



**PROLIFERASI SEL MONONUKLEAR DARAH TEPI (PBMC)
YANG DIPAPAR OLEH ION KOBALT DARI ALLOY CoCr
SETELAH DIRENDAM DALAM SEDUHAN
KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)**

SKRIPSI

Oleh

Paramadiva Zefina Putri

NIM 161610101104

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**PROLIFERASI SEL MONONUKLEAR DARAH TEPI (PBMC)
YANG DIPAPAR OLEH ION KOBALT DARI ALLOY CoCr
SETELAH DIRENDAM DALAM SEDUHAN
KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Paramadiva Zefina Putri

NIM 161610101104

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk.

1. Allah SWT, segala puji hanya milik Allah, karena atas izin dan kehendak-Nya saya dapat menyelesaikan tugas akhir ini dengan lancar. Terimakasih atas segala nikmat, anugerah, dan karunia-Mu;
2. Keluarga tercinta, Mama Endah Sayekti, Papi Imam Supriyadi, dan Adikku tersayang Radinta Maharani yang telah memberikan semangat, kasih sayang, doa yang tak pernah putus dan pengorbanan yang tiada batas selama ini;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTTO

“Jangan khawatir jangan terburu – buru.”

(Princess Cinderella)

“Jangan besar tapi hanya besar bicara. Jangan besar ngaku – ngakunya. Tapi besar dalam kapasitas. Besar dalam kemampuan. Besar dalam prestasi.”

(Prabowo Subianto)



HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Paramadiva Zefina Putri

NIM : 161610101104

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Proliferasi Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC) Yang Dipapar Oleh Ion Kobalt Dari Alloy CoCr Setelah Direndam Dalam Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*)” adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab penuh atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 13 Juli 2020

Yang menyatakan,

Paramadiva Zefina Putri

NIM. 161610101104

SKRIPSI

**PROLIFERASI SEL MONONUKLEAR DARAH TEPI (PBMC)
YANG DIPAPAR OLEH ION KOBALT DARI ALLOY CoCr
SETELAH DIRENDAM DALAM SEDUHAN
KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)**

Oleh

Paramadiva Zefina Putri

NIM. 161610101104

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Dewi Kristiana, M. Kes.

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Proliferasi Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC) Yang Dipapar Oleh Ion Kobalt Dari Alloy CoCr Setelah Direndam Dalam Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*)” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin, 13 Juli 2020

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

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

Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes.
NIP. 197102041998022002

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

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

drg. Dewi Kristiana, M. Kes.
197012241998022001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

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

RINGKASAN

Proliferasi Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC) Yang Dipapar Oleh Ion Kobalt Dari Alloy CoCr Setelah Direndam Dalam Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*); Paramadiva Zefina Putri; 161610101104; 2020; 67 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Kopi merupakan minuman yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Salah satu jenis kopi yang paling banyak dikonsumsi adalah kopi robusta. Mengonsumsi kopi banyak dilakukan dan digemari masyarakat, termasuk individu yang memakai gigi tiruan. Pengguna gigi tiruan yang mengonsumsi kopi dapat memicu terbentuknya lingkungan rongga mulutnya yang asam sehingga dapat meningkatkan pelepasan ion dari gigi tiruan yang digunakan. Kopi robusta memiliki kandungan asam kafeat dan asam klorogenat yang lebih banyak. Asam klorogenat dan asam kafeat dapat meningkatkan proliferasi sel mononuklear darah tepi manusia.

Konstruksi gigi tiruan cekat dengan bahan *alloy* CoCr banyak digunakan di bidang kedokteran gigi. *Alloy* berada di dalam rongga mulut dalam jangka waktu yang lama. Kondisi rongga mulut yang basah dan lembab oleh karena adanya saliva, bakteri, dan mikrobiota rongga mulut, perubahan pH, dan suhu dapat menyebabkan pelepasan ion logam. Pelepasan ion Co menimbulkan iritasi, inflamasi atau alergi dengan cara mengaktifkan respon sel imun bawaan. Ion Co dapat merangsang proliferasi dan aktivasi sel-sel imun yaitu *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC) dan sel dendritik. Ion Co juga dapat menginduksi kematian sel melalui aktivitas *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang bertindak sebagai faktor penting dalam tahap awal terjadinya apoptosis.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris *in vitro* dengan rancangan penelitian *the post test group design*. Besar sampel pada penelitian ini adalah tiga. Uji proliferasi yang digunakan untuk mengetahui proliferasi PBMC dalam penelitian ini adalah uji MTT. Penelitian ini menggunakan isolat PBMC dari darah vena perifer orang sehat yang kemudian dipapar dengan hasil perendaman spesimen *alloy* CoCr dalam berbagai larutan yaitu aquades, saliva buatan, seduhan kopi robusta, dan saliva buatan dengan

seduhan kopi robusta dengan variasi waktu perendaman 2 dan 7 hari. Kontrol pada penelitian ini adalah PBMC dengan media kultur dan PBMC dengan saliva buatan tanpa paparan ion logam. Hasil penelitian akan dibaca dengan ELISA reader dan hasil dari uji proliferasi akan dinyatakan dalam bentuk *stimulation index*.

Stimulation index lebih dari 1 dikatakan positif. Hasil *Stimulation index* dalam penelitian ini yaitu pada kelompok PBMC + Media kultur sebesar 0; PBMC + Saliva Buatan sebesar 0,27; PBMC dengan rendaman ion Co dalam aquades 2 dan 7 hari sebesar 0,98 dan 0,65; PBMC dengan rendaman ion Co dalam saliva buatan 2 dan 7 hari sebesar 0,31 dan 1,35; kelompok PBMC dengan rendaman ion Co dalam seduhan kopi 2 dan 7 hari sebesar 1,2 dan 0,49; kelompok PBMC dengan rendaman ion Co dalam seduhan kopi dan saliva buatan 2 dan 7 sebesar 0,77 dan 1,18. Data kemudian dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk* dan uji homogenitas *Levene test*. Data dari penelitian ini terdistribusi normal dan homogen dengan signifikansi $p > 0,05$. Dilanjutkan uji parametrik *Two-Way Anova* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$ antar macam perlakuan dan interaksi antar macam perlakuan dengan waktu perendaman yaitu sebesar $p < 0,001$ namun terdapat perbedaan yang tidak signifikan antar waktu perendaman dengan nilai signifikansi sebesar 0,179. Uji statistika lanjutan *Least Significant Different* (LSD) menunjukkan nilai signifikansi $p < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol (PBMC + Media Kultur) dengan kelompok PBMC + saliva buatan dan kelompok perlakuan PBMC yang dipapar oleh ion kobalt.

Pelepasan ion kobalt dari *alloy* CoCr yang direndam dalam seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) pada perendaman 2 hari tidak dapat meningkatkan proliferasi PBMC sedangkan perendaman 7 hari dapat meningkatkan proliferasi PBMC. Adanya asam klorogenat dalam kopi robusta dapat meningkatkan proliferasi PBMC.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “Proliferasi Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC) Yang Dipapar Oleh Ion Kobalt Dari Alloy CoCr Setelah Direndam Dalam Seduhan Kopi Robusta (*Coffea canephora*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Mama Endah Sayekti dan Papi Imam Supriyadi tercinta yang telah mendoakan dan memberikan semangat yang tidak ada batasnya serta dan adikku tersayang Radinta Maharani Putri yang telah memberikan motivasi dan semangat;
2. Eyang tercinta, Alm. H. Imam Nugroho yang telah menjadi sumber semangat dalam menjalani hidup dan perkuliahan di FKG;
3. drg. Dessy Rachmawati, M. Kes, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, saran, dan meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
4. drg. Dewi Kristiana, M. Kes., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, saran, dan meluangkan waktunya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
5. Prof. Dr. drg. Herniyati, M.Kes, selaku Dosen Penguji Ketua yang telah memberikan bimbingan, saran, kritik, dan meluangkan waktu untuk menyempurnakan skripsi ini;
6. Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan bimbingan, saran, kritik, dan meluangkan waktu untuk menyempurnakan skripsi ini;
7. Dr. drg. Purwanto, M. Kes. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan arahan dan semangat dalam perkuliahan selama ini;

8. Seluruh dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang mendidik dan memberikan bekal ilmu kepada penulis;
9. Pakde, Bude, Om, Tante, dan Sepupu-sepupu tercinta (Fika, Ghina, Alvin, Shafa, Biyo, Naila, Hayu, Farel, Indi, Abil, Rara, dan Ghofa) yang selalu menghibur, memberikan motivasi, doa, dan semangat;
10. Teman-teman seperbimbingan skripsi, Rida, Devanti, Ardin, Okta, dan Seli yang telah banyak membantu dan menyemangati dalam pengerjaan skripsi ini;
11. Orang - orang baik di FKG Nadiyah, Nanad, Devanti, Ibek, Aisya, Icha, Bila, Ajeng, Syifa, Jevina, Chintya, Wita, Alda, Safira, Hasna', Astrid, Pintan, Bintang, dan Dilan yang telah membantu, menemani, memberikan motivasi, dan menghibur;
12. Teman – teman baik penulis Dyah Wahyuning Utami, Apprellyan Visi, dan Bella Trisna yang telah menjadi tempat berkeluh kesah dan menghibur penulis, Maulidya Iswara Bawavi yang telah menjadi tempat berkeluh kesah penulis, dan Dian Rahmawati yang telah menjadi tempat berkeluh kesah selama pengerjaan skripsi ini;
13. Kelompok KKN 188 Desa Sumber Pinang yang memberikan pelajaran hidup selama 45 hari;
14. Seseorang yang telah pergi namun selama pengerjaan skripsi selalu menemani, membantu, memotivasi, dan selalu menasehati penulis sehingga menjadi pelajaran paling berharga dalam hidup penulis;
15. Seluruh teman teman Dextra FKG UNEJ 2016 terima kasih atas persaudaraan dan kekompakannya;
16. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Penulis berharap, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PERBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC).....	5
2.2 Alloy Kobalt Kromium (CoCr)	6
2.2.1 Pengertian Alloy.....	6
2.2.2 Logam Kobalt.....	6
2.2.3 Logam Kromium	8
2.3 Pelepasan Ion Kobalt.....	9

2.4	Respon Rongga Mulut Terhadap Paparan Logam	10
2.5	Kopi Robusta	12
2.5.1	Taksonomi Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>).....	12
2.5.2	Morfologi Kopi Robusta	13
2.5.3	Komposisi Kimia Kopi Robusta.....	14
2.6	Uji Proliferasi PBMC	15
2.7	Kerangka Konsep.....	18
2.8	Keterangan Kerangka Konsep	19
2.9	Hipotesis	19
BAB 3. METODE PENELITIAN.....		20
3.1	Jenis Penelitian.....	20
3.2	Tempat Waktu dan Penelitian.....	20
3.2.1	Waktu Penelitian.....	20
3.2.2	Tempat Penelitian	20
3.3	Identifikasi Variabel.....	20
3.3.1	Variabel Bebas.....	20
3.3.2	Variabel Terikat.....	20
3.3.3	Variabel Terkendali	20
3.4	Definisi Operasional.....	21
3.4.1	Proliferasi Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) ..	21
3.4.2	Pelepasan ion kobalt	21
3.4.3	<i>Alloy</i> CoCr Yang Direndam Dalam Seduhan Kopi Robusta	21
3.5	Uji Proliferasi.....	22
3.6	Alat dan bahan	22
3.7	Sampel Penelitian.....	23
3.7.1	Kriteria Sampel.....	23
3.7.2	Kelompok Sampel	23
3.7.3	Besar Sampel.....	24
3.7.4	Teknik Sampling.....	25
3.8	Prosedur Penelitian.....	25

3.8.1	Ethical Clearance	25
3.8.2	Sterilisasi Alat	25
3.8.3	Pengambilan Sampel Darah	25
3.8.4	Pembuatan Media kultur RPMI.....	26
3.8.5	Isolasi PBMC	26
3.8.6	Persiapan Blank	27
3.8.7	Inkubasi PBMC Dengan Media Kultur.....	27
3.8.8	Inkubasi PBMC dengan Saliva Buatan.....	27
3.8.9	Inkubasi PBMC Dengan Alloy CoCr Yang Telah Direndam Dalam Aquades.	27
3.8.10	Inkubasi PBMC Dengan Alloy CoCr Yang Telah Direndam Dalam Saliva Buatan.....	27
3.8.11	Inkubasi PBMC Dengan Alloy CoCr Yang Telah Direndam Dalam Seduhan Kopi Robusta.....	28
3.8.12	Inkubasi PBMC Dengan Alloy CoCr Yang Telah Direndam Dalam Saliva Buatan Dan Seduhan Kopi.....	28
3.8.13	Uji Proliferasi dengan MTT	28
3.9	Analisis Data.....	29
3.10	Alur Penelitian	30
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN		31
4.1	Hasil Penelitian	31
4.2	Analisis Data.....	34
4.3	Pembahasan	388
BAB 5. PENUTUP		444
5.1	Kesimpulan	444
5.2	Saran.....	444
DAFTAR PUSTAKA		455
LAMPIRAN		51

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Lapisan Elektron Kobalt.....	7
2.2 Mekanisme Immunologi Alergi Kontak	11
2.3 Penampang Melintang Kopi.....	14
4.1 Grafik proliferasi PBMC yang dipapar oleh rendaman spesimen <i>alloy</i> CoCr ditunjukkan sebagai <i>stimulation index</i> (SI). Batang grafik berwarna hitam menunjukkan hasil perendaman <i>alloy</i> CoCr selama 2 hari dan batang grafik berwarna abu abu menunjukkan hasil perendaman <i>alloy</i> CoCr selama 7 hari.	33
4.2 Grafik perbandingan <i>Stimulation index</i> kelompok kontrol (PBMC + Media kultur) dengan berbagai kelompok perlakuan. Batang grafik berwarna hitam menunjukkan hasil perendaman spesimen <i>alloy</i> CoCr selama 2 hari dan batang grafik berwarna abu-abu menunjukkan hasil perendaman spesimen <i>alloy</i> CoCr selama 7 hari. (*) menyatakan $p < 0,05$; (**) menyatakan $p > 0,001$; (***) menyatakan $p < 0,001$	37

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi Kimia Kopi Robusta	14
4.1 Rata-rata hasil pembacaan konsentrasi formazan oleh <i>ELISA reader</i>	32
4.2 <i>Stimulation Index</i>	32
4.3 Jumlah ion Co yang terlepas dari alloy CoCr dari beberapa larutan menggunakan metode AAS	34
4.4 Hasil Uji Normalitas <i>Saphiro Wilk</i>	35
4.5 Hasil Uji Homogenitas <i>Levene Test</i>	35
4.6 Hasil Uji <i>Two-Way Anova</i>	36
4.7 Hasil Uji <i>Least Significant Different</i> (LSD) data proliferasi PBMC yang dipapar oleh saliva buatan dan PBMC yang dipapar oleh hasil perendaman alloy CoCr selama 2 hari	36
4.8 Hasil Uji <i>Least Significant Different</i> (LSD) data proliferasi PBMC yang dipapar oleh saliva buatan dan PBMC yang dipapar oleh hasil perendaman alloy CoCr selama 7 hari	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Pembuatan Specimen <i>Alloy</i> CoCr	51
B. Perendaman Sampel.....	52
C. Pembuatan Media Kultur RPMI	53
D. Ethical Clearance	54
E. Surat Ijin Penelitian.....	55
F. Informed Consent.....	56
G. Alat dan Bahan Penelitian	57
H. Pelaksanaan Penelitian	62
I. Analisis Data.....	65

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi merupakan salah satu minuman yang paling banyak dikonsumsi karena selain enak untuk diminum, kopi mempunyai potensi sebagai bahan herbal yang baik bagi kesehatan. Konsumsi kopi di Indonesia sepanjang periode 2016 - 2021 diprediksi tumbuh rata-rata 8,22%/tahun. Produksi kopi nasional sebesar 81,87% merupakan jenis robusta (Kementrian Pertanian, 2018). Sekitar 94,5% produksi kopi di Indonesia dipasok dari pengusaha kopi perkebunan rakyat. Perkebunan rakyat di Kabupaten Jember mayoritas membudidayakan kopi robusta. Penelitian mengenai tingkat konsumsi kopi di Kabupaten Jember pernah dilakukan oleh Lestari (2009) dari hasil penelitian tersebut didapatkan tingkat konsumsi kopi bubuk lebih banyak pada kelompok umur >25 tahun dengan rata-rata 3,32 kg/tahun. Kopi robusta memiliki komposisi asam klorogenat dan asam kafeat yang lebih banyak daripada kopi arabika. Asam klorogenat dan kafein memiliki kemampuan untuk meningkatkan proliferasi sel mononuklear darah tepi manusia. (Chiang *et al.*, 2003).

Individu yang menggunakan gigi tiruan cekat dengan restorasi berbahan dasar logam dan memiliki kebiasaan mengkonsumsi kopi dapat menurunkan pH saliva. Kopi memiliki pH 5 - 5,5 sehingga kopi dikategorikan sebagai minuman yang asam (Wolowiec *et al.*, 2017). Perendaman dalam seduhan kopi robusta berhubungan dengan pola konsumsi kopi harian yang rata-rata membutuhkan waktu 15 menit jika diasumsikan dengan pemakaian gigi tiruan, perendaman dua hari akan setara dengan pemakaian gigi tiruan selama 6 bulan dan perendaman tujuh hari akan setara dengan pemakaian gigi tiruan selama 2 tahun (Turkun, 2004). Semakin tinggi konsentrasi asam pada lingkungan rongga mulut maka ion hidrogen yang dilepaskan asam akan semakin banyak dan akan mengalami reaksi reduksi. Akibatnya, ion logam akan mengalami reaksi oksidasi yang menyebabkan pelepasan ion logam (Ardhy *et al.*, 2015; Wolowiec *et al.*, 2017).

Pelepasan ion logam dapat menyebabkan korosi. Korosi terjadi antara lingkungan rongga mulut dan *alloy* yang digunakan pada gigi tiruan cekat. Produk korosi dari restorasi gigi tiruan cekat dilepaskan ke dalam saliva. Hal ini didukung oleh penelitian Lages *et al.* (2017) yang menunjukkan bahwa konsentrasi ion logam meningkat dalam saliva pasien yang menggunakan gigi tiruan cekat.

Logam kedokteran gigi selalu dicampur dengan dua atau tiga jenis logam lain yang disebut dengan logam paduan atau *alloy*. Salah satu jenis *alloy* yang digunakan digunakan untuk konstruksi gigi tiruan cekat adalah *alloy* kobalt-kromium (Co-Cr) (Turdean *et al.*, 2019). Prosentase kobalt (5,3%) sebagai alergen pada manusia adalah tertinggi kedua setelah nikel (17,6%) yang sudah dikenal dalam menyebabkan reaksi alergi atau hipersensitivitas (Rachmawati *et al.*, 2013). Rongga mulut memiliki kemungkinan untuk menimbulkan reaksi alergi kontak dibandingkan kulit karena adanya saliva, meningkatnya vaskularisasi mukosa mulut dibandingkan dengan kulit, dan jumlah sel langerhans serta limfosit T yang lebih rendah dalam mukosa. Reaksi hipersensitivitas oral mempengaruhi jaringan oral yang berkontak langsung dengan alergen. Manifestasi reaksi hipersensitivitas pada rongga mulut dapat berupa gambaran difus pada mukosa mulut (Rees, 2011).

Pelepasan ion logam dapat mempengaruhi proses normal secara biologis dan fisiologis seperti proliferasi sel yang berperan dalam sistem imunitas bawaan. Ion logam kobalt dapat merangsang sistem imun melalui proliferasi *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) melalui ikatan antigen logam dengan reseptor TLR4 yang merupakan reseptor untuk mitogen lipopolisakarida (LPS) (Rachmawati *et al.*, 2013). PBMC merupakan bagian dari sel – sel darah yang berinti bulat dan terdiri dari monosit, limfosit (sel T, sel B, dan sel NK), dan sel dendritik (Končarević *et al.*, 2014). PBMC memberikan respons selektif terhadap sistem kekebalan tubuh yang ditargetkan untuk mengeliminasi patogen potensial (Pourahmad dan Salimi, 2015). Co juga dapat menginduksi kematian sel melalui aktivitas *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang bertindak sebagai faktor penting dalam tahap awal terjadinya apoptosis (Birben *et al.*, 2012).

Kontak pertama dengan alergen yang menyebabkan aktivasi sel dendritik untuk dipresentasikan pada sel T naif spesifik. Sel T naif yang teraktivasi akan diikuti oleh ekspansi klon yang masif. Sel T yang berproliferasi dapat berdiferensiasi menjadi beragam subset fenotipik dan fungsional untuk mendapatkan respons imun yang kuat. Selanjutnya, paparan yang berulang dan berkepanjangan pada alergen yang sama menghasilkan aktivasi sel T efektor sebagai aksi sitotoksiknya pada sel (Chen dan Thyssen, 2018)..

Proliferasi sel dapat dievaluasi menggunakan uji MTT. Efek imunitas PBMC salah satunya dapat diketahui dengan mengukur perubahan proliferasi limfosit. Limfosit harus dipicu dengan menggunakan mitogen untuk mengevaluasi proliferasi sel. Mitogen disebut sebagai aktivator limfosit poliklonal yang mampu menginduksi proliferasi sel (Končarević *et al.*, 2014; Molae *et al.*, 2017). Penelitian mengenai pengaruh nikel klorida pada proliferasi sel pernah dilakukan oleh Anto *et al.* (2012) dari hasil penelitian tersebut didapatkan *alloy* yang digunakan dalam kedokteran gigi dan bidang medis lainnya dapat melepaskan ion logam di lingkungan rongga mulut. Pelepasan ion logam dapat mempengaruhi proliferasi sel.

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti bermaksud untuk menganalisis proliferasi sel mononuklear darah tepi (PBMC) yang dipapar oleh ion kobalt dari *alloy* Co-Cr setelah direndam dalam seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pelepasan ion kobalt pada *alloy* CoCr yang direndam dalam seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) selama 2 dan 7 hari dapat meningkatkan proliferasi PBMC?

1.3 Tujuan

Mengetahui apakah pelepasan ion kobalt pada *alloy* CoCr yang direndam dalam seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) selama 2 dan 7 hari dapat meningkatkan proliferasi PBMC.

1.4 Manfaat

1. Menambah pengetahuan tentang pengaruh ion kobalt yang terlepas dari *alloy* CoCr yang direndam dalam seduhan kopi robusta.
2. Sebagai bahan kajian dan panduan untuk penelitian *in vivo* selanjutnya.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)

Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) adalah sel darah tepi yang memiliki inti bulat tunggal. PBMC terdiri dari limfosit (sel T, sel B, dan sel NK), monosit, dan sel dendritik. Efek imunitas PBMC biasanya diketahui dengan mengukur perubahan proliferasi limfosit, karakterisasi profil sekresi sitokin atau perubahan ekspresi gen. Jumlah limfosit berada dalam kisaran 70 - 90%, monosit berada dalam kisaran 10 - 20%, sementara sel dendritik terhitung hanya 1 - 2%. Frekuensi jenis sel dalam populasi limfosit meliputi 70 - 85% sel T CD3 +, 5 - 10% sel B, dan 5 - 20% sel *natural killer* (Končarević *et al.*, 2014).

Sebagian besar PBMC adalah *naïve cells* yaitu dalam keadaan istirahat tanpa fungsi efektor. Dengan tidak adanya respon imun dari sel T, fraksi terbesar dari PBMC yang terisolasi sebagian besar hadir sebagai *naïve T cells* atau memori. Jika antigen sesuai dengan reseptornya maka *naïve T cells* diaktifkan untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel efektor. Ko-reseptor sel T (CD3 + mengekspresikan limfosit T) dapat dibagi menjadi CD4 + dan CD8 + sel sitotoksik. Sel T CD4 + umumnya disebut sebagai sel T helper atau sel Th, karena sel ini mengeluarkan banyak sitokin yang membantu atau mengkoordinasikan imunitas seluler dan humoral. Sel T CD8 + umumnya disebut limfosit T sitotoksik atau sel Tc. Sel T sitotoksik dikenal sebagai fragmen antigen protein virus pada permukaan sel yang terinfeksi virus, yang akan dimusnahkan melalui aktivasi kaskade. (Sen *et al.*, 2018). Sel B atau limfosit B juga ada dalam darah sebagai *naïve cells*. Setelah bertemu dengan antigen, sel B teraktivasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma penghasil antibodi. Sel B adalah sel yang berasal dari sumsum tulang, yang mengekspresikan reseptor sel B dan berikatan dengan antigen spesifik yang memulai respons antibodi sehingga membentuk inti dari sistem imun humoral adaptif. Sel *natural killer* (sel NK), tidak seperti sel T dan B, merupakan komponen penting dari sistem kekebalan tubuh bawaan dan dapat

secara langsung menghancurkan sel yang terinfeksi patogen. Selain itu, sel-sel NK mensekresi limfokin dan berinteraksi dengan sel-sel imun lainnya dan berpartisipasi dalam respon imun dengan cara selain dari sitotoksitas langsung (Verhoeckx *et al.*, 2014). Sel dendritik (DCs) adalah penjaga sistem kekebalan tubuh yang memainkan peran penting dalam merangsang respons kekebalan terhadap patogen dan mempertahankan homeostasis kekebalan terhadap antigen yang tidak berbahaya (Sen *et al.*, 2018).

2.2 Alloy Kobalt Kromium (CoCr)

2.2.1 Pengertian Alloy

Logam yang digunakan di kedokteran gigi untuk mengkonstruksi restorasi tidak menggunakan logam tunggal, karena kurang memenuhi syarat fisis, mekanis, biologis, kimia, dan estetis. Mencampur beberapa logam dengan kadar yang berbeda dilakukan untuk memperbaiki sifat-sifat logam tersebut sehingga logam campur yang terbentuk dapat saling memperbaiki sifat-sifat logam yang merugikan. Logam campur atau paduan disebut *Alloy*. *Alloy* adalah paduan dari dua atau lebih elemen logam atau paduan dari satu atau lebih logam dan elemen nonlogam. *Alloy* banyak digunakan dalam cabang ilmu kedokteran gigi di bidang prostodonsia. Dibandingkan logam tunggal, *Alloy* memainkan peran penting karena logam tunggal tidak memiliki sifat fisik yang sesuai untuk berfungsi dalam berbagai jenis restorasi (Elshahawy dan Watanabe, 2014).

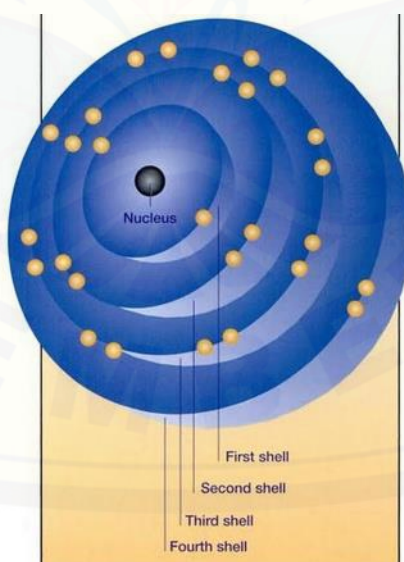
2.2.2 Logam Kobalt

Kobalt adalah salah satu logam yang melimpah di bumi. Jumlah cadangan kobalt yang tersedia di bumi sekitar 7 juta ton. (Yildiz, 2017). Kobalt adalah logam transisi berwarna putih kebiruan yang berada pada periode ke-4, grup 9 (VIII B) dalam sistem periodik unsur (Johnson, 2008).

Atom kobalt terdiri dari tiga partikel yaitu proton dan neutron yang berada dalam nukleus dan elektron yang mengelilingi nukleus. Proton memiliki muatan positif. Neutron tidak memiliki muatan atau netral. Elektron memiliki muatan negatif yang sama dan berlawanan dengan muatan proton. Proton dan elektron dengan muatan yang berlawanan menarik satu sama lain, sehingga elektron ditarik

ke arah proton. Hal tersebut membuat atom tetap bersatu. Kobalt memiliki nomor atom 27 dan konfigurasi elektron terluarnya adalah $[\text{Ar}] 4s^2 3d^7$. Nomor atom adalah jumlah proton dalam suatu atom sehingga atom kobalt memiliki 27 proton dan 27 elektron. Jumlah total partikel dalam nukleus disebut nomor massa atom. Di alam, kobalt memiliki 27 proton dan 32 neutron dalam nukleus yang membuat total 59 partikel (Watt, 2007).

Atom-atom kobalt dan unsur-unsur transisi lainnya mengisi kulit elektron dengan cara yang tidak biasa. Semua logam transisi memiliki kulit elektron dalam yang tidak penuh. Beberapa elemen memiliki tingkat oksidasi yang sama. Namun kobalt dapat memiliki tingkat oksidasi +1, +2, +3, atau bahkan +4. Variasi ini terjadi karena lapisan kulit dalam elektron yang tidak terisi menyebabkan kehilangan jumlah elektron yang berbeda (Watt, 2007). Keadaan oksidasi umum untuk senyawa sederhana adalah Co^{2+} (Yildiz, 2017). Kobalt memiliki keelektronegatifan 1,88 pada skala Pauling dan memiliki potensi ionisasi pertama sebesar 7,88 eV (Johnson, 2008).



Gambar 2.1 Lapisan Elektron Kobalt (Sumber : Watt, 2007)

Jumlah muatan positif proton dalam nukleus sama dengan jumlah muatan elektron diluar nukleus. Atom kobalt memiliki 27 proton dan 27 elektron.

Elektron mengorbit nukleus dalam 4 lapisan kulit. Terdapat 2 elektron dalam lapisan kulit pertama, 8 elektron dalam lapisan kulit kedua, 15 elektron dalam lapisan kulit ketiga, dan 2 elektron pada lapisan kulit keempat atau kulit terluar (Watt, 2007). Kobalt memiliki beragam aplikasi dari industri hingga kedokteran karena sifatnya yang unik seperti titik lebur yang tinggi yaitu 1493°C dan dapat mempertahankan kekuatannya pada suhu yang lebih tinggi, menjadi feromagnetik dengan termostabilitas tinggi dan multivalen (Yildiz, 2017). Dalam bidang kedokteran gigi, logam paduan kobalt kromium banyak digunakan untuk restorasi gigi tiruan cekat. Komponen utama dari *alloy* ini adalah kobalt dengan komposisi sebanyak 60-65%, kromium 27-30%, molybdenum 5-6%, dan kurang dari 1% nikel. Kobalt adalah salah satu penyebab paling umum alergi kontak pada manusia (Chen dan Thyssen, 2018).

2.2.3 Logam Kromium

Kromium adalah logam transisi berwarna abu-abu perak dan berkilau jika dipulas. Kromium berada pada periode ke-4, golongan VIB dalam sistem periodik unsur Kromium memiliki nomor atom 24 dan konfigurasi elektron terluarnya adalah $[\text{Ar}] 3d5 4s1$. Kromium memiliki 28 neutron, 24 proton, dan 28 neutron. Jumlah total partikel dalam nukleus disebut nomor massa atom. Kromium mempunyai 52 nomor massa atom (Lepora, 2006). Kromium memerlukan pemolesan tinggi, tahan pengusaman, dan memiliki titik lebur tinggi. Kromium adalah elemen yang membuat *stainless steel* disebut sebagai "*stainless*" atau tahan karat. Ketika kromium dipotong dan terkena air atau udara lembab, kromium dengan cepat membentuk "lapisan pasif" yang melekat pada permukaan potongan. Jika rusak, lapisan pasif akan berubah dengan cepat, sehingga memberikan perlindungan terus-menerus terhadap logam yang mendasarinya. Baja yang mengandung lebih dari sekitar 10,5% kromium menunjukkan karakteristik "*stainless*" ini. Tanpa perlindungan yang diberikan oleh lapisan pasif, baja akan semakin berkarat (Chen dan Thyssen, 2018).

Alloy Co-Cr (Kobalt dan Kromium) yang digunakan sebagai gigi tiruan cekat dalam kedokteran gigi dapat menjadi konstruksi yang baik karena keberadaan Cr dalam jumlah yang lebih tinggi dari 25% sehingga memberikan

sifat mekanik dan biologis yang baik dan ketahanan korosi yang tinggi (Luchetti *et al.*, 2015).

2.3 Pelepasan Ion Kobalt

Reaksi elektrokimia menyebabkan pelepasan ion logam. Pelepasan ion logam melibatkan dua reaksi yaitu oksidasi dan reduksi. Ion logam sebagai anoda akan mengalami reaksi oksidasi atau melepaskan elektron dan media elektrolit (misalnya saliva) sebagai katoda mengalami reaksi reduksi atau menerima elektron. Pelepasan ion logam dapat menyebabkan korosi. Korosi adalah pelarutan elektrokimia logam saat logam dilepaskan bersama dengan elektron atau proses oksidasi. Pada saat yang sama, elektron diterima atau proses reduksi. Reaksi oksidasi ini mengarah pada pembentukan ion bebas yang dapat berdifusi menjadi larutan di sekitarnya atau terlibat dalam pembentukan oksida logam, klorida logam, senyawa organologam, atau spesies kimia lainnya (Chen dan Thyssen, 2018). Korosi dapat terjadi antara lingkungan rongga mulut dan *alloy* yang digunakan pada gigi tiruan cekat. Saliva dalam rongga mulut mengandung banyak oksidator terlarut seperti oksigen yang menarik elektron dari logam atau *alloy* (Pu dan Wang, 2014; Renita *et al.*, 2016).

Saliva berperan sebagai elektrolit dalam rongga mulut dan merupakan media korosif yang kuat. Pelepasan ion logam dari restorasi gigi tiruan dapat terjadi karena pH rongga mulut yang lebih asam karena mengkonsumsi makanan ataupun minuman yang bersifat asam, temperatur, saliva, dan faktor lainnya. Ketika *alloy* rentan terhadap korosi, sejumlah besar produk korosi, khususnya ion kobalt, dilepaskan ke lingkungan rongga mulut. Memadukan kobalt dan kromium memberikan ketahanan terhadap korosi dan meningkatkan kekuatan mekanik melalui penguatan solusi yang solid. Kromium yang bertindak sebagai *passive oxide layer* memberikan ketahanan terhadap korosi dalam lingkungan korosif. Namun, *passive oxide layer* yang terbentuk pada *alloy* kobalt-kromium ini tidak dapat diandalkan sepenuhnya karena memiliki batas toleransinya sehingga lapisan ini dapat rusak karena permukaan logam yang terpapar oksigen dari media sekitarnya. Kondisi tersebut membuat permukaan logam melepaskan ion ionnya

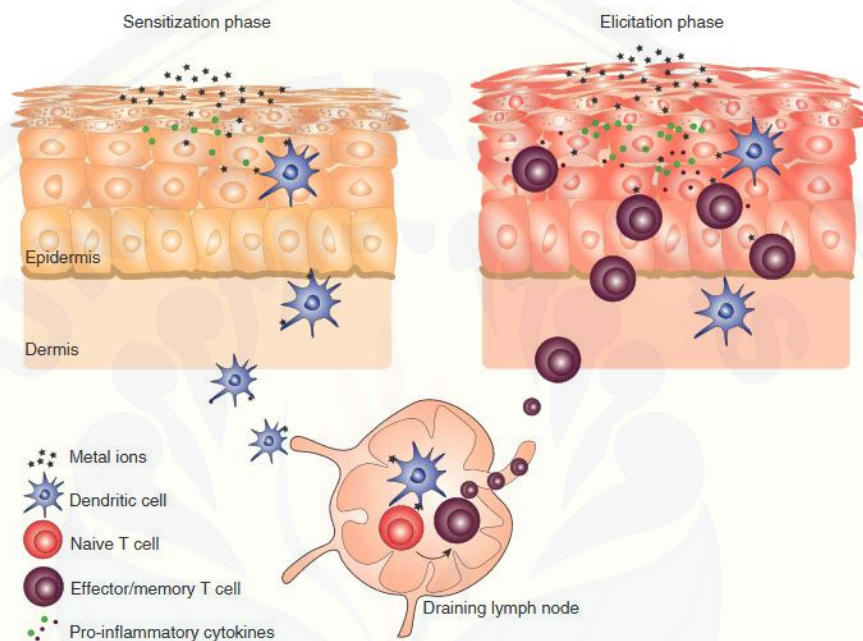
dalam lingkungan rongga mulut dan dapat menembus jaringan sekitarnya (Renita *et al.*, 2016).

2.4 Respon Rongga Mulut Terhadap Paparan Logam

Rongga mulut memiliki kemungkinan untuk menimbulkan reaksi alergi kontak dibandingkan kulit karena karena efek *flushing* dan *buffering* pada saliva, meningkatnya vaskularisasi mukosa mulut dibandingkan dengan kulit, dan jumlah sel langerhans serta limfosit T yang lebih rendah dalam mukosa (Rees, 2011). Reaksi hipersensitivitas oral dapat menyebabkan manifestasi oral yang berbeda tetapi yang sering terjadi adalah dermatitis kontak / stomatitis. Reaksi hipersensitivitas oral ini paling sering memengaruhi lokasi yang berkontak langsung dengan alergen. Reaksi hipersensitivitas tipe IV adalah reaksi inflamasi yang diinisiasi oleh mononuklear leukosit. Reaksi hipersensitivitas tipe IV bermanifestasi 24-72 jam pada rongga mulut setelah antigen diperkenalkan dan dapat terlokalisasi atau terlihat secara difus pada mukosa mulut. Istilah *delayed* digunakan untuk membedakan respons seluler sekunder, yang muncul 24-72 jam setelah paparan antigen, dari respons hipersensitivitas langsung, yang umumnya muncul dalam 12 menit setelah paparan antigen. Reaksi-reaksi ini dimediasi oleh sel T dan monosit / makrofag. Reaksi hipersensitivitas terhadap bahan kedokteran gigi membutuhkan pelepasan antigen alergenik dari bahan tersebut. Antigen yang paling sering menyebabkan hipersensitivitas tipe IV dalam rongga mulut biasanya berasal dari logam. Logam sering digunakan dalam pembuatan gigi tiruan jembatan. Selain nikel dan kromium, kobalt merupakan salah satu logam yang berpotensi untuk memicu reaksi hipersensitivitas tipe IV yang dikenal sebagai *cell-mediated delayed-type hypersensitivity* (DTH) (Abramson, 2018).

Ion kobalt yang terlepas dapat terakumulasi di jaringan yang berkontak dengan kobalt dan menyebabkan inflamasi gingiva. Pada keadaan inflamasi, *epitelial attachment* dapat kehilangan perlekatannya atau rusaknya *junctional epithelium* oleh karena meningkatnya sekresi cairan atau produk bakteri. *Junctional epithelium* bersifat permeabel terhadap beberapa materi mulai dari partikel karbon hingga protein karena ikatan antar selnya hanya dihubungkan oleh

beberapa *desmosome* saja, sehingga ruang antar sel relatif luas dan memungkinkan untuk sekresi cairan dan transmigrasi leukosit. Ruang antar sel yang relatif luas memudahkan antigen untuk berpenetrasi ke jaringan dibawahnya dan diasumsikan dapat membantu produk korosi logam untuk masuk ke pembuluh darah (Chen dan Thyssen, 2018).



Gambar 2.2 Mekanisme imunologi alergi kontak (Chen dan Thyssen, 2018)

Reaksi hipersensitivitas tipe IV melibatkan fase sensitisasi dan fase efektor. Pada fase sensitisasi, ion kobalt dapat mengaktifkan (TLR4) yang merupakan reseptor imun bawaan yang bertanggung jawab untuk respon inflamasi terhadap bakteri gram negatif *lipopolysaccharide* (LPS). Ion logam yang berpenetrasi dalam aliran darah berperan sebagai antigen yang akan ditangkap oleh APC (*antigen presenting cell*) seperti sel dendritik melalui ikatannya dengan reseptor TLR4 (*Toll-like receptor*). Ion logam kemudian dibawa ke kelenjar limfoid regional untuk dipresentasikan ke sel T naif. Sel T naif yang teraktivasi akan diikuti oleh ekspansi klon yang masif. Sel T yang berproliferasi dapat berdiferensiasi menjadi beragam subset fenotipik dan fungsional untuk mendapatkan respons imun yang kuat. Pada kelenjar limfoid regional, sel

dendritik menyajikan alergen pada sel T naif dan pembentukan sel T memori spesifik alergen dan sel T efektor (Chen dan Thyssen, 2018).

Setelah sel inang tersensitisasi, pemaparan yang berkepanjangan atau pemaparan berulang terhadap antigen membuat sel T memori spesifik alergen diaktifkan kembali dan menghasilkan perkembangan fase efektor. Fase efektor dapat terjadi sebagai respons sitotoksik yang dimediasi oleh sel T CD8 + atau lebih umum sebagai respons TH1. TH1 melepaskan sitokin (IL-2, IL-3, IFN- γ , dan TNF- β) dan kemokin (IL-8, faktor makotase dan aktivator makrofag, dan faktor penghambat makrofag) yang meningkatkan fungsi sitokin untuk memproduksi limfosit T dan mengaktifkan makrofag. IL-2 menginduksi proliferasi dan kelangsungan hidup dari sel T CD8 +. IL-3 mendukung pertumbuhan dan diferensiasi limfosit TH1 dan sel NK. IFN- γ berperan menstimulasi makrofag untuk memproduksi sitokin proinflamasi seperti TNF, IL-1, dan IL-6 yang menyebabkan renggangnya sel endotel sehingga dengan mudah terjadi ekstrasvasasi sel hingga nampak tanda-tanda inflamasi seperti kemerahan, edema, dan calor (Snyder, 2017; Chen dan Thyssen, 2018; McKee dan Fontenot, 2016).

2.5 Kopi Robusta

2.5.1 Taksonomi Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kopi adalah tanaman budidaya berbentuk pohon yang termasuk dalam famili *Rubiaceae* dan genus *Coffea*. Genus *Coffea* mencakup hampir 70 spesies, tetapi hanya dua yang ditanam dalam skala luas diseluruh dunia, yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora* var. *robusta*). Sementara itu, sekitar 2% dari total produksi dunia dari dua spesies kopi lainnya, yaitu kopi liberika (*Coffea libericaa*) dan kopi ekselsa (*Coffea excelsa*) yang ditanam dalam skala terbatas. Konsumsi kopi dunia mencapai 70 % berasal dari spesies kopi arabika dan 26% berasal dari kopi robusta. Berikut sistem taksonomi kopi secara lengkap (Rahardjo, 2012) :

Kingdom : *Plantae*

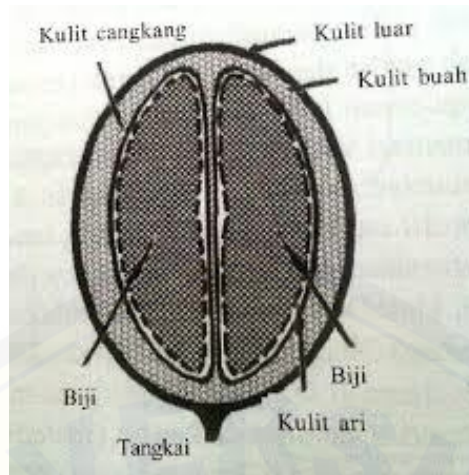
Subkingdom : *Tracheobionta*

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

2.5.2 Morfologi Kopi Robusta

Tanaman kopi tumbuh tegak, bercabang, dan bila dibiarkan tumbuh dapat mencapai tinggi 12 m. Kopi robusta memiliki dua tipe pertumbuhan cabang, yaitu cabang ortotrop yang tumbuh kearah vertikal dan cabang plagiotrop yang tumbuh kearah horizontal (Najiyati, 2012). Tanaman kopi membutuhkan waktu 3 tahun dari saat perkecambahan sampai menjadi tanaman berbunga dan menghasilkan buah kopi. Semua spesies kopi berbunga berwarna putih yang beraroma wangi. Bunga tersebut muncul pada ketiak daunnya. Daun kopi berwarna hijau mengilap yang tumbuh berpasangan dengan berlawanan arah. Bentuk daun tanaman kopi lonjong dengan tulang daun yang tegas. (Rahardjo, 2012). Permukaan atas daun mengkilat, tepi rata, pangkal tumpul dengan panjang 5 - 15 cm dan lebar 4,0 – 6,5 cm.

Bagian dalam dari buah kopi tersusun dari kulit buah (epicarp), daging buah (mesocarp) dikenal dengan sebutan pulp, dan kulit tanduk (endocarp). Buah yang terbentuk akan matang selama 7-12 bulan. Setiap buah kopi memiliki dua biji kopi (Rahardjo, 2012). Biji ini terdiri atas kulit biji dan endosperm. Endosperm merupakan bagian yang bisa dimanfaatkan sebagai bahan untuk membuat minuman kopi (Najiyati, 2012). Biji kopi dibungkus kulit keras disebut kulit tanduk (parchment skin). Biji mempunyai alur pada bagian datarnya (Rahardjo, 2012).



Gambar 2.3 Penampang Melintang Kopi (Wahyuningsih, 2016)

2.5.3 Komposisi Kimia Kopi Robusta

Beberapa zat kimia terkandung dalam kopi, termasuk karbohidrat, lipid, vitamin, mineral, alkaloid, dan senyawa fenolik. Komposisi kimia tanaman kopi bergantung pada varietas kopi, cuaca kultur, pemrosesan, pemanggangan, dan kondisi penggilingan. Pada kopi robusta terdapat dua senyawa utama yaitu kafein dan asam klorogenat.

Tabel 2.1 Komposisi kimia kopi robusta (Farah, 2012)

Komponen	Konsentrasi (g/100 g)
Sukrosa	0,9 – 4,0
Polisakarida	48 – 55
Lignin	3.0
Pektin	2.0
Protein	11.0 – 15.0
Kafein	1.5 – 2.5
Trigonelin	0.6 – 0.7
Diterpenes	0.2 – 0.8
Asam klorogenat	6.1 – 11.3
Mineral	4,4 - 4,5
Asam amino bebas	0,8-1

Kopi robusta memiliki kandungan kafein dan asam klorogenat yang lebih banyak dibandingkan dengan kopi arabika. Kandungan utama yang terdapat

dalam kopi robusta yaitu asam klorogenat dan kafein. Berdasarkan penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Chiang *et al* (2003) menggunakan sel mononuklear darah tepi manusia yang diisolasi dari individu yang sehat. Aktivitas dari senyawa flavonoid seperti asam klorogenat dan asam kafeat dalam berbagai konsentrasi diuji kemampuannya dalam menstimulasi PBMC secara langsung tanpa mitogen dan dipapar selama 3 hari. Asam kafeat atau kafein memiliki efek stimulasi PBMC yang lebih rendah daripada asam klorogenat. Asam klorogenat dan asam kafeat dengan konsentrasi dibawah 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ berpotensi meningkatkan proliferasi sel mononuklear darah tepi manusia dan meningkatkan produksi IFN- γ .

Penelitian *in vitro* lain yang dilakukan oleh Horrigan *et al* (2006) menggunakan PBMC yang berasal dari individu sehat dipapar dengan kafein dengan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 25–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pemaparan selama kurang lebih 5 hari untuk mengetahui efek kafein terhadap proliferasi limfosit menunjukkan bahwa kafein dapat menekan respons proliferasi sebagai respons terhadap mitogen sel-T seperti Conavalin A dan phytohaemagglutinin (PHA) dan juga pada mitogen sel-B seperti mitogen pokeweed (PWM) dan LPS. Ion logam memiliki reseptor yang sama dengan lipopolisakarida (LPS) bakteri yang dapat merangsang respon sistem imun nonspesifik melalui ikatan antigen logam dengan reseptor (Rachmawati *et al.*, 2013). Proliferasi sel T dan sel B dapat ditekan oleh kafein. Waktu pemaparan yang lebih panjang dan konsentrasi kafein yang lebih tinggi diduga dapat menekan respon proliferasi limfosit (Horrigan *et al.*, 2006).

2.6 Uji Proliferasi PBMC

Sel mononuklear darah tepi (PBMC) secara fungsional dapat dievaluasi melalui proliferasinya. PBMC telah banyak digunakan sebagai model penelitian secara *in vitro*. Untuk mengevaluasi tingkat proliferasi sel, limfosit harus dipicu dengan menggunakan beberapa stimulator seperti antigen spesifik, sitokin, dan mitogen yang berbeda. Concanavalin A (ConA), lipopolisakarida (LPS) dan phytohemagglutinin (PHA) adalah mitogen yang paling umum digunakan (Molae *et al.*, 2017). Ion logam memiliki reseptor yang sama dengan lipopolisakarida

(LPS) bakteri yang dapat merangsang respon sistem imun nonspesifik melalui ikatan antigen logam dengan reseptor (Rachmawati *et al.*, 2013).

MTT merupakan garam tetrazolium yang digunakan untuk mengevaluasi proliferasi sel sebagai fungsi dari sistem redoks (Molae *et al.*, 2017). Uji 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi formazan yang berwarna biru-ungu dan tidak larut. Suksinat tetrazolium termasuk rantai respirasi dalam mitokondria pada sel-sel yang hidup. Pembaca sumuran *96-well plate* digunakan sehingga dapat diukur banyak sampel pada saat yang sama. Keuntungan dari uji ini adalah dapat menghemat waktu, tenaga, dan dana. Keuntungan lain adalah metode ini tidak menggunakan isotop radioaktif dan tidak memerlukan transfer sel (Siregar, 2000)..

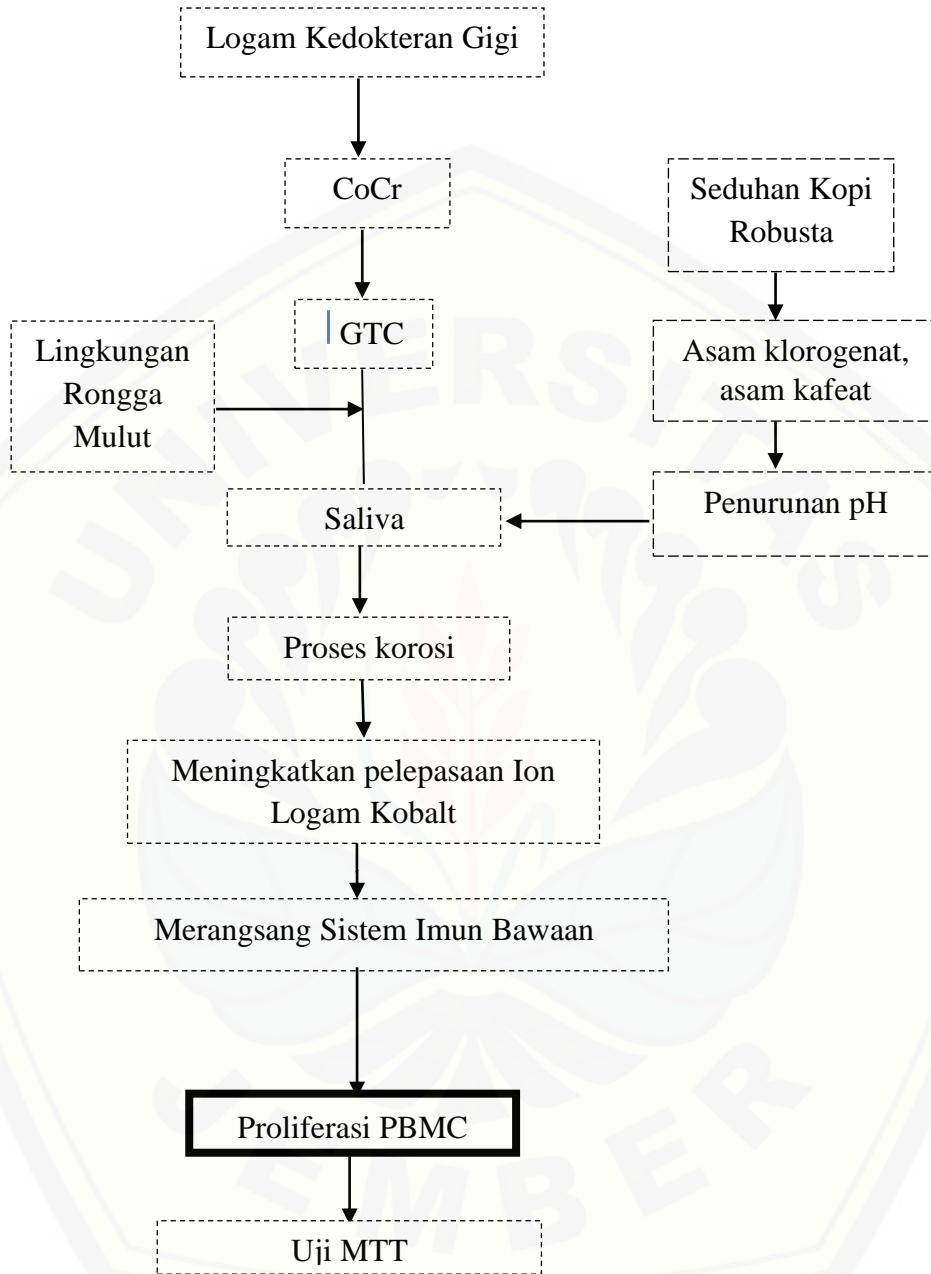
Proliferasi sel dapat dihitung melalui tingkat pertumbuhan sel-sel yang hidup berdasarkan hubungan linier antara aktivitas sel dan absorbansi larutan. Absorbansi larutan dapat dikuantifikasi dengan mengukur panjang gelombang dan intensitas warnanya diukur dengan spektrofotometer sehingga jumlah sel hidup dapat diketahui melalui konsentrasi formazan. Pengukuran intensitas warna dilakukan dan selanjutnya dibaca menggunakan *ELISA reader*. Konsentrasi formazan yang dihasilkan akan diukur setelah dilarutkan dan hasilnya akan berbanding secara proporsional dengan jumlah sel. Semakin pekat warnanya maka nilai absorbansinya semakin tinggi (Siregar, 2000).

Hasil penghitungan proliferasi dipresentasikan sebagai *Stimulation Index* (SI) (Molae *et al.*, 2017). SI menyatakan hubungan antara proliferasi sel dengan antigen dibandingkan tanpa antigen dengan menunjukkan respon terhadap suatu reaksi yang diuji positif atau negatif. *Stimulation index* (SI) dihitung sebagai rasio rata-rata OD sel dengan paparan dikurangi OD media kultur (*blank*) dan dibagi dengan rasio rata-rata OD sel tanpa paparan. *Stimulation index* dikatakan positif jika >2 kali lipat dari sel yang tidak terstimulasi sehingga SI lebih dari 1 merupakan respon proliferasi yang positif (Karami *et al.*, 2016). Perhitungan SI dapat dihitung melalui rumus (Molae *et al.*, 2017) :

$$SI = \frac{\text{Mean OD 630 nm dari PBMC yang dipapar} - \text{Mean OD 630 nm dari blank}}{\text{Mean OD 560 PBMC tanpa paparan}}$$



2.7 Kerangka Konsep



Keterangan :

Diteliti :

Tidak Diteliti :

2.8 Keterangan Kerangka Konsep

Logam di kedokteran gigi biasa digunakan sebagai bahan utama pada konstruksi gigi tiruan cekat (GTC). Salah satu pilihan jenis *alloy* yang dapat digunakan yaitu *alloy* CoCr. Saliva dalam rongga mulut dapat menyebabkan pelepasan ion Co. Konsumsi produk pangan dengan pH rendah seperti kopi robusta yang memiliki pH asam yaitu 5 - 5,5 dapat meningkatkan pelepasan ion Co dari *alloy*. Kopi robusta mengandung asam klorogenat, asam kafeat, dan asam amino bebas. Pelepasan ion Co dari restorasi CoCr akan mengaktivasi respon imun bawaan sehingga meningkatkan proliferasi PBMC yang merupakan sel utama dalam kekebalan tubuh manusia. Asam klorogenat dan asam kafeat (kafein) dalam kopi robusta dapat meningkatkan proliferasi PBMC. Pengaruh proliferasi sel PBMC oleh karena pelepasan ion kobalt dari *alloy* CoCr setelah direndam dalam seduhan kopi robusta dapat diketahui dengan melakukan evaluasi proliferasi sel PBMC menggunakan MTT assay.

2.9 Hipotesis

Ion kobalt dari *alloy* CoCr yang terlepas setelah direndam pada seduhan kopi robusta selama 2 dan 7 hari dapat meningkatkan proliferasi PBMC.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris *in vitro*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design*, yaitu pengukuran awal atau observasi dilakukan setelah perlakuan diberikan *untuk* mengetahui perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (Sugiyono, 2010).

3.2 Tempat Waktu dan Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2020.

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember.

3.3 Identifikasi Variabel

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah pelepasan ion kobalt dari *alloy* CoCr yang telah direndam dalam seduhan kopi robusta.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah jumlah PBMC yang berproliferasi.

3.3.3 Variabel Terkendali

- a. Isolat PBMC dari pasien yang sehat.
- b. *Alloy* CoCr berpenampang bulat dengan diameter 1 cm dengan ketebalan 0,1 cm.
- c. Seduhan kopi robusta
- d. Saliva buatan.

- e. Alat penelitian yang disterilkan dalam waktu yang bersamaan.
- f. Cara kerja penelitian.
- g. Perlakuan pada sampel.
- h. Uji proliferasi dan cara penghitungan hasil.

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 Proliferasi *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (PBMC)

PBMC didapatkan dengan mengisolasi 3 ml darah vena tepi yang berasal dari pasien donor sehat dengan metode *Single Filter/Lymphoprep*. PBMC merupakan bagian dari sel – sel darah yang berinti bulat dan terdiri dari monosit, limfosit (sel T, sel B, dan sel NK), dan sel dendritik. Proliferasi PBMC dapat terjadi ketika dipicu oleh mitogen. Ion logam dapat merangsang respon sistem imun non-spesifik melalui ikatan antigen logam dengan reseptor TLR4 yang merupakan reseptor untuk mitogen lipopolisakarida (LPS).

3.4.2 Pelepasan ion kobalt

Pelepasan ion kobalt berasal dari *alloy CoCr*. *Alloy CoCr* atau paduan logam kobalt kromium yang digunakan pada penelitian ini berpenampang bulat dengan diameter 1 cm dan ketebalan 0,1 cm. Pelepasan ion kobalt dari restorasi gigi tiruan cekat dapat terjadi karena pH dalam rongga mulut yang asam. Lingkungan asam rongga mulut akan menyebabkan peningkatan pelepasan ion logam.

3.4.3 *Alloy CoCr* Yang Direndam Dalam Seduhan Kopi Robusta

Alloy CoCr direndam dalam seduhan kopi robusta dengan waktu perendaman 2 dan 7 hari. Seduhan kopi adalah kopi yang disajikan dengan cara seduh manual atau *manual brewing* tanpa mesin. Seduhan kopi yang digunakan pada penelitian ini di produksi oleh PTPN XII Jember dan dibuat dengan melarutkan 3 mg bubuk kopi robusta dalam 100 ml aquades. pH seduhan diukur menggunakan pH meter digital dan diperoleh pH sebesar 5,0.

3.5 Uji Proliferasi

MTT merupakan garam tetrazolium yang digunakan untuk mengevaluasi proliferasi sel sebagai fungsi dari sistem redoks (Molae *et al.*, 2017). Uji 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi formazan yang berwarna biru-ungu dan tidak larut (Molae *et al.*, 2017).

3.6 Alat dan bahan

Alat

- a. *Centrifuge*
- b. Gelas ukur
- c. *Shaker Incubator*
- d. *Laminar Flow Cabinet*
- e. *96-well plate culture*
- f. Pipet mikro
- g. Rak Tabung
- h. *Syringe 5 ml*
- i. Tabung *ependorf*
- j. Tabung heparin
- k. Neraca timbangan
- l. *Vortex mixer*
- m. *ELISA reader*
- n. *Yellow tip* dan *blue tip*
- o. Botol duran
- p. Erlemeyer
- q. Tourniquet
- r. *Beaker glas.*

Bahan

- a. Darah vena kapiler
- b. Saliva buatan dengan pH 6,5

- c. Bubuk Kopi Robusta
- d. Aquades dengan pH 7,2
- e. Logam kobalt kromium
- f. Larutan Lymphoprep
- g. HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)
- h. RPMI (Rosewel Park Memorial Institute Media)
- i. Fungizone
- j. Penicillin streptomycin
- k. *Dimethylsulfoxide* (Merck, Darmstadt, Germany)
- l. Alkohol 70%
- m. Aquades
- n. *MTT (3-(4,5 dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid)*
- o. FBS (*Fetal Bovine Serum*)

3.7 Sampel Penelitian

3.7.1 Kriteria Sampel

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

3.7.2 Kelompok Sampel

Sampel penelitian dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, sebagai berikut :

- a. Blank : Media kultur
- b. Kelompok 1 : PBMC + Media kultur
- c. Kelompok 2 : PBMC + Saliva buatan
- d. Kelompok 3 : PBMC + Media kultur yang dipapar larutan ion Co setelah direndam oleh aquades yang telah dilakukan perendaman selama 2 hari
- e. Kelompok 4 : PBMC + Media kultur yang dipapar larutan ion Co setelah direndam dalam aquades yang telah dilakukan perendaman selama 7 hari

- f. Kelompok 5 : PBMC + Media kultur yang dipapar larutan ion Co setelah direndam dalam saliva buatan yang telah dilakukan perendaman selama 2 hari
- g. Kelompok 6 : PBMC + Media kultur yang dipapar larutan ion Co setelah direndam dalam saliva buatan yang telah dilakukan perendaman selama 7 hari
- h. Kelompok 7 : PBMC + Media kultur yang dipapar larutan ion Co setelah direndam dalam seduhan kopi robusta yang telah dilakukan perendaman selama 2 hari
- i. Kelompok 8 : PBMC + Media kultur yang dipapar larutan ion Co setelah direndam dalam seduhan kopi robusta yang telah dilakukan perendaman selama 7 hari
- j. Kelompok 9 : PBMC + Media kultur yang dipapar larutan ion Co setelah direndam dalam saliva buatan dan seduhan kopi robusta yang telah dilakukan perendaman selama 2 hari
- k. Kelompok 10 : PBMC + Media kultur yang dipapar larutan ion Co setelah direndam dalam saliva buatan dan seduhan kopi robusta yang telah dilakukan perendaman selama 7 hari

Sepuluh kelompok perlakuan ini masing-masing akan diujikan pada 96-*well plate culture*.

3.7.3 Besar Sampel

Penentuan besar sampel pada penelitian ini diambil menurut rumus federer (Prihanti, 2016) :

$$(n - 1)(t - 1) \geq 15$$

Keterangan :

n = Besar sampel tiap kelompok

t = Banyaknya kelompok

Perhitungannya yaitu :

$$(n - 1)(t - 1) \geq 15$$

$$(n - 1)(10 - 1) \geq 15$$

$$9(n - 1) \geq 15$$

$$9n - 9 \geq 15$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 2,667$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini 3. Peneliti menggunakan 3 (tiga) sampel untuk setiap perlakuan.

3.7.4 Teknik Sampling

Teknik sampel yang digunakan adalah teknik *simple random sampling*. Sampel PBMC pada *96-well plate culture* yang telah memenuhi kriteria diuji secara acak kemudian pada masing-masing *microplate* dibagi dalam sepuluh kelompok terdiri dari 3 buah sampel sehingga secara keseluruhan terdapat 33 sampel. Pada *96-well plate culture* yang terdiri dari 96 *well*, diambil 33 *well* untuk selanjutnya dilakukan uji MTT.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 *Ethical Clearance*

Prosedur pengambilan darah pada pasien dilakukan setelah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.8.2 Sterilisasi Alat

Mencuci bersih semua alat penelitian yang terbuat dari logam kemudian disterilkan dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121 °C dan mensterilkan alat yang terbuat dari plastik menggunakan alkohol 70%.

3.8.3 Pengambilan Sampel Darah

- a. Melakukan pengambilan darah sebanyak 21 ml dari darah vena perifer orang sehat dengan menggunakan syringe 3 ml.

- b. Memasukkan darah yang telah diambil ke dalam tabung heparin secara perlahan-lahan dengan melewati pada dinding tabung agar tidak berbuih.
- c. Menggoyangkan tabung heparin agar darah tidak menggumpal.

3.8.4 Pembuatan Media kultur RPMI

- a. Membuat dari sediaan bubuk ke cair (dalam 200 ml aquades steril).
- b. Menambahkan 1,87 gram serbuk RPMI dan 20 ml FBS dalam 180 ml aquades steril (Lampiran).
- c. Membuang larutan sebanyak 2 ml.
- d. Menambahkan 2 ml *Penicillin streptomycin*.

3.8.5 Isolasi PBMC

Teknik isolasi PBMC menggunakan metode *Single Filter/Lymphoprep*.

- a. Memasukkan 3 ml sampel darah pada tabung heparin dan dicampur hingga merata secara perlahan-lahan dengan melewati pada dinding tabung sehingga tidak berbuih menggunakan mikropipet dan blue tip.
- b. Membuat *diluent* darah yang dengan mengencerkan darah menggunakan garam fisiologi (HBSS pH 7.4) dengan perbandingan *diluent* darah dan HBSS adalah 1:1, kemudian homogenkan.
- c. Memasukkan *diluent* darah secara perlahan pada tabung yang sudah diisi 3 ml larutan *Lymphoprep*, dengan perbandingan *Lymphoprep* dan *diluent* darah adalah 1:2. Larutan *Lymphoprep* jangan sampai pecah.
- d. Mensentrifugasi *diluent* darah menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 800 g selama 20 menit pada suhu 20°C hingga terbentuk 4 lapisan (plasma, mononuklear, *lymphoprep*, polimorfonuklear eritrosit).
- e. Mempipet lapisan ke 2 mononuklear (cincin kabut) secara hati-hati dan memasukkan ke dalam tabung steril.
- f. mengencerkan sampel mononuklear menggunakan HBSS dengan perbandingan sampel mononuklear dan HBSS adalah 1:1, kemudian homogenkan.
- g. Mensentrifugasi sampel menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 900 g selama 3 menit dengan suhu 20°C, lakukan pengulangan sebanyak 2 kali.

Setelah terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan *supernatant* (PBS dan sisa plasma) pada bagian atas dan *PBMC* pada bagian bawah, lapisan *supernatant* dibuang secara perlahan.

- h. Menambahkan 1 ml HBSS/PBS pH 7,4 pada *supernatant* yang telah didapat kemudian homogenkan.
- i. Menambahkan media kultur RPMI yang telah ditambahkan *Penicillin streptomycin* dan FBS.

3.8.6 Persiapan Blank

Menempatkan media kultur pada 3 well dari *96-well plate culture* yang tersedia. Menginkubasi sel pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO_2 selama 4 jam sebelum dilakukan uji proliferasi.

3.8.7 Inkubasi PBMC Dengan Media Kultur

Menambahkan media kultur pada 3 *well* dari *96-well plate culture* dan telah terisi 5×10^4 sel PBMC hingga total volume $200\mu\text{l}$ per *well*. Menginkubasi sel pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO_2 selama 4 jam sebelum dilakukan uji proliferasi MTT.

3.8.8 Inkubasi PBMC dengan Saliva Buatan

Menambahkan saliva buatan pada 3 *well* dari *96-well plate culture* yang tersedia dan telah terisi 5×10^4 sel PBMC hingga total volume $200\mu\text{l}$ per *well*. Menginkubasi sel pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO_2 selama 4 jam sebelum dilakukan uji proliferasi MTT.

3.8.9 Inkubasi PBMC Dengan Alloy CoCr Yang Telah Direndam Dalam Aquades

Menambahkan larutan *alloy* CoCr yang telah dilakukan perendaman dalam aquades selama 2 hari dan 7 hari pada 3 *well* dari *96-well plate culture* yang telah tersedia dan telah terisi 5×10^4 sel PBMC hingga total volume $200\mu\text{l}$ per *well*. Menginkubasi sel pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO_2 selama 4 jam sebelum dilakukan uji proliferasi MTT.

3.8.10 Inkubasi PBMC Dengan Alloy CoCr Yang Telah Direndam Dalam Saliva Buatan

Menambahkan larutan *alloy* CoCr yang telah dilakukan perendaman dalam saliva buatan yang telah dilakukan perendaman selama 2 hari dan 7 hari pada 3

well dari 96-*well plate culture* yang tersedia dan telah terisi 5×10^4 sel PBMC hingga total volume 200 μ l per *well*. Menginkubasi sel pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO₂ selama 24 jam sebelum dilakukan uji MTT.

3.8.11 Inkubasi PBMC Dengan Alloy CoCr Yang Telah Direndam Dalam Seduhan Kopi Robusta

Menambahkan larutan *alloy* CoCr yang telah dilakukan perendaman dalam seduhan kopi selama 2 hari dan 7 hari pada 3 *well* dari 96-*well plate culture* yang tersedia dan telah terisi 5×10^4 sel PBMC hingga total volume 200 μ l per *well*. Menginkubasi sel pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO₂ selama 24 jam sebelum dilakukan uji MTT.

3.8.12 Inkubasi PBMC Dengan Alloy CoCr Yang Telah Direndam Dalam Saliva Buatan Dan Seduhan Kopi

Menambahkan larutan *alloy* CoCr yang telah yang telah dilakukan perendaman dalam saliva buatan dan seduhan kopi robusta selama 2 hari dan 7 hari pada 3 *well* dari 96-*well plate culture* yang telah tersedia dan telah terisi 5×10^4 sel PBMC hingga total volume 200 μ l per *well*. Menginkubasi sel pada suhu 37°C di 5% kelembapan CO₂ selama 4 jam sebelum dilakukan uji proliferasi MTT.

3.8.13 Uji Proliferasi dengan MTT

- a. Membuang media kultur dan menambahkan masing-masing 50 μ l larutan MTT 7,5mg/ml pada tiap *well* setelah 24 jam inkubasi pada inkubator dengan suhu 37° C yang mengandung 5% CO₂.
- b. Membungkus *plate* dengan aluminium foil dan menginkubasikan *plate* tersebut di tempat gelap.
- c. Menginkubasi *plate* selama 4 jam dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°.
- d. Menghentikan kerja MTT dengan larutan DMSO.
- e. Meletakkan *plate* diatas *plate shaker* selama 30 menit supaya kristal formazan dapat larut.
- f. Menghidupkan ELISA *reader* dan menunggu sampai proses *progressing* selesai.

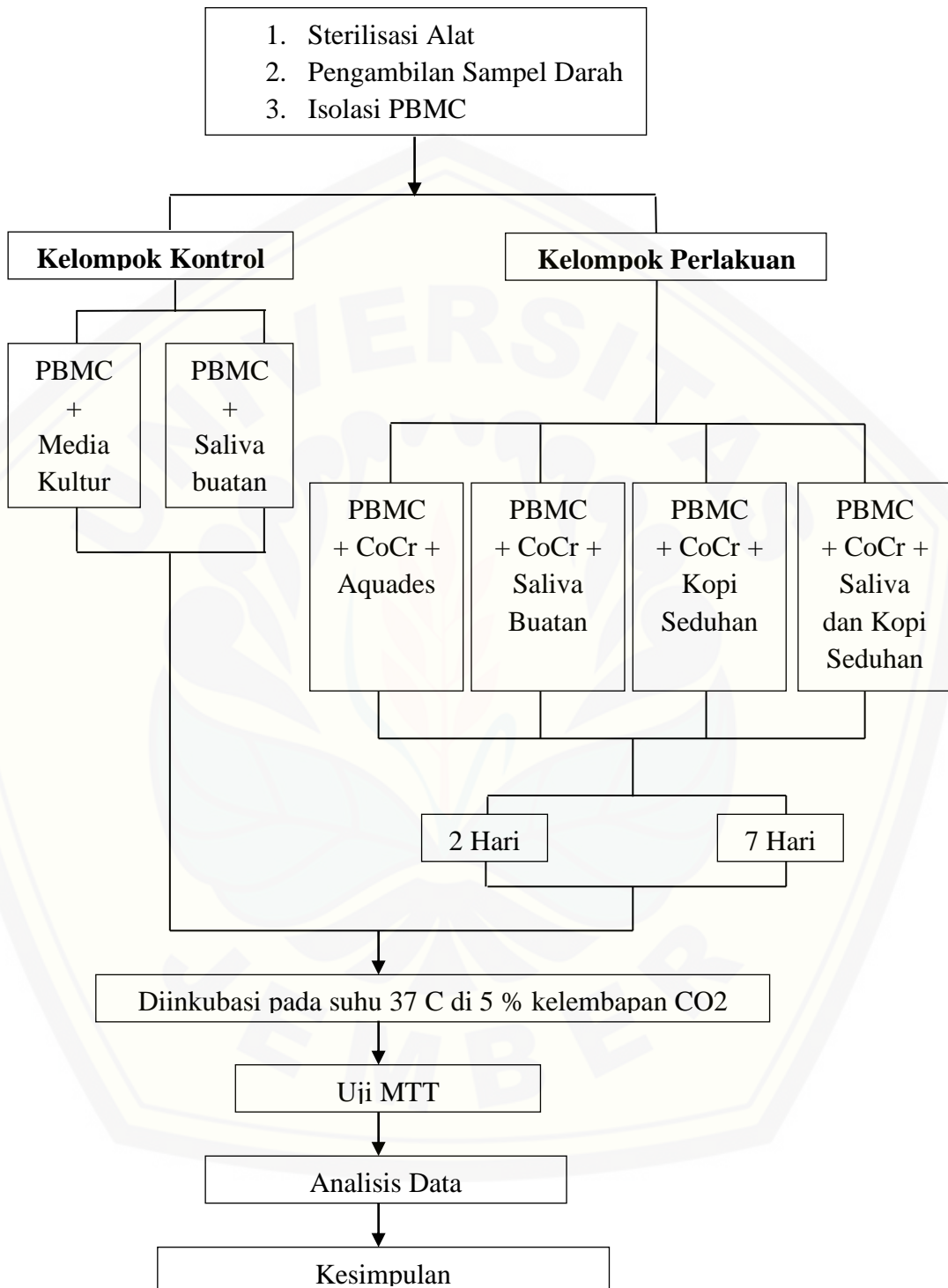
- g. Membuka pembungkus *plate* aluminium foil dan memasukkan *plate* ke dalam ELISA *reader*.
- h. Melakukan pembacaan ELISA dengan *optical density* (OD) 630 nm. Sel tanpa dipapar logam dianggap 100% (CCRC, 2010).
- i. Hasil penghitungan proliferasi dipresentasikan sebagai *Stimulation Index* (SI) (Molae, 2017) :

$$SI = \frac{\text{Mean OD 630 nm dari PBMC yang dipapar} - \text{Mean OD 630 nm dari blank}}{\text{Mean OD 560 PBMC tanpa paparan}}$$

3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian ditabulasi kemudian dianalisis dengan uji normalitas Saphiro wilk dengan ($p \geq 0,05$) dan uji homogenitas dengan uji *Levene test* dengan ($p \geq 0,05$). Data yang terdistribusi normal dan homogen, kemudian dianalisis dengan uji statistik parametrik dengan uji analisa varian dua arah (*Two way Anova* dengan $p \leq 0,05$) menggunakan program statistik *GraphPad Prism Software* version 8.0 (San Diego, CA, USA). $P = 0.05$ dianggap secara statistik signifikan. Data disajikan sebagai mean \pm SD. Data yang diketahui memiliki perbedaan antarkelompok diuji dengan uji *Least Significant Different* (LSD) untuk mengetahui kemaknaan perbedaan antar uji sampel. Apabila data yang dihasilkan tidak terdistribusi secara normal dan homogen maka dilakukan uji non parametrik *Kruskal Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.

3.10 Alur Penelitian



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Pelepasan ion kobalt dari *alloy* CoCr yang direndam dalam seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) pada perendaman 2 hari tidak dapat meningkatkan proliferasi PBMC.
2. Pelepasan ion kobalt dari *alloy* CoCr yang direndam dalam seduhan kopi robusta (*Coffea canephora*) pada perendaman 7 hari dapat meningkatkan proliferasi PBMC.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengukuran konsentrasi ion kobalt minimum yang dapat menyebabkan reaksi hipersensitivitas secara *in vivo* pada pasien.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek konsumsi kopi terutama pada pengguna gigi tiruan cekat dengan *alloy* CoCr terhadap proliferasi PBMC dengan variasi waktu yang lebih lama.

DAFTAR PUSTAKA

- Abramson, S. 2017. Delayed Hypersensitivity Reactions. American Academy of Pediatrics. *E Medicine Articles*.
- Alp, G., G. Çakmakb, M. Sertc dan Y. Burgaz. 2018. *Corrosion Potential In Artificial Saliva And Possible Genotoxic And Cytotoxic damage In Buccal Epithelial Cells Of Patients Who Underwent Ni-Cr Based Porcelain-Fused-To-Metal Fixed Dental Prosthese*. Elseiver : Mutat Res Gen Tox En.
- Ardhy, A., Gunawarman dan J. Affi. 2015. Perilaku Korosi Titanium dalam Larutan Modifikasi Saliva Buatan untuk Aplikasi Ortodontik. *Jurnal Mekanikal*. 6(2): 585-593.
- Arifin, P dan I. Purnawan. 2015. Pengaruh Waktu Perendaman Ekstrak Kopi Untuk Menginhibisi Korosi Pada Besi. *Jurnal Konversi*. 4 (1) : 18.
- ASTM Standards. 2004. ASTM G 31 – 72. *Standard Practice for Laboratory Immersion Corrosion Testing of Metals*. ASTM International West Conshohocken, PA.
- Birben, E., U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, dan O. Kalayci. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*. 5: 9–19.
- Chen, J dan Thyssen, J. 2018. *Metal Allergy*. Switzerland : Springer.
- Chiang, L. C., L. T. Ng, W. Chiang, M. Y. Chang, dan C. C. Lin. 2003. Immunomodulatory Activities of Flavonoids, Monoterpenoids, Triterpenoids, Iridoid Glycosides, and Phenolic Compounds of Plantago Species. *Planta Medical*. 69 : 600 – 604.
- D'Antò, V., Valletta R., Amato, M., Schweikl, H., Simeone, M., Paduano, S., Rengo, S., dan Spagnuolo, G. 2012. Effect of Nickel Chloride on Cell Proliferation. *Open Dentistry Journal*. 6 : 177–181.
- Dewanti, I.D., I.D. Susilawati, P. Lestari, R. Endah, E. Wulandari, R. Budirahardjo, D. Setyorini, dan S. Wibisono. 2019. Robusta Coffee (*Coffea canephora*) Decreasing IL-1 α (Interleukin-1 α) Expression and Increasing the Number of Fibroblasts in Healing Process in Dental Pulp in Wistar Rats. *J. Math. Fund. Sci*. 51 (1) : 68-76.
- Elshahawy dan I. Watanabe. 2014. Biocompatibility Of Dental Alloys Used In Dental Fixed Prosthodontics. *Japan. Tanta Dent J*. 11 (2):150-9.

- Farah, A. 2012. *Coffee Constituents in Coffee : Emerging Health Effects and Disease revention*. First Edition. United Kingdom : Blackwell Publishing Ltd.
- Fatimatuzzahro, N dan R. C. Prasetya. 2018. Efek Kopi Robusta terhadap Profil Lipid Darah Tikus yang Diinduksi Seduhan dan Berat Badan Diet Tinggi Lemak. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 30 (1) ; 7-11.
- Fuyong C., Guang Ling S., Andrej, A. 2016. *Corrosion and Passivation of Magnesium Alloys*. 1st ed. PR China: 422 S. Siming Rd., Xiamen 351005.
- Galo, R., Ribeiro, R., Rodrigues, R., Rocha, L., dan M. Mattos. 2012. Effects of chemical composition on the corrosion of dental *alloys*. *Brazilian Dental Journal*. 23 : 143.
- Hasyim, H. S., Devi L. S., Sumono, A. 2017. Pengaruh Perendaman Kawat Nikel-Titanium Termal Ortodonti dalam Minuman Teh Kemasan terhadap Gaya Defleksi Kawat. *Jurnal Pustaka Kesehatan*. 5(2): 346-351.
- Horrigan, L. A., J. P. Kelly, dan T. J. Connor. 2006. Immunomodulatory effects of caffeine: Friend or foe?. *Elsevier*. 877 – 892.
- Imran, H., Nurdin, dan Nasri. 2016. Pengaruh Konsumsi Kopi Terhadap Penurunan pH Saliva Pada Usia Dewasa. *Jurnal Penelitian Kesehatan Suara Forikes*. 7 (3) : 163 – 164.
- Jia, W., M. W. Beatty, R. A. Reinhardt, T. M. Petro, D. M. Cohen, C. R. Maze, E. A. Strom, dan M. Hoffman. 1999. Nickel Release from Orthodontic Arch Wires and Cellular Immune Response to Various Nickel Concentrations. *J. Biomed Mater Res*. 4(48) : 488 -494.
- Karami, Z., M. Mesdaghi, P. Karimzadeh, M. Mansouri, M. Taghdiri, Z. Kayhanidoost, B. Jebelli, F. Shekarriz, D. Babaie, dan Z. Chavoshzadeh. 2016. Evaluation of Lymphocyte Transformation Test Results in Patients With Delayed Hypersensitivity Reactions following the Use of Anticonvulsant Drugs. *Int Arch Allergy Immunology*. 170 (6) : 160.
- Karnam ,S., A. Reddy, dan M. Manjith. 2012. Comparison of Metal Ion Release From Different Bracket Archwire Combinations: An in Vitro Study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 13 (3) : 77-78.
- Kassapidou, M., V. Stenport, L. Hjalmarsson, dan C. B. Johansson. 2017. Cobalt-Chromium Alloys In Fixed Prosthodontics In Sweden. *Acta Biomater Odontol Scand*. 3 (1) :53-6.

- Kenisa, Y., Istiati, dan W. Setyari. 2012. Effect of Robusta coffee beans ointment on full thickness wound healing. *Dental Journal*. 45 (1) : 53.
- Kettelarij, J., C. Lidén, E. Axén, dan A. Julander. 2013. Cobalt, Nickel and Chromium Release From Dental Tools and Alloys. *Contact Dermatitis*. 70 (1) : 3-4.
- Khotimah, H., E.W.Anggraeni., dan A.Setianingsih. 2017. Karakterisasi Hasil Pengolahan Air menggunakan Alat Destilasi. *Jurnal Chemurgy*.1(2):34-38.
- King, T. 2007. *Elsevier's Integrated Pathology*. Boston : Elsevier.
- Končarević, S., L. Christopher, K. Karsten, P. Thorsten, P. Ian, dan D. Hans. 2014. In-Depth Profiling of the Peripheral Blood Mononuclear Cells Proteome for Clinical Blood Proteomics. *International Journal of Proteomics*. 1-9.
- Kulkarani, E., S. Agrawati, dan A. Anand. 2016. Assesment of Nickel Release From Various Dental Appliances used routinely in Pediatric Dentistry. *Indian Journal Dentistry*. 7 (2) : 81-85.
- Lestari, E., I. Haryanto, dan S. Mawardi. 2009. Konsumsi Kopi Masyarakat Perkotaan dan Faktor-Faktor yang Berpengaruh: Kasus di Kabupaten Jember. *Pelita Perkebunan*. Vol 25 (3) : 216.
- Lages, B., E. Bridi, C. Pérez, dan R. Basting. 2017. Salivary levels of nickel, chromium, iron, and copper in patients treated with metal or esthetic fixed orthodontic appliances: A retrospective cohort study. 45 (7) :189-190.
- Lepora, N. 2006. *The Elements Chromium*. New York : Marshall Cavendish Benchmark.
- Lucchetti, M., G. Fratto, F. Valeriani, E. Vittori, S. Giampaoli, P. Papetti, V. Spica, dan L. Manzon. 2015. Cobalt-chromium alloys in dentistry: An evaluation of metal ion release. *Journal of Prosthet Dent*. 114 (4) : 602-608.
- McKee, A. S., dan A. P. Fontenot. 2016. Interplay of Innate and Adaptive Immunity in Metal-Induced Hypersensitivity. *Current Opinion in Immunology*. 42 : 25-30.
- Molaei, N., G. Mosayebi, A. Pishdadian, M. Ejtehadifar, dan A. Ganj. 2017. Evaluating the Proliferation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using MTT Assay. *Int J Basic Sci Med*. 2(1):25-28.

- Najiyati, S dan Danarti. 2012. *Kopi, Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. PT. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Nejatidanesh, F., O. Savabi, dan A. Yazdanparast. 2005. An Investigation on Metallic Ion Release from Four Dental Casting *Alloys*. *Journal of Dentistry*, Tehran University of Medical Sciences. 2 (4) : 171-172.
- Rachmawati, D., H. J. Bontkes, M. I. Verstege, J. Muris, B. Blomberg, R. J. Scheper, dan I. Hoogstraten. 2013. Transition Metal Sensing by Toll-like receptor-4: Next to Nickel, Cobalt and Palladium are Potent Human Dendritic Cell Stimulators. *Contact Dermatitis*. 68 (6) : 331-338.
- Rachmwawati, D. 2016. *Innate Immune Reactivity to Dental Alloy*. Amsterdam: Vrije Universiteit.
- Rachmawati, D., M. Blomberg, C. Kleverlaan, R. Scheper, dan I. Hoogstraten. 2017. Immunostimulatory capacity of dental casting *alloys* on endotoxin responsiveness. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 117 (5) : 5 - 6.
- Renita, D., S. Rajendran, dan A. Chattree. 2016. Influence of Artificial Saliva on the Corrosion Behavior of Dental Alloys : A review . *Indian Journal of Advances in Chemical Science*. 4(4) : 478-483.
- Roeswahjuni, N., D. Fitriani, dan A. Wardanianti. 2019. The Efficacy Of Green Tea (*Camellia sinensis*) Leaves Extract As Corrosion Inhibitor For Orthodontics Stainless-Steel Wire. *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi*. 4 (1) : 80.
- Suryadinata, A. 2012. Kadar Bikarbonat Saliva Penderita Karies Dan Bebas Karies. *Sainstis*. 1(1) : 35 – 41.
- Pourahmad, J. dan A. Salimi. 2015. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iran Journal Pharmacy*. 14(4) : 979.
- Prihanti, G. 2016. *Pengantar Biostatistik*. Malang: UMM Press.
- Rahardjo, P. 2012. *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Penebar Swadaya: Jakarta.
- Rees , T. 2011. Hypersensitivity to Dental Cast Metals: A Clinical Study. *The Open Pathology Journal*. 5 : 13-22.

- Renita, D., S. Rajendran, dan A. Chattree. 2016. Influence of Artificial Saliva on the Corrosion Behavior of Dental Alloys : A review . *Indian Journal of Advances in Chemical Science*. 4(4) : 478-483.
- Sen, P., E. Kemppainen, dan O. Matej. 2018. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 4(96) : 1- 2.
- Siregar, F. dan B. Hadijono. 2000. Uji Sitotoksitas Dengan Esei MTT. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*. 7 (1) : 28 – 32.
- Snyder, P. 2017. *General pathology 6th edition*. Urbana : Elseiver.
- Souzaa, F., C. Giacomelli, R. Gonçalves, dan A. Spinell. 2012. Adsorption behavior of caffeine as a green corrosion inhibitor for copper. *Materials Science and Engineering*. 32 (8) : 2440.
- Thomas, P., S. Stea, dan S. Usbeck. 2001. *Metal Implant Allergy and Immunological Compatibility Aspects of Ceramic Materials*. Heidelberg : Springer.
- Türkün L dan M. Türkün. 2004. Effect of Bleaching and Repolishing Procedures on Coffee and Tea Stain Removal from Three Anterior Composite Veneering Materials. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*. 16 (5) : 290-301.
- Verhoeckx, K., P. CotterIván, C. Kleiveland, dan A. Mackie. 2014. *The Impact of Food Bioactives on Health*. London : Springer.
- Wahyuningsih, T. 2016. *Pengaruh Intensitas Cahaya Terhadap Keberhasilan Aklimatisasi Embrio Somatik Kopi Robusta (Coffea Canephora Pierre Ex A. Froehner) Secara Langsung*. Bachelor Thesis, Universitas Muhammadiyah Purwokerto.
- Watt, S. 2007. *The Elements Cobalt*. New York : Marshall Cavendish Benchmark.
- Wołowiec, P., Chojnacka, K., Loster, B., dan Mikulewicz, M. 2017. Do Dietary Habits Influence Trace Elements Release from Fixed Orthodontic Appliances. *Biological Trace Element Research*. 180 (2) : 214–222.
- Xuan, L., T. Anwar, H. Kurniawan, R. Ayu, Y. Daud, dan P. Asmara. 2019. Caffeine as A Natural Corrosion Inhibitor for Mild Steel in Nacl Solution. *Journal of Science and Applied Engineering*. 2 (2) : 63.
- Yehmed, F., A. Abdullah, Z. Zainal, dan R. Zawawi. 2018. Green Coffee Bean Extract as a Green Corrosion Inhibitor for Aluminium in Artificial Acid

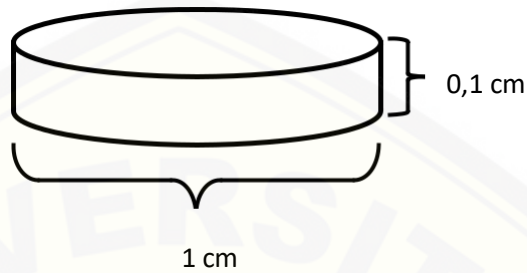
Rain Medium. *International Journal of Applied Environmental Sciences*.
13 (2) : 181.

Yildiz, Y. 2017. *General Aspects of the Cobalt Chemistry*. Pakistan : Intech.



LAMPIRAN A. Pembuatan Spesimen Alloy CoCr

Spesimen pada penelitian ini adalah *alloy* CoCr berpenampang bulat dengan diameter 1 cm dan ketebalan 0,1 cm.



Prosedur pembuatan spesimen *alloy* CoCr

- a. Tahap I, *waxing* merupakan proses pembuatan pola dari malam.
- b. Tahap II, *spruing* merupakan proses pembuatan *sprue pin* dan *casting wax*.
- c. Tahap III, *investing* merupakan proses penanaman pola malam pada *investment*, pada *casting ring*.
- d. Tahap IV, *pre- heating* merupakan proses pemanasan awal pada *casting ring*, agar adonan bahan tanam lebih kering.
- e. Tahap V, *wax- elimination* merupakan proses penghilangan pola malam.
- f. Tahap VI, *heating* merupakan pemanasan *casting ring*.
- g. Tahap VII, *melting* merupakan proses pelelehan logam pada *sprue*.
- h. Tahap VIII, *casting* merupakan tahap pengecoran logam pada ruang cetak (*mould space*).
- i. Tahap IX, *finishing* merupakan tahapan menghilangkan kelebihan dan hasil *casting* yang tidak perlu.

LAMPIRAN B. Perendaman Sampel

- a. Menyiapkan sampel sejumlah 12 *alloy* CoCr berpenampang bulat dengan diameter 1 cm dan ketebalan 0,1 cm.
- b. Menyiapkan 12 larutan perendaman yang sudah ditentukan. Kemudian dilakukan pengukuran tingkat keasaman menggunakan pH meter digital.
- c. Menyiapkan 12 *beaker glass* sesuai dengan sampel.
- d. Mengisi 2 *beaker glass* pertama yang berisi *alloy* CoCr yang direndam dalam aquades sebanyak 100 ml. Menutup *beaker glass* menggunakan aluminium foil dan diberi tanda.
- e. Mengisi 2 *beaker glass* kedua yang berisi *alloy* CoCr yang direndam dalam saliva buatan sebanyak 100 ml. Menutup *beaker glass* menggunakan aluminium foil dan diberi tanda.
- f. Mengisi 4 *beaker glass* kedua yang berisi *alloy* CoCr yang direndam dalam seduhan kopi robusta sebanyak 100 ml. Menutup *beaker glass* menggunakan aluminium foil dan diberi tanda.
- g. Mengisi 4 *beaker glass* terakhir yang berisi *alloy* CoCr yang direndam dalam 100 ml larutan, dengan 50 ml saliva buatan dan 50 ml seduhan kopi robusta. Menutup *beaker glass* menggunakan aluminium foil dan diberi tanda.

LAMPIRAN C. Pembuatan Media Kultur RPMI

Membuat dari sediaan bubuk ke cair (dalam 200 ml aquades steril)

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

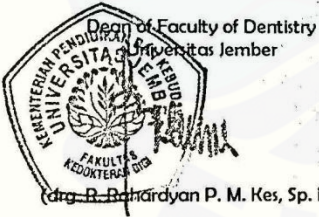
$$180 \times 10,4 = M2 \times 1000$$

$$\frac{180}{1000} \times 10,4 = M2$$

$$\frac{180}{1000} \times 10,4 = 1,87$$

Jadi, berat RPMI yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 1,87 gram bubuk RPMI.

LAMPIRAN D. Ethical Clearance

	<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</p>
<p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL</p>	
<p><u>No.757/UN25.8/KEPK/DL/2019</u></p>	
Title of research protocol :	<p>"Proliferation of Edge Blood Mononuclear Cells (PBMC) Exposed by Cobalt Ions From CoCr Alloy after Soaking in Robusta Cafee (Coffea Canephora) Brewing"</p>
Document Approved :	<p>Research Protocol</p>
Pincipal investigator :	<p>Paramadiva Zefina Putri</p>
Member of research :	<p>-</p>
Responsible Physician :	<p>Paramadiva Zefina Putri</p>
Date of approval :	<p>Desember 2019- Selesai</p>
Place of research :	<p>Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember</p>
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p>	
<p>Jember, December 17th 2019</p>	
 Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember (Drg. R. Bahardyan P. M. Kes, Sp. Pros.)	 Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember (Drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si.)

LAMPIRAN E. Surat Izin Penelitian



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

Nomor : 6323/UN25.8.TL/2019
Perihal : Ijin Penelitian

14 OCT 2019

Kepada Yth
Direktur Rumah Sakit Gigi dan Mulut
Universitas Jember
Di Jember

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

- | | | |
|----|-------------------------|--|
| 1 | Nama | : Paramadiva Zefina Putri |
| 2 | NIM | : 161610101104 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2019/2020 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jalan Baturaden No. 9A, Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Efektivitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>) dalam Menghambat Proliferasi Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC) oleh karena Pelepasan Ion Kobalt |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboratorium Bioscience Fakultas Kedokteran Gigi universitas Jember |
| 8 | Data/alat yang dipinjam | : Inkubator, Centrifuge, dll. |
| 9 | Waktu | : Oktober 2019 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Untuk Menganalisis Efektivitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>) dalam Menghambat Proliferasi Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC) oleh karena Pelepasan Ion Kobalt |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1.drg. Dessy Rachmawati, M.Kes., Ph.D
2.drg. Dewi Kristiana, M.Kes |

Deinikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Dr. Arif Masnur Novita, M.Kes, Sp.OF
NIP. 196811251999032001

LAMPIRAN F. Informed Consent**Informed Consent****SURAT PERSETUJUAN/PENOLAKAN MEDIS KHUSUS**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nada Ocarina Savitri

Jenis Kelamin(L/P) : Perempuan

Umur/Tgl Lahir : 22 tahun / 10 Januari 1998

Alamat : Mastrip 2 No. 12 Jember

Telp : 085330064419

Menyatakan dengan sesungguhnya dari saya sendiri/~~*sebagai orangtua/*suami/*istri/*anak/*wali~~
dari :

Nama :

Jenis Kelamin(L/P) :

Umur/Tgl Lahir :

Alamat :

Telp :

Dengan ini menyatakan SETUJU/~~MENOLAK~~ untuk dilakukan Tindakan Medis :

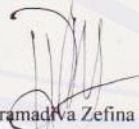
Pengambilan darah sebanyak 21 ml.


Dari penjelasan yang diberikan, telah saya mengerti segala hal yang berhubungan dengan tindakan tersebut, serta kemungkinan pasca tindakan yang dapat terjadi sesuai penjelasan yang diberikan.

Ketua Peneliti

Jember, Februari 2020

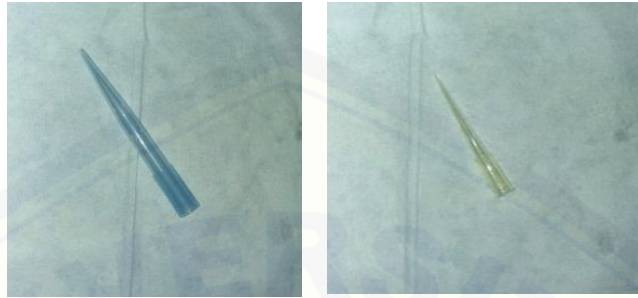
Yang membuat pernyataan,


(Paramadiva Zefina Putri)


(Nada Ocarina Savitri)

*Coret yang tidak perlu

LAMPIRAN G. Alat dan Bahan Penelitian



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



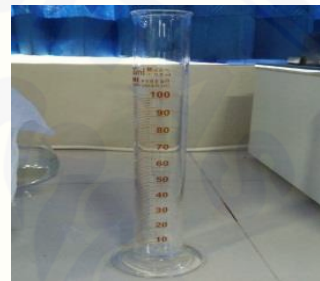
(f)



(g)



(h)



(i)



(j)



(k)



(l)



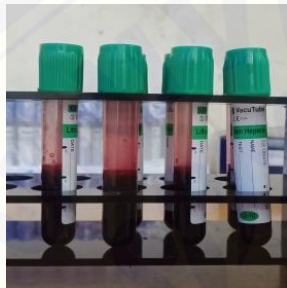
(m)



(n)



(o)



(p)



(q)



(r)



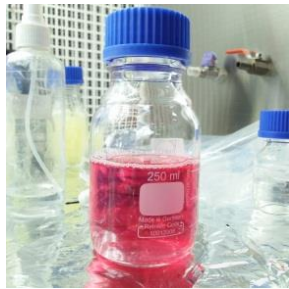
(s)



(t)



(u)



(v)



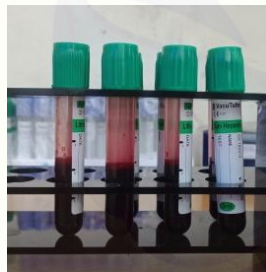
(w)



(x)



(y)



(z)



(aa)

Keterangan :

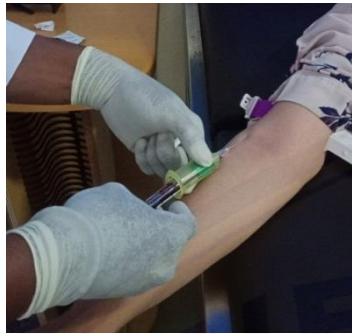
- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> a) Blue dan yellow tip, b) ELISA reader, c) Filter, d) Mikropipet, e) Rak Tabung, f) Syringe, g) Tabung epondorf, h) Timbangan Digital, i) Gelas ukur, j) Tube kecil, k) Centrifuge, | <ul style="list-style-type: none"> o) 96-well plate culture, p) Tabung heparin, q) Tourniquet, r) Larutan MTT, s) Penicilin Streptomycin, t) DMSO, u) Larutan Lymphoprep, v) RPMI w) FBS x) Saliva buatan y) HBSS |
|--|--|

- l) Mikroskop Inverted,
- m) Shaker Incubator,
- n) Vortex mixer,

- z) Darah vena kapiler,
- aa) Larutan hasil perendaman *alloy* CoCr dengan kopi robusta, saliva buatan, aquades dan kopi robusta + saliva buatan.



LAMPIRAN H. Pelaksanaan Penelitian



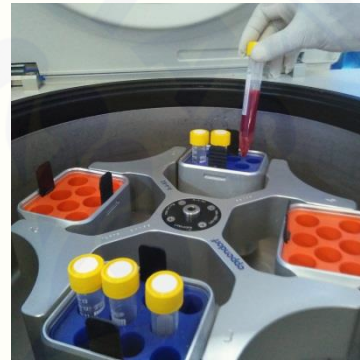
(1)



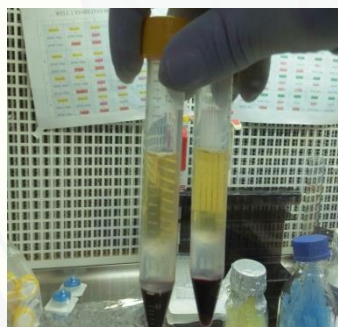
(2)



(3)



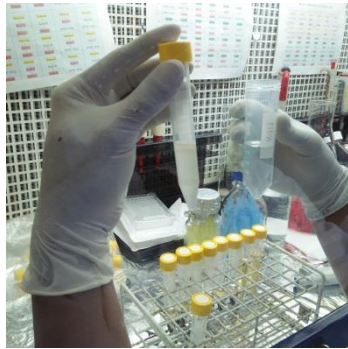
(4)



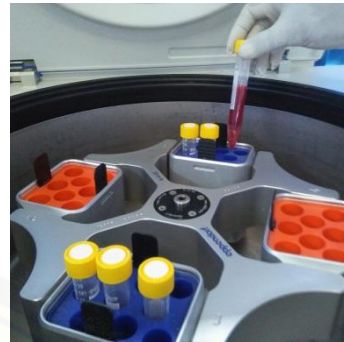
(5)



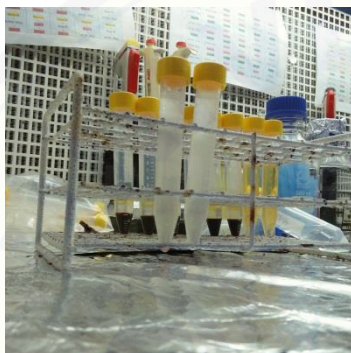
(6)



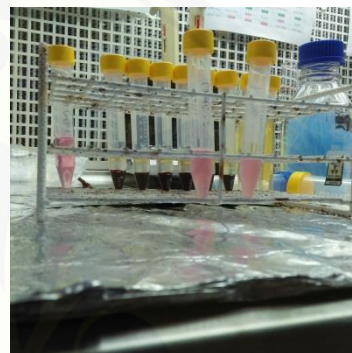
(7)



(8)



(9)



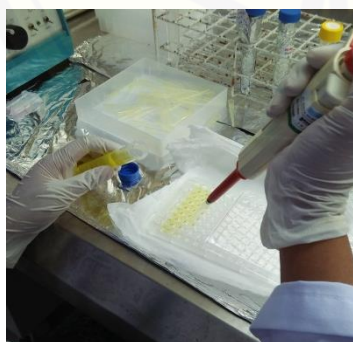
(10)



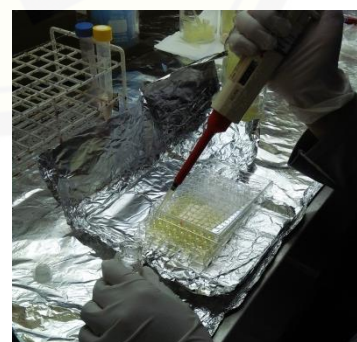
(11)



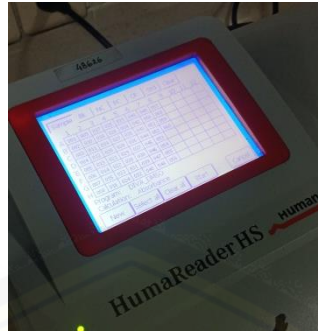
(12)



(13)



(14)



(15)

Keterangan :

- 1) Pengambilan sampel darah dari pendonor sehat,
- 2) Sampel darah dimasukan pada tabung heparin dan diencerkan dengan HBSS,
- 3) *diluent* darah dimasukan pada tabung yang berisi larutan *Lymphoprep*,
- 4) *diluent* darah di sentrifugasi pada *centrifuge*,
- 5) Terbentuk 4 lapisan
- 6) Lapisan ke dua (mononuklear) di pipet,
- 7) Sampel mononuklear diencerkan menggunakan HBSS,
- 8) Sampel disentrifugasi 2 kali,
- 9) Terbentuk 2 lapisan (PBS dan sisa plasma) kemudian lapisan *supernatant* dibuang dan ditambahkan HBSS,
- 10) Media kultur RPMI yang telah berisi *Penicillin streptomycin* dan FBS ditambahkan,
- 11) Media kultur dipipet dalam *well* yang telah berisi PBMC,
- 12) Isolat PBMC dipaparkan dengan hasil rendaman alloy CoCr dalam aquades, saliva buatan, seduhan kopi, dan seduhan kopi + saliva buatan dalam media kultur dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator,
- 13) MTT ditambahkan dalam setiap *well* dan diinkubasi dalam inkubator selama 4 jam,
- 14) Kerja MTT dihentikan dengan larutan DMSO,
- 15) Hasil uji MTT dibaca menggunakan ELISA *reader*

LAMPIRAN I. Analisis Data

G.1 Hasil uji Normalitas *Saphiro Wilk*

kelompok		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
nilai absorbansi	PBMC + Media kultur	,304	3		,907	3	,407
	PBMC + Saliva Buatan	,349	3		,832	3	,194
	PBMC + CoCr + Aquades 2 hari	,253	3		,964	3	,637
	PBMC + CoCr + Aquades 7 hari	,310	3		,898	3	,380
	PBMC + CoCr + Saliva 2 hari	,182	3		,999	3	,935
	PBMC + CoCr + Saliva 7 hari	,339	3		,850	3	,241
	PBMC + CoCr + Kopi Robusta 2 hari	,314	3		,893	3	,363
	PBMC + CoCr + Kopi Robusta 7 hari	,179	3		,999	3	,950
	PBMC + CoCr + Kopi Robusta dan Saliva 2 hari	,361	3		,807	3	,132
	PBMC + CoCr + Kopi Robusta dan Saliva 7 hari	,185	3		,998	3	,925

a. Lilliefors Significance Correction

G.2 Hasil Uji Homogenitas *Levene Test*

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: nilai absorbansi

F	df1	df2	Sig.
2,369	9	20	,052

G.3 Hasil Uji Parametrik *Two-Way Anova Test*

2way ANOVA ANOVA results						
1	Table Analyzed	proliferasi Co				
2						
3	Two-way RM ANOVA	Matching: Both factors				
4	Assume sphericity?	Yes				
5	Alpha	0.05				
6						
7	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
8	Macam Perlakuan	60.66	<.001	***	Yes	
9	Waktu Perendaman	0.7222	.179	ns	No	
10	Macam Perlakuan x Waktu Perendaman	32.35	<.001	***	Yes	
11	Subject x Macam Perlakuan	3.050				
12	Subject x Waktu Perendaman	0.3503				
13	Subject	1.780				
14						
15	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
16	Macam Perlakuan	4.573	5	0.9146	F (5, 10) = 39.79	P<.001
17	Waktu Perendaman	0.05444	1	0.05444	F (1, 2) = 4.124	P=.179
18	Macam Perlakuan x Waktu Perendaman	2.438	5	0.4877	F (5, 10) = 59.50	P<.001
19	Subject x Macam Perlakuan	0.2299	10	0.02299		
20	Subject x Waktu Perendaman	0.02641	2	0.01320		
21	Subject	0.1342	2	0.06711		
22	Residual	0.08196	10	0.008196		
23						
24	Difference between column means					
25	Mean of 2 HARI	0.6061				
26	Mean of 7 HARI	0.8839				
27	Difference between means	-0.07778				
28	SE of difference	0.03830				
29	95% CI of difference	-0.2426 to 0.08702				

G.4 Hasil Uji lanjutan *Least Significant Differences Test* (LSD)

2way ANOVA								
Multiple comparisons								
10	CM+PBMC vs. PBMC+ Saliva Buatan	-0.2600	-0.4247 to -0.09530	Yes	**	.006		
11	CM+PBMC vs. PBMC+Co Aquades	-0.9133	-1.078 to -0.7486	Yes	***	<.001		
12	CM+PBMC vs. PBMC+Co Saliva Buatan	-0.3400	-0.5047 to -0.1753	Yes	***	<.001		
13	CM+PBMC vs. PBMC+Co Kopi Robusta	-1.167	-1.331 to -1.002	Yes	***	<.001		
14	CM+PBMC vs. Row 6	-0.7967	-0.9614 to -0.6320	Yes	***	<.001		
15								
16	7 HARI							
17	CM+PBMC vs. PBMC+ Saliva Buatan	-0.1700	-0.3347 to -0.005297	Yes	*	.044		
18	CM+PBMC vs. PBMC+Co Aquades	-0.5433	-0.7080 to -0.3786	Yes	***	<.001		
19	CM+PBMC vs. PBMC+Co Saliva Buatan	-1.290	-1.455 to -1.125	Yes	***	<.001		
20	CM+PBMC vs. PBMC+Co Kopi Robusta	-0.4900	-0.6547 to -0.3253	Yes	***	<.001		
21	CM+PBMC vs. Row 6	-1.150	-1.315 to -0.9853	Yes	***	<.001		
22								
23								
24	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	N1	N2	t
25								DF
26	2 HARI							
27	CM+PBMC vs. PBMC+ Saliva Buatan	0.02667	0.2867	-0.2600	0.07392	3	3	3.517
28	CM+PBMC vs. PBMC+Co Aquades	0.02667	0.9400	-0.9133	0.07392	3	3	12.36
29	CM+PBMC vs. PBMC+Co Saliva Buatan	0.02667	0.3867	-0.3400	0.07392	3	3	4.600
30	CM+PBMC vs. PBMC+Co Kopi Robusta	0.02667	1.193	-1.167	0.07392	3	3	15.78
31	CM+PBMC vs. Row 6	0.02667	0.8233	-0.7967	0.07392	3	3	10.78
32								
33	7 HARI							
34	CM+PBMC vs. PBMC+ Saliva Buatan	0.07667	0.2467	-0.1700	0.07392	3	3	2.300
35	CM+PBMC vs. PBMC+Co Aquades	0.07667	0.6200	-0.5433	0.07392	3	3	7.350
36	CM+PBMC vs. PBMC+Co Saliva Buatan	0.07667	1.367	-1.290	0.07392	3	3	17.45
37	CM+PBMC vs. PBMC+Co Kopi Robusta	0.07667	0.5667	-0.4900	0.07392	3	3	6.629
38	CM+PBMC vs. Row 6	0.07667	1.227	-1.150	0.07392	3	3	15.56