pada akhirnya dapat menurunkan permeabilitas kapiler selama fase inflamasi sehingga mencegah keluarnya makromolekul dari mikrosirkulasi dan mengurangi pembengkakan. Selain itu, asam klorogenat juga dapat menurunkan LPS yang menginduksi peningkatan *cyclooxygenase* (COX-2) (Farah & Lima, 2019). Sebagian besar data sampai saat ini menunjukkan bahwa asam klorogenat sebagai antiinflamasi bekerja dengan cara menghambat regulasi sitokin pro inflamasi TNF- $\alpha$ , IL-8 dan PGE2. TNF-  $\alpha$  dapat menyebabkan peningkatan konsentrasi PGE2 dan aktivasi osteoklas melalui ekspresi RANKL (Shrestha *et al.*, 2017).

*Reactive oxygen species* (ROS) merupakan molekul yang dihasilkan oleh sel-sel yang terlibat dalam sistem pertahanan tubuh seperti PMN. ROS dapat berperan sebagai molekul pensinyalan dan mediator inflamasi. Peningkatan ROS yang berlebihan pada daerah peradangan dapat menyebabkan kerusakan sel endotel dan cedera jaringan (Mittal *et al.*, 2014). Untuk itu, kandungan antioksidan dalam biji kopi seperti kafein, asam klorogenat dan melanoid dapat digunakan untuk mengikat radikal bebas yang dihasilkan selama proses inflamasi (Farhati & Muchtaridi, 2016).

## 2.5 Aloclair Gel

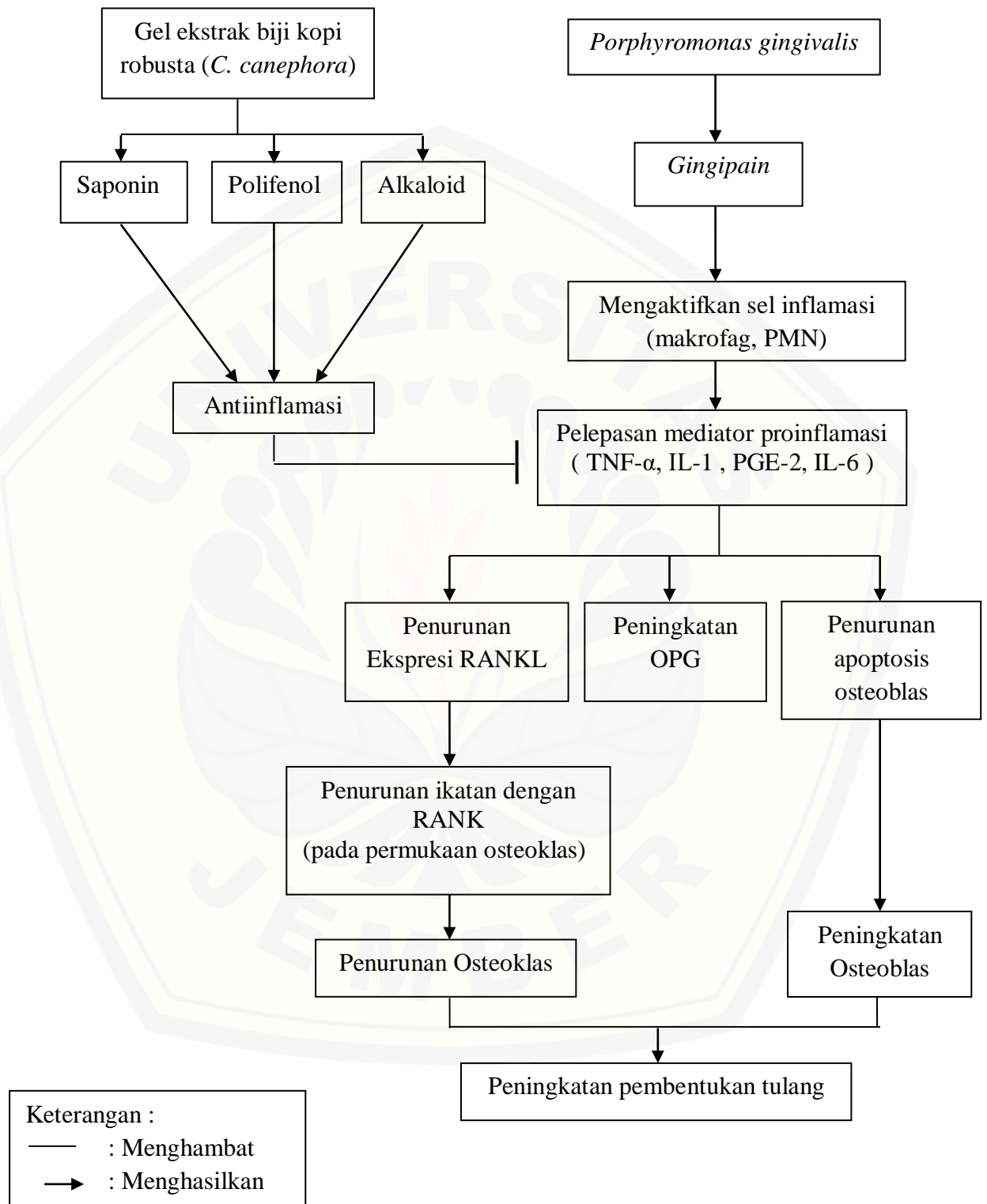
Aloclair gel merupakan salah satu obat yang banyak digunakan di bidang kedokteran gigi untuk mempercepat penyembuhan lesi oral dan luka pada gingiva. Aloclair gel mengandung ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*) dan asam hyaluronat (AH) yang dapat mendukung proses penyembuhan jaringan luka (MIMS, 2015). Kandungan kimia dalam lidah buaya diantaranya asam amino, *acemannan*, enzim, lignin, mineral, mono dan polisakarida, asam salisilat, saponin, polifenol, sterol dan vitamin (Yuza *et al.*, 2014). Lidah buaya memiliki efek antiinflamasi dengan menghambat jalur siklooksigenase dan mengurangi produksi PGE<sub>2</sub>. Lupeol merupakan antiinflamasi yang paling aktif dari jenis sterol pada lidah buaya serta dapat mengurangi peradangan (Kar & Bera, 2018).

Asam hyaluronat memiliki efek antiinflamasi, antiedematous dan anti bakteri (Omer *et al.*, 2018). Sebagai antiinflamasi asam hyaluronat bekerja menghambat sintesis prostaglandin, metaloproteinase, dan molekul bioaktif lainnya (Dahiya & Kamal, 2013). AH digunakan sebagai antibakteri setelah tindakan *scaling* dan *root planing* pada penderita gingivitis dan periodontitis. Pada penyakit periodontal AH bekerja dengan memperlemah ikatan sel-sel jaringan yang mengalami inflamasi kronis sehingga mudah terlepas dan digantikan oleh regenerasi sel baru (Omer *et al.*, 2018). Tetapi, asam hyaluronat memiliki efek samping yaitu dapat menyebabkan iritasi lokal berupa kemerahan, bengkak, gatal dan nyeri tekan (Shaharudin, 2015).

Sediaan gel untuk aplikasi topikal memiliki keuntungan yaitu tidak perlu dikeluarkan atau diulang penggunaannya sehingga lebih efektif dan efisien (Sidiqa & Herriyawan, 2017). Selain itu, penggunaan dalam bentuk gel akan mempermudah dalam pengaplikasian ke dalam poket periodontal penderita, menurunkan efek samping, dan dapat menambah daya *bioavailability* (Adha *et al.*, 2017).



## 2.6 Kerangka Konsep



## 2.7 Penjelasan Kerangka Konsep

*P. gingivalis* dapat menghasilkan faktor virulensi salah satunya *gingipain*. *Gingipain* akan menginduksi tubuh untuk mengaktifkan sel-sel imun seperti PMN dan makrofag untuk melepaskan mediator pro inflamasi seperti IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  dan PGE-2 yang dapat menyebabkan resorpsi tulang alveolar. PGE-2 akan menginduksi osteoblas untuk meningkatkan ekspresi RANKL dan menurunkan produksi OPG. IL-1 dan TNF- $\alpha$  berperan dalam peningkatan apoptosis osteoblas. Penurunan OPG yang berperan mengikat RANKL untuk membentuk osteoblas mengakibatkan RANKL berikatan dengan RANK yang menyebabkan pembentukan osteoklas. Keadaan tersebut menyebabkan penurunan pembentukan osteoblas dan peningkatan osteoklas yang menyebabkan terjadinya kerusakan tulang. Biji kopi robusta (*C. canephora*) mengandung senyawa aktif, yaitu polifenol, alkaloid dan saponin yang bersifat antiinflamasi dengan cara menghambat produksi dari sitokin pro inflamasi. Apabila produksi sitokin pro inflamasi tersebut dihambat, maka pembentukan osteoklas akan menurun sedangkan pembentukan osteoblas akan meningkat. Hal tersebut memicu terjadinya peningkatan pembentukan tulang.

## 2.8 Hipotesis

Terdapat peningkatan jumlah osteoblas dan penurunan jumlah osteoklas setelah pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) pada model tikus periodontitis.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratoris (Hasanah, 2015).

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design* yaitu melakukan pengukuran atau observasi pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, dan kelompok perlakuan pada waktu yang telah ditentukan (Hasanah, 2015).

### 3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.3.1 Tempat penelitian

Pelaksanaan penelitian di tempat sebagai berikut :

1. Identifikasi tanaman kopi robusta di Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember.
2. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta dan pembuatan suspensi *P.gingivalis* di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember.
3. Pembuatan gel ekstrak biji kopi robusta di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember.
4. Perlakuan terhadap hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
5. Pemrosesan jaringan dan pengamatan secara mikroskopis dilakukan di Laboratorium Histologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

#### 3.3.2 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan November 2019 – Februari 2020.

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*).

#### 2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah osteoklas dan osteoblas pada tulang alveolar.

#### 3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dari penelitian ini yaitu sebagai berikut :

- a. Konsentrasi suspensi bakteri *P.gingivalis strain* ATCC 33277  $1,5 \times 10^8$  CFU/ ml sesuai standar Mc Farland 0,5.
- b. Makanan dan minuman tikus secara *ad libitum*.
- c. Ukuran kandang tikus 40cm x 60 cm x 15 cm.

### 3.5 Definisi Operasional

#### 3.5.1 Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta

Gel ekstrak biji kopi robusta merupakan sediaan ekstrak biji kopi robusta yang diproses dengan teknik maserasi dalam bentuk semi padat berbentuk gel yang digunakan sebagai bahan aplikasi topikal pada sulkus gingiva molar pertama kiri bawah. Kopi robusta yang digunakan diperoleh dari Perkebunan Ketakasi Sidomulyo Kabupaten Jember.

#### 3.5.2 Model Tikus Periodontitis

Model tikus periodontitis adalah tikus wistar jantan yang diinduksi *P.gingivalis* pada sulkus gingiva bagian bukal gigi molar pertama kiri bawah sebanyak 0,05 ml dan diberikan setiap 3 hari sekali selama 14 hari menggunakan *tuberculin syringe* dengan ukuran jarum 30 gauge.

#### 3.5.3 Osteoblas

Osteoblas merupakan sel berbentuk kubus atau pipih dengan jumlah inti sel satu berwarna biru / ungu gelap, memiliki sitoplasma yang tampak basofilik

dan terletak pada permukaan jaringan tulang alveolar. Pengecatan jaringan menggunakan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*). Jumlah osteoblas dihitung menggunakan preparat atau sediaan mikroskopis yang diamati di bawah mikroskop binokuler (*Optilab*) dengan perbesaran 400x pada tulang alveolar disekitar akar bagian bukal gigi molar pertama kiri bawah.

#### 3.5.4 Osteoklas

Osteoklas merupakan sel raksasa yang berinti banyak dan terletak pada cekungan dangkal (*lakuna howship*) permukaan tulang alveolar. Pengecatan jaringan menggunakan pewarnaan HE sehingga inti sel akan berwarna biru/ ungu gelap dan sitoplasma berwarna kemerahan. Jumlah osteoklas dihitung menggunakan preparat atau sediaan mikroskopis yang diamati di bawah mikroskop binokuler (*Optilab*) perbesaran 400x pada tulang alveolar disekitar akar bagian bukal gigi molar pertama kiri bawah.

### 3.6 Sampel Penelitian

#### 3.6.1 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan rumus Federer (Hasanah, 2015).

$$(t-1) \times (r-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = banyaknya kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi

15 = nilai konstanta

Berdasarkan rumus yang ditentukan, maka didapatkan jumlah penghitungan sampel minimal adalah sebagai berikut :

$$(7-1) \times (r-1) \geq 15$$

$$6 \times (r-1) \geq 15$$

$$6r - 6 \geq 15$$

$$r \geq 3,5 \approx 4$$



Hasil didapatkan jumlah replikasi minimal sebanyak 4 ekor tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) pada setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 7 kelompok, sehingga jumlah keseluruhan tikus wistar jantan yang digunakan adalah 28 ekor.

### 3.6.2 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dengan kriteria inklusi sebagai berikut :

- a. Tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*)
- b. Berat badan 180-200 gram
- c. Umur 2- 3 bulan
- d. Kondisi fisik tikus dalam keadaan sehat (warna bulu putih bersih, dan mata tikus merah normal)

Kriteria eksklusi merupakan tikus yang mati selama proses penelitian. Tikus dinyatakan *drop out* jika tikus memiliki kriteria eksklusi dan akan diganti dengan tikus lain sesuai kriteria inklusi sehingga didapatkan jumlah sampel yang sesuai dengan besar sampel.

## 3.7 Alat dan Bahan Penelitian

### 3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, botol minum tikus, neraca digital (*Ohaus*), masker, sarung tangan, *dental rat chair*, *tuberculine syringe* kapasitas 1 ml, jarum 30 *gauge*, serbet, tisu, pisau malam, *plastic filling instrument*, blender (*Miyako*), mortar, pastel, *shakerbath*, *rotary evaporator* , tabung reaksi (*Pyrex*), *sentrifuge*, kawat ose, *decycator*, inkubator, *spektrofotometer*, pinset, pot obat, potongan kayu 2x2 cm, lampu spirtus, *microtom* (*Tisuue- Tek*, Jepang), kaca obyek dan penutup, *waterbath*, kuas kecil, kompor listrik (*Maspion*, Indonesia), mikroskop cahaya (*Olympus*, Jepang), optilab (*Obtilab Advance*, Indonesia).

### 3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 28 ekor tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*), aquades steril, media BHI-B, vitamin K, hemin, *yeast extract*, suspensi *P. gingivalis strain ATCC 33277 (MediMark, France)*, biji kopi robusta (*C. canephora*) yang diperoleh dari Perkebunan Kopi Ketakasi Sidomulyo Kab. Jember, etanol 96%, CMC, *chloroform*, buffer formalin, asam formic 10%, xylol, alkohol 70%, 80%, 95%, 100% ,gliserin , parafin, minyak emersi, pewarna *Hematoxilin Eosin (HE)*, *enthelan*, kertas saring, makanan tikus wistar (turbo), gel aloclair.

## 3.8 Prosedur Penelitian

### 3.8.1 Etical Clearance

Sebelum dilaksanakan penelitian, prosedur perlakuan terhadap hewan coba telah memenuhi syarat kelayakan oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dengan nomor surat No. 627/UN25.8/KEPK/DL/2019.

### 3.8.2 Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini dilakukan pada hewan coba yang telah sesuai dengan kriteria, aklimatisasi selama 7 hari di dalam kandang dan diberi pakan standar dan minum.

### 3.8.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

Hewan coba yang telah diaklimatisasi akan dibagi menjadi tujuh kelompok. Pembagian kelompok sebagai berikut :

- a. KN merupakan kelompok kontrol/normal tikus yang tidak diberi perlakuan apapun selama penelitian dan didekaputasi pada hari ke-7.
- b. K(-)7 merupakan kelompok kontrol negatif tikus yang diinduksi *P.gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topikal gel plasebo selama 7 hari dan didekaputasi pada hari ke- 22.

- c. K(-)14 merupakan kelompok kontrol negatif tikus yang diinduksi *P.gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topikal gel plasebo selama 14 hari dan didekaputasi pada hari ke- 29.
- d. K(+)<sup>7</sup> merupakan kelompok kontrol positif yang diinduksi *P.gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topikal Aloclair gel selama 7 hari dan didekaputasi pada hari ke-22.
- e. K(+)<sup>14</sup> merupakan kelompok kontrol positif yang diinduksi *P.gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topikal Aloclair gel selama 14 hari dan didekaputasi pada hari ke-29 .
- f. KP<sup>7</sup> merupakan kelompok perlakuan tikus yang diinduksi *P.gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topikal gel ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 50% selama 7 hari dan didekaputasi pada hari ke-22.
- g. KP<sup>14</sup> merupakan kelompok perlakuan tikus yang diinduksi *P.gingivalis* selama 14 hari kemudian diaplikasikan topikal gel ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 50% selama 14 hari dan didekaputasi pada hari ke-29.

#### 3.8.4 Pembuatan Suspensi *P. gingivalis*

Pembuatan suspensi *P.gingivalis* dengan cara 2 ml larutan BHI-B (*Brain Hearth Infusion Broth*) steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ose *P.gingivalis*. Selanjutnya, suspensi dihomogenkan di atas *centrifuge* yang menyala, setelah itu tabung reaksi dimasukkan ke dalam desicator agar menciptakan suasana anaerob, lalu diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C. Pertumbuhan *P.gingivalis* ditandai dengan adanya kekeruhan pada media. Setelah itu dilakukan pengenceran dengan penambahan aquades steril, dihomogenkan dengan *centrifuge* dan diukur dengan konsentrasi  $1,5 \times 10^8$  CFU/ ml sesuai standar MC Farland 0,5 menggunakan *spektrofotometer* (Ermawati, 2015).

#### 3.8.5 Pembuatan Model Tikus Periodontitis

Model tikus periodontitis adalah tikus wistar jantan yang diinduksi dengan *P.gingivalis* pada sulkus gingiva bagian bukal gigi molar pertama kiri rahang

bawah sebanyak 0,05 ml dan diberikan 3 hari sekali selama 14 hari menggunakan *tuberculine syringe* dengan ukuran jarum 30 gauge (Fadlil *et al.*, 2016).

Waktu yang diperlukan untuk membuat model tikus periodontitis adalah 14 hari. Menurut Fadlil *et al.* (2016) bahwa dengan perlakuan selama 14 hari didapatkan hasil model tikus periodontitis dengan ciri-ciri kerusakan epitel sulkular, terbentuk poket, adanya resorpsi tulang alveolar dan inflamasi. Untuk mengidentifikasi apakah sudah terjadi periodontitis dengan melihat ada tidaknya resorpsi tulang alveolar didapat dari hasil foto radiografi.

#### 2.8.6 Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta

Pembuatan ekstrak biji kopi robusta dilakukan menggunakan teknik maserasi. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) diawali dengan memblender biji kopi robusta yang sudah dikeringkan menjadi serpihan kecil dan halus. Selanjutnya, bubuk kopi ditimbang sebanyak 375 gram menggunakan neraca timbang dan dimaserasi dalam larutan etanol 96 % selama 72 jam. Perbandingan serbuk simplisia dengan etanol yaitu 1:4. Sampel disaring menggunakan kertas saring dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan temperatur 30- 40°C, sehingga diperoleh ekstrak kental 100 % sebanyak 28 gram.

Proses selanjutnya pembuatan basis gel dimulai dengan CMC-Na 2% sebanyak 2 gram ditambahkan dalam 98 ml air panas dengan suhu 70°C di dalam mortar selama 15 menit hingga mengembang, kemudian diaduk sampai terbentuk sediaan berwarna jernih 100 gram. Untuk mendapatkan gel ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 50 % sebanyak 10 gram dilakukan dengan cara 5 gram ekstrak biji kopi robusta dicampurkan dengan 5 gram basis gel kemudian diaduk hingga homogen.

#### 3.8.7 Aplikasi Topikal Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta

Setelah diperoleh model tikus periodontitis, selanjutnya dilakukan aplikasi topikal gel ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 50 % pada sulkus gingiva molar pertama kiri bawah sebanyak 0,05 ml. Konsentrasi gel ekstrak biji kopi

robusta (*C. canephora*) 50 % diberikan sebanyak satu kali sehari selama 7 dan 14 hari pada pagi hari. Aplikasi pada pagi hari dilakukan untuk meminimalisir kontaminasi gel ekstrak kopi dari makanan atau minuman tikus, dikarenakan tikus wistar putih tergolong hewan nokturnal (Wolfenshon & Llyod, 2013), sehingga tikus akan sedikit beraktivitas di pagi hari dengan harapan gel akan bekerja lebih efektif.

#### 3.8.8 Dekaputasi Sampel

Sebanyak 4 ekor tikus wistar dalam setiap kelompok kontrol, kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok perlakuan dilakukan dekaputasi pada hari ke-22 dan ke-29 setelah 14 hari induksi *P.gingivalis* dan pemberian topikal gel ekstrak biji kopi robusta. Dekaputasi sampel dilakukan secara inhalasi menggunakan *chloroform*, selanjutnya dilakukan pengambilan rahang bawah kiri tikus, setelah itu sampel dimasukkan ke dalam buffer formalin selama 24 jam agar jaringan yang akan diamati tidak rusak. Waktu 7 dan 14 hari digunakan untuk melihat jumlah osteoblas dan osteoklas tulang alveolar berdasarkan kondisi TNF- $\alpha$  sebagai mediator inflamasi, mengacu pada penelitian Ermawati (2015) bahwa terjadi peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  pada tikus periodontitis hari ke-7, tetapi pada hari ke-14 ekspresi TNF- $\alpha$  mengalami penurunan yang menandakan terjadi penurunan proses inflamasi.

#### 3.8.9 Tahap Dekalsifikasi Jaringan

Sampel yang telah dimasukkan ke dalam buffer formalin selanjutnya dilakukan dekalsifikasi. Proses dekalsifikasi menggunakan larutan asam formic yang berguna untuk menghilangkan garam-garam kalsium dari jaringan tulang dan gigi sebelum pemotongan sehingga tulang dan gigi menjadi lebih lunak dan memudahkan dalam pemotongan. Tahap dekalsifikasi meliputi :

- a. Sampel yang telah direndam formalin 10 % dicuci dengan air bersih yang mengalir pelan.
- b. Sampel dimasukkan ke dalam larutan asam formic 10 % selama 14 hari dan dilakukan vibrasi setiap hari agar proses dekalsifikasi merata.

- c. Sampel dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa-sisa bahan dekalsifikasi.

#### 3.8.10 Pembuatan Sediaan Histologi

Setelah melalui tahap dekalsifikasi, dilanjutkan tahap pembuatan sediaan histologi sebagai berikut :

- a. Melakukan proses dehidrasi, *clearing* dan impregnasi menggunakan mesin *automatic tissue processor* secara otomatis.
- b. Pembuatan blok (*embedding*)
  1. Persiapan alat cetak dari logam yang berbentuk balok bersiku yang ditempatkan diatas permukaan kaca. Alat cetak diolesi dengan gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dengan balok parafin yang telah *setting*.
  2. Parafin cair dalam dua wadah, yaitu parafin untuk *embedding* dan parafin sebagai media untuk menyesuaikan temperatur jaringan yang akan ditanam.
  3. Parafin cair untuk *embedding* dituangkan ke dalam cetakan hingga penuh setinggi permukaan, lalu jaringan ditanamkan pada posisi yang sesuai dan diusahakan jaringan yang menempel pada dasar cetakan dalam kondisi rata.
  4. Bila parafin sudah *setting*, cetakan dilepaskan dan blok parafin diberi label dan siap dilakukan pemotongan.
- c. Pemotongan jaringan menggunakan mikrotom
  1. Blok parafin diletakkan pada mikrotom.
  2. Pisau mikrotom harus dalam keadaan bersih, kemudian memasang pisau pada posisinya.
  3. Mengatur ketebalan sayatan antara 4-6 mikron.
  4. Memindahkan hasil potongan berupa pita tipis menggunakan kuas ke atas permukaan air dalam *waterbath* dengan temperatur tetap 56°-60° C agar sayatan jaringan dapat mengembang dengan baik.

5. Hasil sayatan diseleksi dan dipindahkan di atas objek glass dan diberi label sesuai dengan label jaringan yang dipotong.
  6. Sediaan jaringan dibiarkan kering dengan *hotplate* pada suhu 30-35 °C selama minimal 24 jam dan selanjutnya dilakukan tahap pengecatan jaringan.
- d. Tahap pengecatan jaringan
- Proses pengecatan jaringan menggunakan HE dengan tahapan sebagai berikut :
1. Deparafinisasi dengan larutan *xylol*, preparat dimasukkan ke dalam *xylol* selama 3 menit lalu diulangi dengan memasukkan kembali ke wadah yang berbeda selama 3 menit.
  2. Redehidrasi dengan larutan alkohol 100% dan 95% masing-masing selama 3 menit sebanyak 2 kali dalam wadah berbeda.
  3. Preparat dibilas dengan air selama 20 menit, untuk menghilangkan kelebihan alkohol.
  4. Preparat diwarnai dengan pewarna *Hematoxylin Mayer's* selama 8 menit.
  5. Dibilas ulang dengan air.
  6. Preparat direndam eosin selama 1 menit.
  7. Dehidrasi kembali dengan konsentrasi meningkat 95% dan 100% masing-masing 3 menit sebanyak 2 kali dalam wadah berbeda.
  8. Kemudian, preparat dimasukkan ke dalam *xylol* tiga kali masing-masing 3 menit dengan wadah berbeda.
  9. *Mounting* menggunakan cairan *Entellan* lalu ditutup dengan *deck glass*.

#### 3.8.11 Tahap Penghitungan Osteoblas dan Osteoklas

Data penelitian diperoleh dari pengamatan sediaan histologi dari tiap kelompok. Pengamatan sediaan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus) dengan perbesaran 400 x. Preparat jaringan dipotong pada arah buko lingual. Pengamatan sel dilakukan dengan membagi setiap preparat dalam 5 lapang

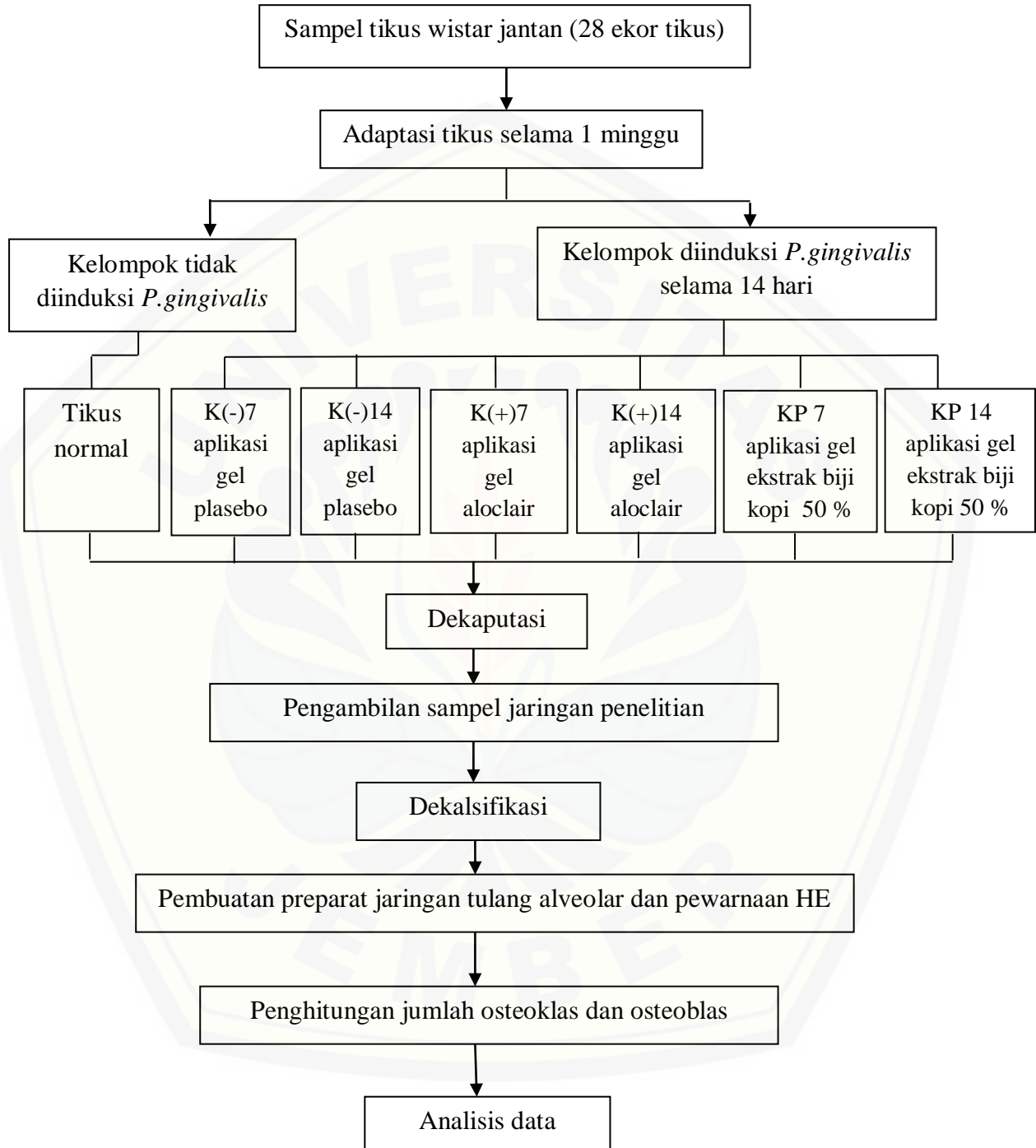
pandang, yaitu tulang alveolar bagian bukal dari korona sampai apikal. Penghitungan osteoblas dan osteoklas dilakukan dengan menghitung jumlah seluruh sel pada setiap lapang pandang. Pengamatan dilakukan oleh 3 orang pengamat agar mendapatkan hasil yang akurat. Setelah itu hasil penghitungan osteoblas dan osteoklas dari ketiga pengamat dijumlahkan dan dirata-rata.

### 3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian disajikan dalam tabel rata-rata jumlah osteoblas dan osteoklas. Selanjutnya dilakukan analisis data menggunakan program SPSS. Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas menggunakan Uji *Saphiro-wilk* untuk mengetahui data terdistribusi normal, lalu uji homogenitas data menggunakan *Levene Test*. Hasil uji data terdistribusi normal dan homogen maka akan dilanjut Uji Parametrik *Two-way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% ( $p < 0,05$ ). Setelah itu, dilanjutkan Uji *Least Significant Difference (LSD)* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok sampel.



### 3.10 Alur Penelitian



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa pemberian gel ekstrak biji kopi robusta (*C. canephora*) dapat meningkatkan jumlah osteoblas dan menurunkan osteoklas pada tulang alveolar model tikus periodontitis.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, saran yang dapat diberikan penulis yaitu:

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut dalam penelitian sejenis mengenai variasi dosis pemberian gel ekstrak biji kopi robusta.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai durasi pemberian gel ekstrak biji kopi robusta.
3. Perlu adanya penelitian lebih lanjut dalam penelitian sejenis mengenai sediaan lain untuk ekstrak biji kopi robusta.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Adha, N., I. Ervina, dan H. Agusnar. 2017. The Effectiveness of Metronidazole Gel Based Chitosan Inhibits The Growth of Bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* (In vitro). *International Journal of Applied Dental Science*. 3(2): 30-37.
- Alibasyah, S. M., D.S. Ningsih, dan S.F. Ananda. 2018. Daya Hambat Minuman Probiotik Yogurth Susu Sapi Terhadap *Porphyromonas gingivalis* Secara In Vitro. *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society*. 3(2) : 65-75.
- Alwan, A. H. 2015. Determination of Interleukin-1beta (IL-1b) dan Interleukin-6 (IL-6) in Gingival Crevicular Fluid in Patients With Chronic Periodontitis. *IOSR Journal of Dental and Medicine Sciences*. 14(11) : 81-90.
- Baek, K. J., K.C. Yong, dan C. Youngnim. 2015. Association of The Invasion Ability *Porphyromonas gingivalis* with The Severity of Periodontitis. *Virulence Research Paper*. 6(3) : 274-281.
- Bhusari, B. M., R. Mahajan, S. Rajbhoj, dan P. Shah. 2014. Reactive Oxygen Species and Its Role in Periodontal Disease. *IOSR Journal of Dental and Medical Science*. 13(8) : 52-59.
- Cekici, A., A. Kantarci, H. Hasturk, dan T. E. V. Dyke. 2014. Inflammatory and Immune Pathways in the pathogenesis of Periodontal Disease. *HHS Public Acces*. 64(1): 57-80.
- Chu, Y. F. 2012. Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention, *First Edition*. Blackwell Publishing . Hal : 21-58.
- Chen, X., Z. Wang, N. Duang, G. Zhu, E.M. Schwarz, dan C. Xie. 2018. Osteoblast-Osteoclast Interactions. *Connect Tissue Research*. 59(2): 99-107.
- Cochran, D.L. 2008. Inflammation and Bone Loss in Periodontal Disease. *Journal Periodontology*. 79 (8) : 1569-1576.
- Dahiya, P., dan K. Reet. 2013. Hyaluronic Acid : A Boon in Periodontal Therapy. *North American Journal of Medical Sciences*. 5(5) : 309-315.
- Dewhirst, F. E. 2015. *Porphyromonas gingivalis* Strain F0566. *American Type Culture Collection*. 1-2.

- Duncan, M., F. Dewhirst, dan T. Chen. 2002. *Porphyromonas gingivalis* Genome Project. *National Institute of Dental and Craniofacial Research*.
- Elkadi, O. M., G.G, Madkour, H.S. Elmenoufy, dan M.E. Refai. 2018. Evaluation of Level of TNF- alfa in Chronic Periodontitis Patients with Gestational Diabetes Mellitus After Phase I Periodontal Therapy. *Egyptian Dental Journal*. 64 (1) : 229-238.
- Ermawati, T. 2015. Potensi Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*C. robusta*) pada Tikus Periodontitis yang Diinduksi Porphyromnas gingivalis. Laporan Penelitian Dosen Pemula. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Fadlil, P. N., T. Ermawati, dan H. Nuzulul. 2016. Pengaruh Pemberian Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap Ketebalan Epitel Gingiva Model Tikus Periodontitis yang Diinduksi *Porphyromonas gingivalis*. *Prosiding The 3<sup>rd</sup> Dentistry Scientific Meeting of Jember* : 102-110.
- Farah, A., dan J. P. Lima . 2019. Consumption of Chlorogenic Acids Through Coffe and Health Implications. *Journal Beverages*. 5(11) : 1-29.
- Farhati, N., dan Muchtaridi. 2016. Tinjauan Kimia dan Aspek Farmakologi Senyawa Klorogenat Pada Biji kopi : Review. *Jurnal Farmaka*. 14(1): 214-227.
- Hardhani, P.R., S.P. Lastianny, dan D. Herawati. 2014. Pengaruh Penambahan Platelet Rich Plasma Pada Bovine Porous Bone Mineral Terhadap Penyembuhan Jaringan Periodontal Pada Terapi Poket Infraboni. *Jurnal Kedokteran Gigi*. 5 (4) : 342-348.
- Hasanah, A. 2015. Efek Jus Bawang Bombay (*Allium cepa* llin) terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit yang Diinduksi Streptozotocin (STZ). *Front Oral Biology Ejournal Universitas Muhammadiyah Malang*. 11 (2) : 92-101.
- Hastuti, D. S. 2018. Kandungan Kafein pada Kopi dan Pengaruh Terhadap Tubuh. *Kimia FIA*. Institut Teknologi Sepuluh November. 1-3.
- Herniyati. 2017. The Increased Number of Osteoblast and Capillaries in Orthodontic Tooth Movement Post-administration of Robusta Cofee extract. *Dental Journal*. 50(2): 91-96.

- How, K. Y., K.P, Song, dan K.G. Chan. 2016. *Porphyromonas gingivalis* : An Overview of Periodontopathic Pathogen Below The Gum Line. *Frontiers in Microbiology Review*.7(53) : 1-14.
- Jiang, N., W. Guo, M. Chen, Y. Zheng, J. Zhou, S.G. Kim, M.C. Embree, K.S. Song, H.F. Marao, dan J.J, Mao. 2016. Periodontal Ligament and Alveolar Bone in health and Adaptation : Tooth Movement.18: 1-8.
- Kapinas, K., dan A.M. Delany. 2011. MicroRNA Biogenesis and Regulation of Bone Remodeling. *Arthritis Research and Therapy*. 13(220) : 1-11.
- Kapoor, P., S. Sachdeva, dan S.Silonie. 2011. Topical Hyaluronic Acid In the Management of Oral Ulcers. *Indian Journal of Dermatology*. 56(3): 300-302.
- Kar, S.K., and Bera. T. K. 2018. Phytochemical Constituent Of Aloe Vera and Their Multifunctional Properties: A Comprehensive Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 9(4): 1416-1423.
- Kassem, A., P. Henning, P. Lundberg, P. Souza, C.Lindholm, dan U.H.Lerner. 2015. *Porphyromonas gingivalis* Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL Through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *Journal Biology Chemistry*. 1-17.
- Laperin, O., A. Cloitre, J. Cailon, O. Huck, *et al.* 2016. Interleukin-33 and RANK-L Interplay in the Alveolar Bone Loss Associated to Periodontitis. *Plos One Research Article*. 1-17.
- Madukwe, I.U. 2014. Anatomy of the Periodontium: A Biological Basis for Radiographic Evaluation of Periradicular Pathology. *Journal of Dentistry and Oral Hygiene*. 6(7): 70-76.
- Mescher, A. L. 2013. *Junqueira's Basic Histology 13<sup>th</sup> Edition*. United States: Mc Graw Hill Education.
- Mittal, M., M.R. Siddiqui, K. Tran, S.P. Reddy, dan A.B. Malik. 2014. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants and Redox Signaling*. 20 (7): 1126-1167.
- MIMS (*Monthly Index of Medical Specialities*). 2015. <https://www.mims.com/indonesia>.
- Mysak, J., S. Podzimek, P. Sommerova, *et al.* 2014. *Porphyromonas gingivalis* : Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research*. 1-8.

- Nakayama, M., dan N. Ohara. 2017. Molecular Mechanism Of *Porphyromonas gingivalis*- Host Cell Interaction On Periodontal Diseases. *Japanese Dental Science Review*. 53: 134-150.
- Neil, M.O., J.A. Holden, J.C. Lenzo, Y. Tan, *et al.* 2016. A Therapeutic *Porphyromonas gingivalis* Gingipain Vaccine induces Neutralising IGG1 Antibodies that Protect Against Experimental Periodontitis. *Nature Research Journal*. NJP Vaccine 1. Article no. 16022.
- Newman., Takei, Klokkevold, dan Carranza. 2015. *Carranza's Clinical Periodontology*. 12<sup>th</sup> Edition. St. Louis : Elsevier.
- Omer, B., A. Satti, B. Gismalla, dan N. Hashim. 2018. The Effect of Local Application of Hyaluronan Gel as An Adjunctive To Scalling and Root Planning in Chronic Periodontitis Patients. *International Scholars Journals*. 6(5) : 163-170.
- Pandit, N., R.Changela, D. Bali, P.Tikoo, dan S.Gugnani. 2015. *Porphyromonas gingivalis* : Its Virulence and Vaccine. *Journal of The International Clinical Dental Research Organization*. 7 (1) : 51-58.
- Panggabean, E. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta : Agro Media Pustaka.
- Pooja, S. 2016. Antioxidants and Its Role In Periodontitis. *Journal of Pharmaceutical Science ad Research*. 8(8) : 759-763.
- Rafiei, M., F. Kiani, F. Sayehmiri, K. Sayehmiri, A. Sheikhl, dan M. Z. Azodi. *Et al.* 2017. Study of Pophyromonas gingivalis in Periodontal diseases: A systematic review and meta-analysis. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. 31(62): 1-7.
- Reis, A. M. S., L. G. R. Ribeiro, N. M. Ocarino, A. M. Goes, dan R. Serakides. 2015. Osteogenic Potential of Osteoblast From Neonatal Rats Born To Mothers Treated With Caffeine Throughout Pregnancy. *BMC Musculoskeletal Disorders Reserach Article*. 16(10): 1-11.
- Saputri, D. 2018. Gambaran Radiografi pada Penyakit Periodontal. *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society*. 3(1): 16-21.
- Shaharudin, A. 2015. *Systematic Review Of The Effectiveness And Tolerability Of hyaluronic Acid For Acute and Chronic Wounds*. Dissertation. Kuala Lumpur : Faculty of Medicine Universty Of Malaya.
- Shrestha, S., M. Neupane, S. Sharma, dan M. Lamsal. 2017. Assessment of Tumor Necrosis Factor-alpha in Gingivitis and Periodontitis Patients. *International Journal of Dental Research*. 5(2) : 108-111.

- Sidiqa, A. N., dan Herriyawan. 2017. Efektifitas Gel Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Pada Perawatan Periodontitis Kronis. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 5(1): 1-6.
- Silva, R. F., G. R. Silva, E.S. Cerri, *et al.* 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Reserch International*. 1-17.
- Subandi, M. 2011. *Budidya Tanaman Perkebunan (Bagian Tanaman Kopi)*. Bandung : Gunung Djati Press.
- Tang., J. Han., H. Meng, Y. Zhao, *et al.* 2016. Downregulation of RANKL and RANKL/Osteoprotegrin Ratio in Human Periodontal Ligament Cells During their Osteogenic Differentiation. *Journal of Periodontal Research*. 51: 125-132.
- Wolfensohn, S., dan M. Lloyd. 2013. *Handbook of Animal Management and Welfare Edisi 4*. New Delhi: Wiley-Blackwell.
- Yasuhara, R., dan Y. Miyamoto. 2011. Roles of Gingipains In Periodontal Bone Loss. *Journal of Oral Bioscience*. 53(3) : 197-205.
- Yuza, F., I.A. Wahyudi, dan S. Larnani. 2014. Efek Pemberian Ekstrak Lidah Buaya (*Aloe barbadensis* Miller) pada Soket Gigi Terhadap Kepadatan Serabut Kolagen Pasca Ekstraksi Gigi Marmut (*Cavia Porcellus*). *Artikel Penelitian Majalah Kedokteran Gigi UGM*. 21(2) : 127-135.

## LAMPIRAN

Lampiran A

A1. Surat *Etichal Clearance*

|  KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)<br>FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER<br>(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH<br>FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER) |   |
|--|---|
| <b>ETHIC COMMITTEE APPROVAL</b><br><u>No.627/UN25.8/KEPK/DJ/2019</u>   |   |
| Title of research protocol   | : *The Effect of Giving Robusta Coffe Bean (coffea canephora) Extract Gel Against the Number of Osteoblast and Osteoclast in Model of Periodontitis Mice.*  |
| Document Approved  | : Research Protocol   |
| Principal investigator   | : Pintaan Qorina Destianingrum  |
| Member of research   | : -   |
| Responsible Physician  | : Pintaan Qorina Destianingrum  |
| Date of approval   | : November 2019 - Selesai   |
| Place of research  | : 1. Lab. Bioscience FKG UNEJ<br>2. Lab. Teknologi Sedia Likuida Bag. Farmasetika Fak. Farmasi UNEJ<br>3. Lab. Hewan Coba Bag. Biomedik FKG UNEJ<br>4. Lab. Histologi Bag. Biomedik FKG UNEJ                                  |
| The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember States That<br>the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.  |   |
| Jember, Nopember 14 <sup>th</sup> 2019   |   |
| <br>Dean of Faculty of Dentistry<br>Universitas Jember<br>(dr. H. Hardyan P. M. Kes, Sp, Pros.)   | <br>Chairperson of Research Ethics Committee<br>Faculty of Dentistry Universitas Jember<br>(Prof. Dr. Drs. Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si.) |



## A2. Surat Identifikasi Tanaman Biji Kopi Robusta

Kode Dokumen : FR-AUK-064  
Revisi : 0

**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**  
**POLITEKNIK NEGERI JEMBER**  
**LABORATORIUM TANAMAN**  
Jalan Mestriq Koroq Plo 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333332 - 333334 Fks.(0331) 333331  
E-mail : [Polije@nelli.ac.id](mailto:Polije@nelli.ac.id) Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

---

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN**  
No: 25/PLT7.3.1.02/LL/2019

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 57384/UN25.8/T1/2019 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Pintang Qorina Destianingrum  
NIM : 161610101102  
Jur/Pak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

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

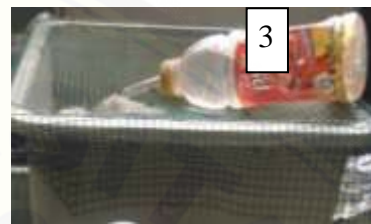
Dumikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 13 September 2019  
Kepala Laboratorium Tanaman  
  
Lili Mastuti, MP  
NIP. 195808201987032001

Lampiran B. Alat dan Bahan Penelitian

B1. Alat Penelitian

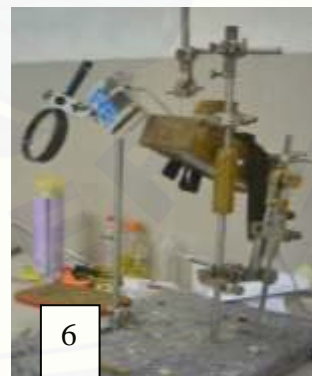
a. Alat Pemeliharaan Hewan Coba



Keterangan :

1. Kandang      2. Tempat pakan      3. Tempat minum

b. Alat Perlakuan Hewan Coba



Keterangan :

- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| 1. Sarung tangan            | 7. Toples kecil/ pot obat                            |
| 2. Masker                   | 8. Pisau malam dan <i>plastic filling instrument</i> |
| 3. Gunting bedah dan pinset |  |
| 4. Jarum tuberkulin 30G     |  |
| 5. Syringe 1 ml             |  |
| 6. <i>Dental rat chair</i>  |  |

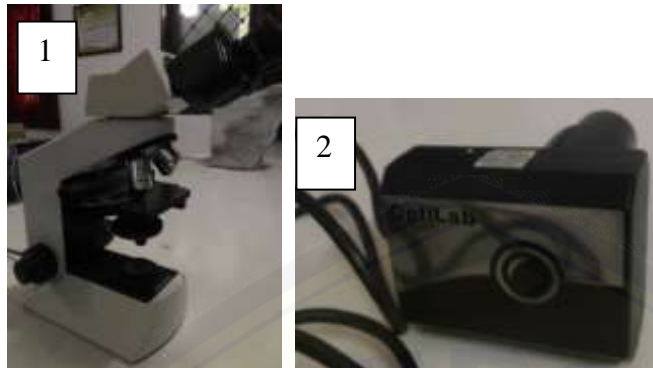
c. Alat Pemrosesan Jaringan dan Pengecatan



Keterangan :

1. *Tissue Processor Automatic* (Tissue Tek VIP 5 Jr., Sakura, Jepang)
2. Mikrotom putar ( Leica RM 2135, Jepang)
3. *Waterbath* (Memmert, Jepang)
4. *Slide warmer* (Sakura, Jepang)
5. Oven (Memmert, Jepang)
6. Kompor listrik (Maspion, Indonesia)

## d. Alat Untuk Pengamatan



Keterangan :

1. Mikroskop binokuler (Olympus CX21 LED, Jepang)
2. Optilab (CX41 RF, Jepang)

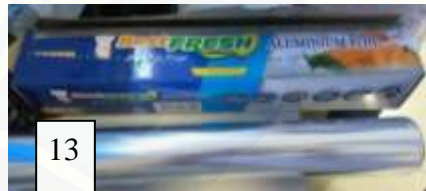
## e. Alat Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta



Keterangan :

- |   |                      |
|---|----------------------|
| 1. Blender (Miyako, Indonesia)                  | 5. Toples Kaca       |
| 2. Oven (Binder, Germany)                       | 6. Batang pengaduk   |
| 3. <i>Rotary Evaporator</i> (Heidolph, Germany) | 7. Mortar dan pastel |
| 4. Loyang                                       |                      |

B2. Bahan Penelitian





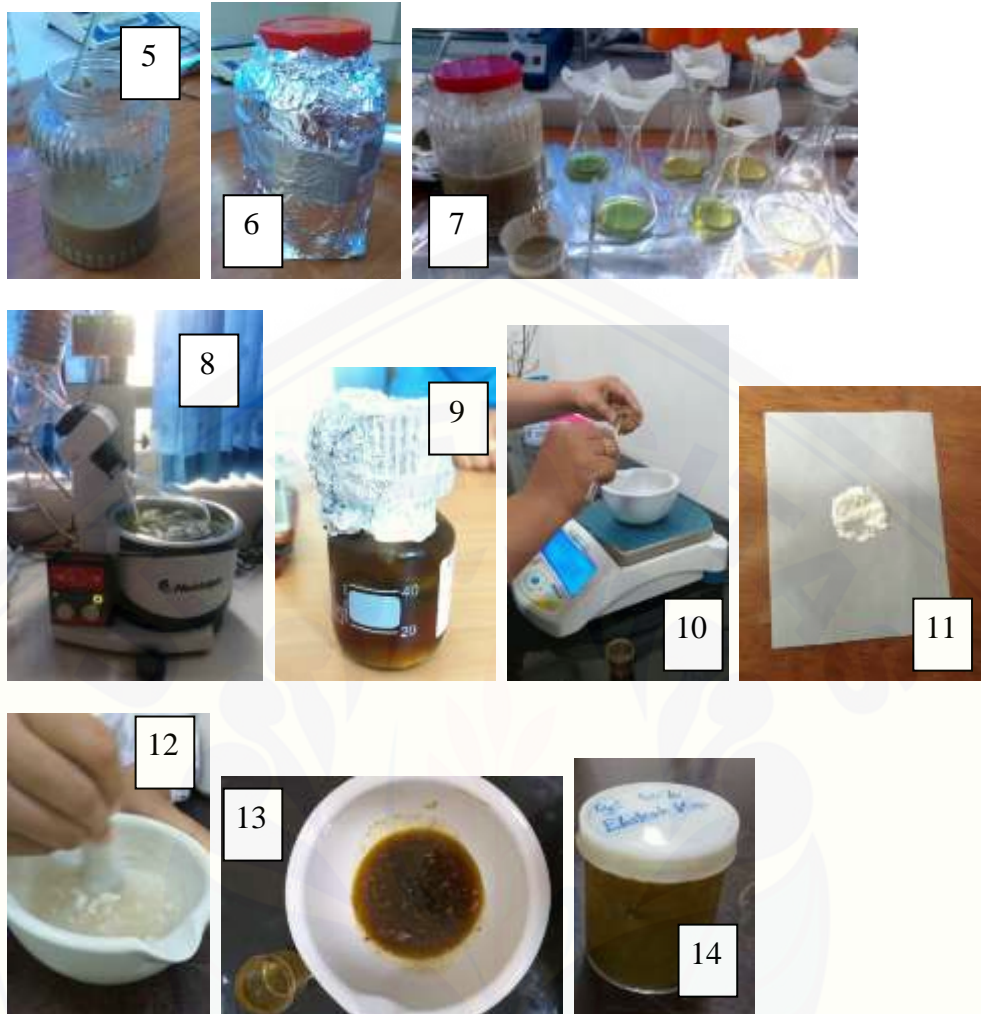
Keterangan :

- |                       |                                   |
|-----------------------|-----------------------------------|
| 1. Etanol             | 13. Alumunium foil                |
| 2. Cover glass        | 14. Gliserin                      |
| 3. Object glass       | 15. Timbagan digital              |
| 4. Alkohol 95%        | 16. Kertas saring                 |
| 5. Entehlan           | 17. Suspensi <i>P.gingivalis</i>  |
| 6. Hematoksilin       | 18. Etanol 96%                    |
| 7. Xylol              | 19. Gel ekstrak biji kopi robusta |
| 8. Eosin 2%           | 20. Gel plasebo                   |
| 9. Parafin            | 21. Aloclair gel                  |
| 10. Formic acid 10%   | 22. Pakan                         |
| 11. Biji kopi robusta |                                   |
| 12. CMC-Na            |                                   |

Lampiran C. Prosedur Penelitian

C1. Pembuatan Gel Ekstrak Biji Kopi Robusta





Keterangan :

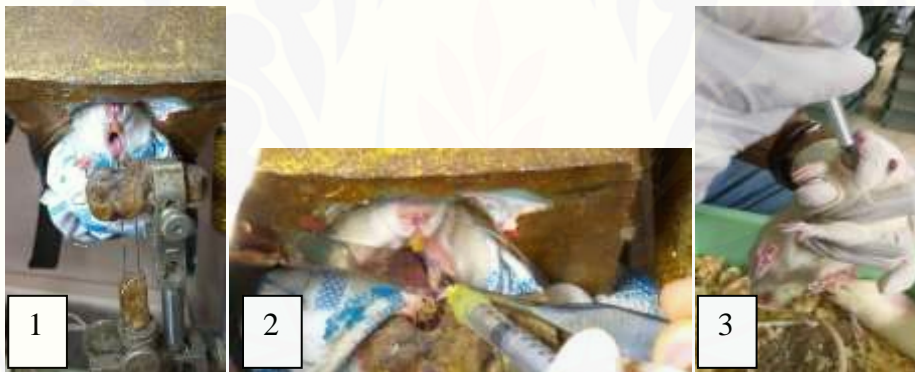
1. Pengovenan biji kopi robusta
2. Pembuatan serbuk biji kopi dengan blender
3. Penimbangan serbuk kopi
4. Pencampuran dengan etanol 96%
5. Pengadukan
6. Toples ditutup dengan aluminium foil
7. Penyaringan larutan campuran ekstrak dan etanol
8. Ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator*
9. Ekstrak kental biji kopi robusta 100%
10. Penimbangan ekstrak kental biji kopi
11. Penimbangan CMC-Na

12. Pengembangan CMC-Na menjadi gel
13. Pencampuran dengan ekstrak kopi robusta
14. Gel Ekstrak kopi 50%

C1. Aklimatisasi hewan coba selama 1 minggu



C2. Perlakuan injeksi selama 14 hari



Keterangan :

1. Hewan coba ditempatkan pada dental rat chair
2. Perlakuan injeksi p.gingivalis
3. Aplikasi topikal gel ekstrak biji kopi

C4. Dekaputasi rahang dan pengambilan jaringan





Keterangan :

1. Dekaputasi hewan coba
2. Pengambilan rahang bawah kiri
3. Fiksasi jaringan menggunakan buffer formalin 10%

#### C6. Pemrosesan Jaringan



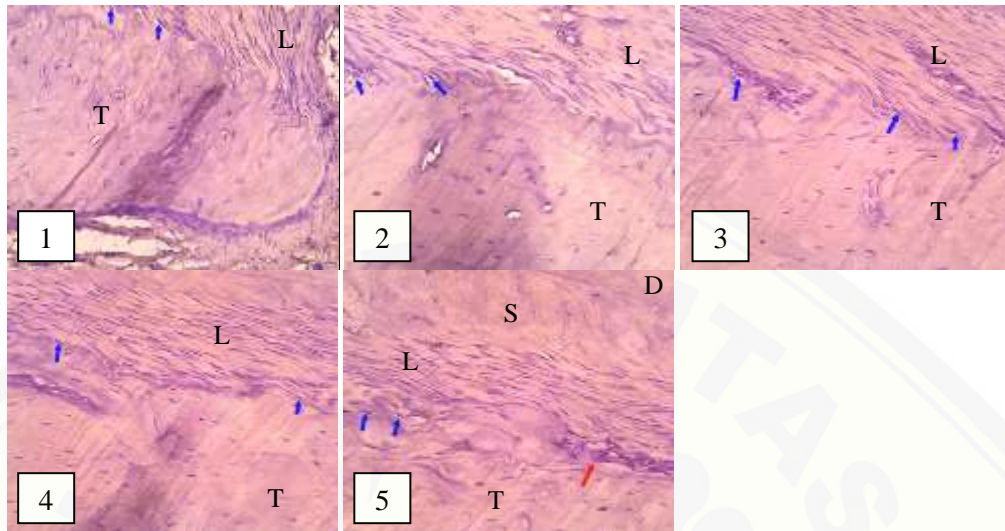
Keterangan :

1. Pemrosesan jaringan
2. Pembuatan blok embedding
3. Penyatan menggunakan mikrotom
4. Sayatan yang sudah jadi
5. Proses pewarnaan menggunakan pewarna HE
6. Hasil pewarnaan
7. Pemasangan cover glass

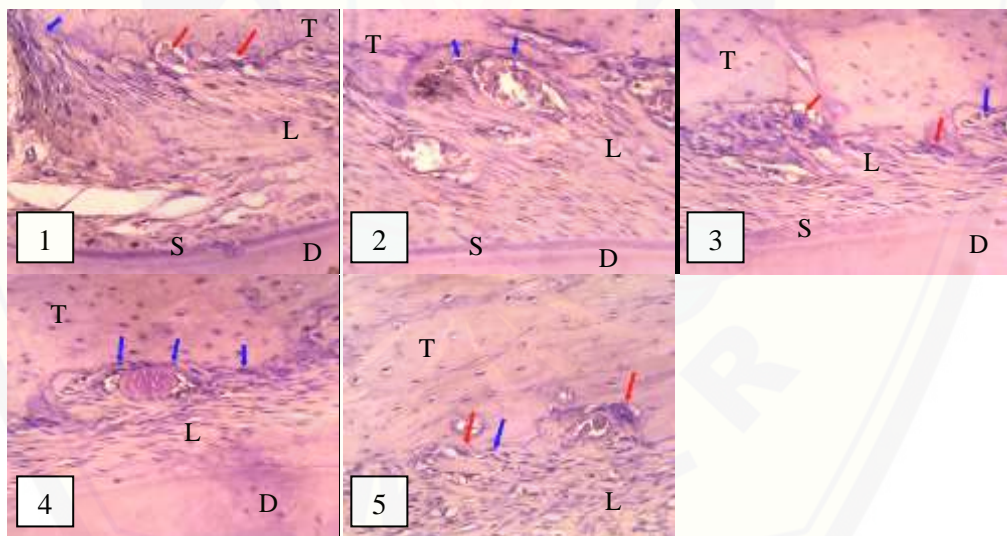
Lampiran D. Hasil Penelitian

D1. Gambar Histologi Osteoblas dan Osteoklas Tulang Alveolar

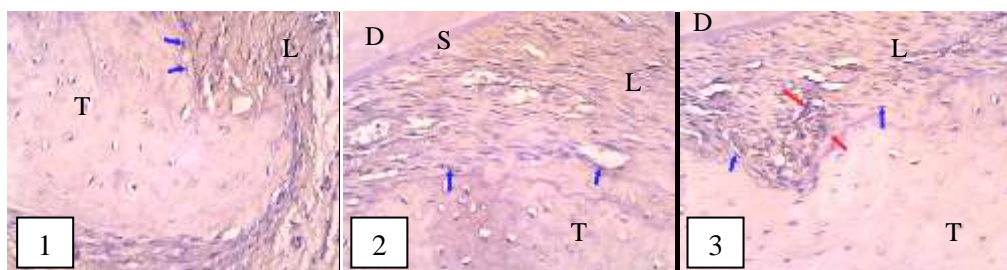
1. Kelompok KN : Kelompok Normal

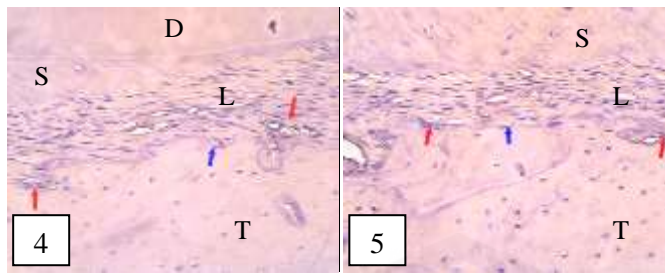


2. Kelompok K(-)7 : Kelompok Periodontitis Hari ke-7

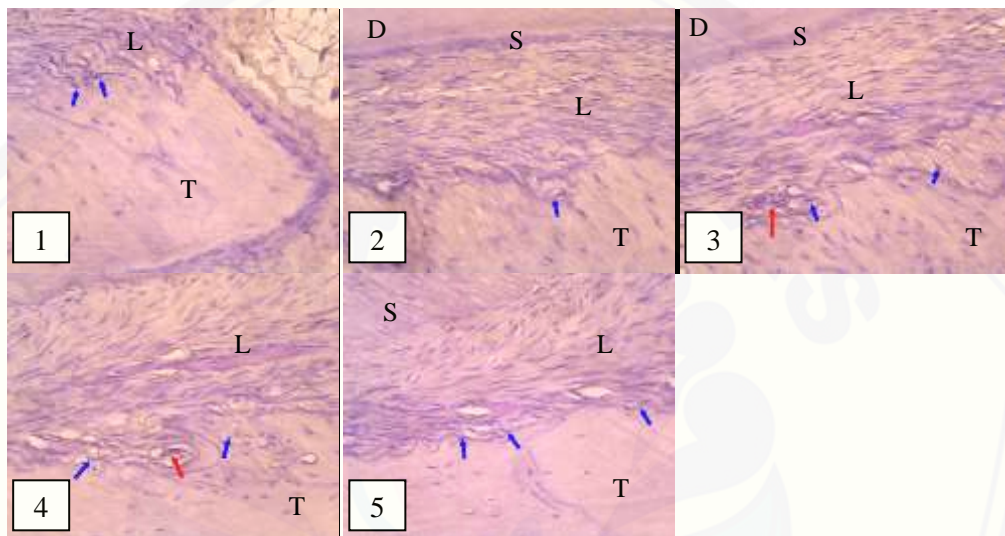


3. Kelompok K(-)14 : Kelompok Periodontitis Hari ke-14

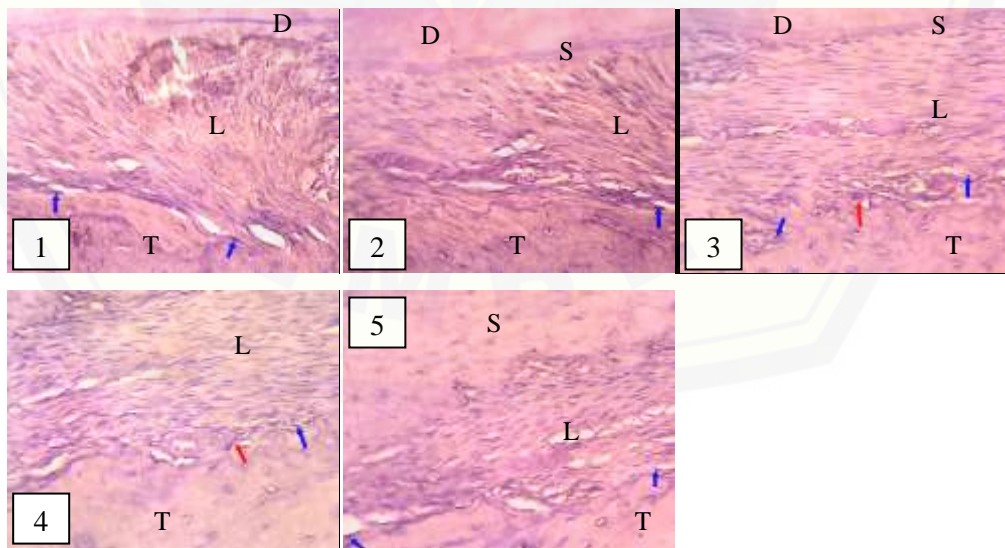




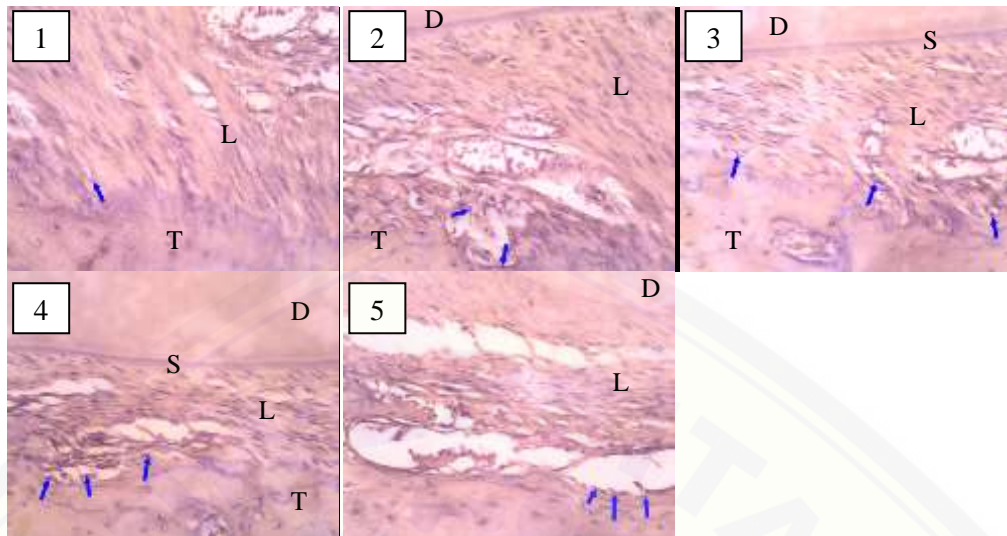
4. Kelompok K(+)<sub>7</sub> : Kelompok Aloclair Hari ke-7



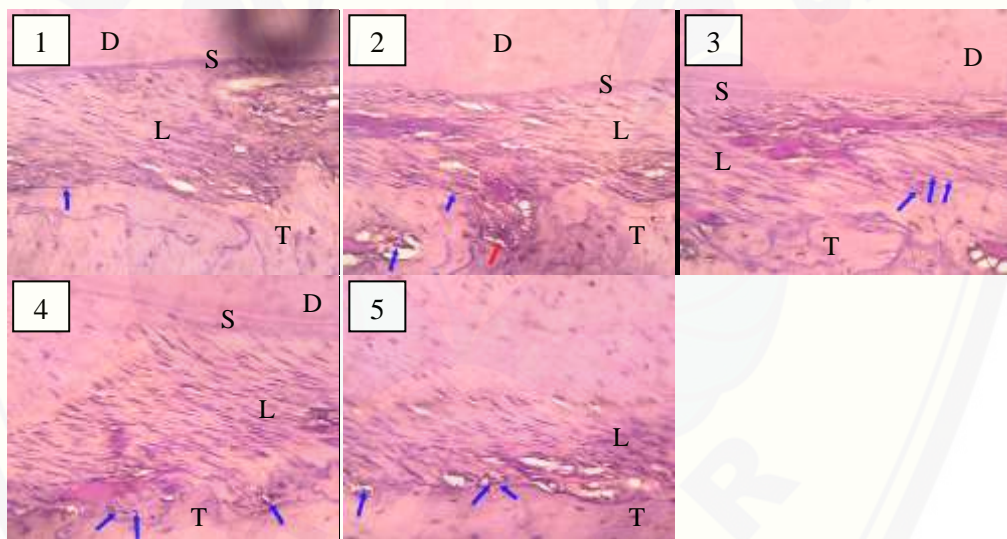
5. Kelompok K(+)<sub>14</sub> : Kelompok Aloclair Hari ke-14



6. Kelompok KP 7 : Kelompok Gel Ekstrak Kopi Hari ke-7



7. Kelompok KP 14 : Gel Ekstrak Kopi Hari ke-14



Keterangan :

|                              |                             |
|------------------------------|-----------------------------|
| 1 : Lapang pandang I         | T : tulang alveolar         |
| 2 : Lapang pandang II        | L : ligamen periodontal     |
| 3 : Lapang pandang III       | D : dentin                  |
| 4 : Lapang pandang IV        | S : sementum                |
| 5 : Lapang pandang V         | Osteoblas : anak panah biru |
| Osteoklas : anak panah merah |                             |

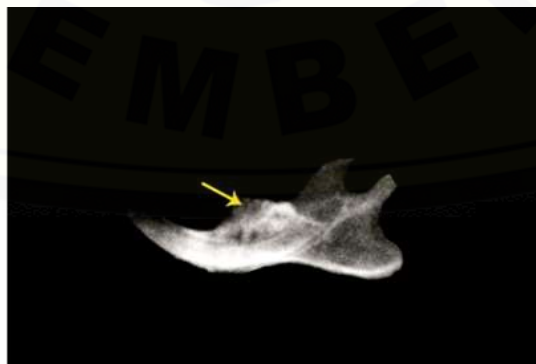
### Gambaran Klinis Tikus Periodontitis

Tikus dikategorikan periodontitis apabila ditemui tanda-tanda peradangan pada jaringan periodontal seperti kemerahan pada gingiva, terbentuk poket, pembesaran margin gingiva (anak panah kuning).



### Gambaran Radiologi Resorpsi Tulang Alveolar Pada Periodontitis

Pada gambaran radiologi terlihat area radiolusen yang terbentuk pada mesial atau distal dari puncak tulang septal yang menunjukkan adanya resorpsi tulang (anak panah kuning). Proses destruksi pada puncak septum interdental menyebabkan tinggi tulang alveolar berkurang dan perubahan kepadatan tulang .



## Lampiran E. Hasil Penghitungan dan Uji Statistik Pada Osteoblas dan Osteoklas

E1. Tabel Hasil Pengamatan Osteoblas dan Osteoklas

| Kelompok | Osteoblas |    |    | Jumlah | Rata-rata | Osteoklas |    |    | Jumlah | Rata-rata |
|----------|-----------|----|----|--------|-----------|-----------|----|----|--------|-----------|
|          | P1        | P2 | P3 |        |           | P1        | P2 | P3 |        |           |
| KN.1     | 30        | 25 | 32 | 87     | 29,00     | 0         | 0  | 0  | 0      | 0,00      |
| 2        | 31        | 30 | 32 | 93     | 31,00     | 0         | 1  | 2  | 3      | 1,00      |
| 3        | 32        | 28 | 31 | 91     | 30,33     | 2         | 1  | 2  | 5      | 1,67      |
| 4        | 35        | 31 | 30 | 96     | 32,00     | 0         | 0  | 1  | 1      | 0,33      |
| K-7.1    | 16        | 13 | 15 | 44     | 14,67     | 8         | 7  | 6  | 21     | 7,00      |
| 2        | 19        | 13 | 16 | 48     | 16,00     | 6         | 7  | 5  | 18     | 6,00      |
| 3        | 14        | 19 | 17 | 50     | 16,67     | 17        | 11 | 11 | 39     | 13,00     |
| 4        | 17        | 17 | 16 | 50     | 16,67     | 8         | 10 | 7  | 25     | 8,33      |
| K-14.1   | 19        | 21 | 21 | 61     | 20,33     | 6         | 8  | 7  | 21     | 7,00      |
| 2        | 22        | 21 | 20 | 63     | 21,00     | 4         | 3  | 4  | 11     | 3,67      |
| 3        | 16        | 17 | 17 | 50     | 16,67     | 4         | 2  | 3  | 9      | 3,00      |
| 4        | 15        | 17 | 21 | 53     | 17,67     | 2         | 2  | 3  | 7      | 2,33      |
| K+7.1    | 27        | 20 | 29 | 76     | 25,33     | 2         | 3  | 4  | 9      | 3,00      |
| 2        | 22        | 27 | 21 | 70     | 23,33     | 8         | 5  | 5  | 18     | 6,00      |
| 3        | 29        | 29 | 32 | 90     | 30,00     | 4         | 3  | 4  | 11     | 3,67      |
| 4        | 22        | 20 | 28 | 70     | 23,33     | 2         | 2  | 2  | 6      | 2,00      |
| K+14.1   | 23        | 20 | 27 | 70     | 23,33     | 4         | 5  | 4  | 13     | 4,33      |
| 2        | 24        | 20 | 29 | 73     | 24,33     | 3         | 4  | 4  | 11     | 3,67      |
| 3        | 26        | 23 | 27 | 76     | 25,33     | 2         | 2  | 3  | 7      | 2,33      |
| 4        | 13        | 22 | 25 | 60     | 20,00     | 1         | 2  | 3  | 6      | 2,00      |
| KP 7.1   | 31        | 31 | 28 | 90     | 30,00     | 0         | 3  | 1  | 4      | 1,33      |
| 2        | 34        | 21 | 31 | 86     | 28,67     | 0         | 1  | 6  | 7      | 2,33      |
| 3        | 32        | 23 | 19 | 74     | 24,67     | 0         | 1  | 3  | 4      | 1,33      |
| 4        | 25        | 16 | 26 | 67     | 22,33     | 0         | 0  | 3  | 3      | 1,00      |
| KP 14.1  | 34        | 32 | 36 | 102    | 34,00     | 0         | 1  | 1  | 2      | 0,67      |
| 2        | 36        | 38 | 32 | 106    | 35,33     | 2         | 0  | 2  | 4      | 1,33      |
| 3        | 34        | 30 | 32 | 96     | 32,00     | 0         | 0  | 0  | 0      | 0,00      |
| 4        | 36        | 34 | 32 | 102    | 34,00     | 2         | 0  | 0  | 2      | 0,67      |

## E2. Hasil Uji Statistik

## 1. Uji Normalitas dan Homogenitas Osteoblas

## Tests of Normality

|           | Kelompok             | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|-----------|----------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|           |                      | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| Osteoblas | Kelompok Normal      | ,170                            | 4  | .    | ,994         | 4  | ,977 |
|           | Kelompok Perio 7     | ,261                            | 4  | .    | ,828         | 4  | ,163 |
|           | Kelompok Perio 14    | ,252                            | 4  | .    | ,903         | 4  | ,446 |
|           | Kelompok Aloclair 7  | ,271                            | 4  | .    | ,814         | 4  | ,130 |
|           | Kelompok Aloclair 14 | ,264                            | 4  | .    | ,913         | 4  | ,499 |
|           | Kelompok Kopi 7      | ,238                            | 4  | .    | ,936         | 4  | ,628 |
|           | Kelompok Kopi 14     | ,299                            | 4  | .    | ,926         | 4  | ,571 |

a. Lilliefors Significance Correction

Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: Jumlah osteoblas

| F     | df1 | df2 | Sig. |
|-------|-----|-----|------|
| 2,337 | 6   | 21  | ,069 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Kelompok + Hari + Kelompok \* Hari

## 2. Uji Two Way Anova Osteoblas

## Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Jumlah osteoblas

| Source          | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F        | Sig. |
|-----------------|-------------------------|----|-------------|----------|------|
| Corrected Model | 929,685 <sup>a</sup>    | 6  | 154,947     | 29,732   | ,000 |
| Intercept       | 17378,313               | 1  | 17378,313   | 3334,583 | ,000 |
| Kelompok        | 832,693                 | 3  | 277,564     | 53,260   | ,000 |
| Hari            | 43,524                  | 1  | 43,524      | 8,352    | ,009 |
| Kelompok * Hari | 93,560                  | 2  | 46,780      | 8,976    | ,002 |
| Error           | 109,442                 | 21 | 5,212       |          |      |
| Total           | 18438,771               | 28 |             |          |      |
| Corrected Total | 1039,127                | 27 |             |          |      |

a. R Squared = ,895 (Adjusted R Squared = ,865)

## 3. Uji Normalitas dan Homogenitas Osteoklas

Tests of Normality

|           | Kelompok             | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|-----------|----------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|           |                      | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| Osteoklas | Kelompok Normal      | ,215                            | 4  | .    | ,962         | 4  | ,793 |
|           | Kelompok Perio 7     | ,283                            | 4  | .    | ,881         | 4  | ,342 |
|           | Kelompok Perio 14    | ,313                            | 4  | .    | ,855         | 4  | ,243 |
|           | Kelompok Aloclair 7  | ,249                            | 4  | .    | ,944         | 4  | ,680 |
|           | Kelompok Aloclair 14 | ,253                            | 4  | .    | ,914         | 4  | ,506 |
|           | Kelompok Kopi 7      | ,364                            | 4  | .    | ,838         | 4  | ,190 |
|           | Kelompok Kopi 14     | ,252                            | 4  | .    | ,945         | 4  | ,683 |

a. Lilliefors Significance Correction

Levene's Test of Equality of Error Variances<sup>a</sup>

Dependent Variable: Jumlah Osteoklas

| F     | df1 | df2 | Sig. |
|-------|-----|-----|------|
| 2,143 | 6   | 21  | ,091 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Kelompok + Hari + Kelompok \* Hari

## 4. Hasil Uji Two Way Anova Osteoklas

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Jumlah Osteoklas

| Source          | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|-----------------|-------------------------|----|-------------|--------|------|
| Corrected Model | 180,620 <sup>a</sup>    | 6  | 30,103      | 10,997 | ,000 |
| Intercept       | 225,998                 | 1  | 225,998     | 82,560 | ,000 |
| Kelompok        | 153,107                 | 3  | 51,036      | 18,644 | ,000 |
| Hari            | 23,980                  | 1  | 23,980      | 8,760  | ,007 |
| Kelompok * Hari | 20,081                  | 2  | 10,040      | 3,668  | ,043 |
| Error           | 57,485                  | 21 | 2,737       |        |      |
| Total           | 520,934                 | 28 |             |        |      |
| Corrected Total | 238,104                 | 27 |             |        |      |

a. R Squared = ,759 (Adjusted R Squared = ,690)



5. Uji LSD Osteoblas

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Osteoblas  
LSD

| (I) Kelompok         | (J) Kelompok         | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|----------------------|----------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                      |                      |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| Kelompok Normal      | Kelompok Perio 7     | 14,580 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | 11,223                  | 17,937      |
|                      | Kelompok Perio 14    | 11,665 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | 8,308                   | 15,022      |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | 5,085 <sup>*</sup>    | 1,6142     | ,005 | 1,728                   | 8,442       |
|                      | Kelompok Aloclair 14 | 7,335 <sup>*</sup>    | 1,6142     | ,000 | 3,978                   | 10,692      |
|                      | Kelompok Kopi 7      | 4,165 <sup>*</sup>    | 1,6142     | ,017 | ,808                    | 7,522       |
| Kelompok Perio 7     | Kelompok Kopi 14     | -3,250                | 1,6142     | ,057 | -6,607                  | ,107        |
|                      | Kelompok Normal      | -14,580 <sup>*</sup>  | 1,6142     | ,000 | -17,937                 | -11,223     |
|                      | Kelompok Perio 14    | -2,915                | 1,6142     | ,085 | -6,272                  | ,442        |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | -9,495 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | -12,852                 | -6,138      |
|                      | Kelompok Aloclair 14 | -7,245 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | -10,602                 | -3,888      |
| Kelompok Perio 14    | Kelompok Kopi 7      | -10,415 <sup>*</sup>  | 1,6142     | ,000 | -13,772                 | -7,058      |
|                      | Kelompok Kopi 14     | -17,830 <sup>*</sup>  | 1,6142     | ,000 | -21,187                 | -14,473     |
|                      | Kelompok Normal      | -11,665 <sup>*</sup>  | 1,6142     | ,000 | -15,022                 | -8,308      |
|                      | Kelompok Perio 7     | 2,915                 | 1,6142     | ,085 | -,442                   | 6,272       |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | -6,580 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,001 | -9,937                  | -3,223      |
| Kelompok Aloclair 7  | Kelompok Aloclair 14 | -4,330 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,014 | -7,687                  | -,973       |
|                      | Kelompok Kopi 7      | -7,500 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | -10,857                 | -4,143      |
|                      | Kelompok Kopi 14     | -14,915 <sup>*</sup>  | 1,6142     | ,000 | -18,272                 | -11,558     |
|                      | Kelompok Normal      | -5,085 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,005 | -8,442                  | -1,728      |
|                      | Kelompok Perio 7     | 9,495 <sup>*</sup>    | 1,6142     | ,000 | 6,138                   | 12,852      |
| Kelompok Aloclair 14 | Kelompok Perio 14    | 6,580 <sup>*</sup>    | 1,6142     | ,001 | 3,223                   | 9,937       |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | 2,250                 | 1,6142     | ,178 | -1,107                  | 5,607       |
|                      | Kelompok Kopi 7      | -,920                 | 1,6142     | ,575 | -4,277                  | 2,437       |
|                      | Kelompok Kopi 14     | -8,335 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | -11,692                 | -4,978      |
|                      | Kelompok Normal      | -7,335 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | -10,692                 | -3,978      |
| Kelompok Kopi 7      | Kelompok Perio 7     | 7,245 <sup>*</sup>    | 1,6142     | ,000 | 3,888                   | 10,602      |
|                      | Kelompok Perio 14    | 4,330 <sup>*</sup>    | 1,6142     | ,014 | ,973                    | 7,687       |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | -2,250                | 1,6142     | ,178 | -5,607                  | 1,107       |
|                      | Kelompok Kopi 7      | -3,170                | 1,6142     | ,063 | -6,527                  | -,187       |
|                      | Kelompok Kopi 14     | -10,585 <sup>*</sup>  | 1,6142     | ,000 | -13,942                 | -7,228      |
| Kelompok Kopi 14     | Kelompok Normal      | -4,165 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,017 | -7,522                  | -,808       |
|                      | Kelompok Perio 7     | 10,415 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | 7,058                   | 13,772      |
|                      | Kelompok Perio 14    | 7,500 <sup>*</sup>    | 1,6142     | ,000 | 4,143                   | 10,857      |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | ,920                  | 1,6142     | ,575 | -2,437                  | 4,277       |
|                      | Kelompok Aloclair 14 | 3,170                 | 1,6142     | ,063 | -,187                   | 6,527       |
| Kelompok Kopi 7      | Kelompok Kopi 14     | -7,415 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | -10,772                 | -4,058      |
|                      | Kelompok Normal      | 3,250                 | 1,6142     | ,057 | -,107                   | 6,607       |
|                      | Kelompok Perio 7     | 17,830 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | 14,473                  | 21,187      |
|                      | Kelompok Perio 14    | 14,915 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | 11,558                  | 18,272      |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | 8,335 <sup>*</sup>    | 1,6142     | ,000 | 4,978                   | 11,692      |
| Kelompok Kopi 14     | Kelompok Aloclair 14 | 10,585 <sup>*</sup>   | 1,6142     | ,000 | 7,228                   | 13,942      |
|                      | Kelompok Kopi 7      | 7,415 <sup>*</sup>    | 1,6142     | ,000 | 4,058                   | 10,772      |

Based on observed means.  
The error term is Mean Square(Error) = 5,212.

\*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

6. Uji LSD Osteoklas

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Osteoklas  
LSD

| (I) Kelompok         | (J) Kelompok         | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|----------------------|----------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                      |                      |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| Kelompok Normal      | Kelompok Perio 7     | -7,833*               | 1,1699     | ,000 | -10,265                 | -5,400      |
|                      | Kelompok Perio 14    | -3,250*               | 1,1699     | ,011 | -5,683                  | -,817       |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | -2,918*               | 1,1699     | ,021 | -5,350                  | -,485       |
|                      | Kelompok Aloclair 14 | -2,333                | 1,1699     | ,059 | -4,765                  | ,100        |
|                      | Kelompok Kopi 7      | -,748                 | 1,1699     | ,530 | -3,180                  | 1,685       |
|                      | Kelompok Kopi 14     | ,083                  | 1,1699     | ,944 | -2,350                  | 2,515       |
| Kelompok Perio 7     | Kelompok Normal      | 7,833*                | 1,1699     | ,000 | 5,400                   | 10,265      |
|                      | Kelompok Perio 14    | 4,583*                | 1,1699     | ,001 | 2,150                   | 7,015       |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | 4,915*                | 1,1699     | ,000 | 2,482                   | 7,348       |
|                      | Kelompok Aloclair 14 | 5,500*                | 1,1699     | ,000 | 3,067                   | 7,933       |
|                      | Kelompok Kopi 7      | 7,085*                | 1,1699     | ,000 | 4,652                   | 9,518       |
|                      | Kelompok Kopi 14     | 7,915*                | 1,1699     | ,000 | 5,482                   | 10,348      |
| Kelompok Perio 14    | Kelompok Normal      | 3,250*                | 1,1699     | ,011 | ,817                    | 5,683       |
|                      | Kelompok Perio 7     | -4,583*               | 1,1699     | ,001 | -7,015                  | -2,150      |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | ,332                  | 1,1699     | ,779 | -2,100                  | 2,765       |
|                      | Kelompok Aloclair 14 | ,918                  | 1,1699     | ,442 | -1,515                  | 3,350       |
|                      | Kelompok Kopi 7      | 2,503*                | 1,1699     | ,044 | ,070                    | 4,935       |
|                      | Kelompok Kopi 14     | 3,333*                | 1,1699     | ,010 | ,900                    | 5,765       |
| Kelompok Aloclair 7  | Kelompok Normal      | 2,918*                | 1,1699     | ,021 | ,485                    | 5,350       |
|                      | Kelompok Perio 7     | -4,915*               | 1,1699     | ,000 | -7,348                  | -2,482      |
|                      | Kelompok Perio 14    | -,332                 | 1,1699     | ,779 | -2,765                  | 2,100       |
|                      | Kelompok Aloclair 14 | ,585                  | 1,1699     | ,622 | -1,848                  | 3,018       |
|                      | Kelompok Kopi 7      | 2,170                 | 1,1699     | ,078 | -,263                   | 4,603       |
|                      | Kelompok Kopi 14     | 3,000*                | 1,1699     | ,018 | ,567                    | 5,433       |
| Kelompok Aloclair 14 | Kelompok Normal      | 2,333                 | 1,1699     | ,059 | -,100                   | 4,765       |
|                      | Kelompok Perio 7     | -5,500*               | 1,1699     | ,000 | -7,933                  | -3,067      |
|                      | Kelompok Perio 14    | -,918                 | 1,1699     | ,442 | -3,350                  | 1,515       |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | -,585                 | 1,1699     | ,622 | -3,018                  | 1,848       |
|                      | Kelompok Kopi 7      | 1,585                 | 1,1699     | ,190 | -,848                   | 4,018       |
|                      | Kelompok Kopi 14     | 2,415                 | 1,1699     | ,052 | -,018                   | 4,848       |
| Kelompok Kopi 7      | Kelompok Normal      | ,748                  | 1,1699     | ,530 | -1,685                  | 3,180       |
|                      | Kelompok Perio 7     | -7,085*               | 1,1699     | ,000 | -9,518                  | -4,652      |
|                      | Kelompok Perio 14    | -2,503*               | 1,1699     | ,044 | -4,935                  | -,070       |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | -2,170                | 1,1699     | ,078 | -4,603                  | ,263        |
|                      | Kelompok Aloclair 14 | -1,585                | 1,1699     | ,190 | -4,018                  | ,848        |
|                      | Kelompok Kopi 14     | ,830                  | 1,1699     | ,486 | -1,603                  | 3,263       |
| Kelompok Kopi 14     | Kelompok Normal      | -,083                 | 1,1699     | ,944 | -2,515                  | 2,350       |
|                      | Kelompok Perio 7     | -7,915*               | 1,1699     | ,000 | -10,348                 | -5,482      |
|                      | Kelompok Perio 14    | -3,333*               | 1,1699     | ,010 | -5,765                  | -,900       |
|                      | Kelompok Aloclair 7  | -3,000*               | 1,1699     | ,018 | -5,433                  | -,567       |
|                      | Kelompok Aloclair 14 | -2,415                | 1,1699     | ,052 | -4,848                  | ,018        |
|                      | Kelompok Kopi 7      | -,830                 | 1,1699     | ,486 | -3,263                  | 1,603       |

Based on observed means.  
The error term is Mean Square(Error) = 2,737.

\*. The mean difference is significant at the 0,05 level.