

Kode/ NamaRumpun Ilmu: 331/ IlmuKedokteran Gigi

**EXECUTIVE SUMMARY**  
**PENELITIAN DOSEN PEMULA**



**EFEK EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea robusta*) TERHADAP  
KEMAMPUAN ADHESI DAN VIABILITAS NEUTROFIL  
YANG DIPAPAR *Porphyromonas gingivalis***

**Peneliti**  
**drg. Tantin Ermawati, M.Kes. 0022038007**

**Dibiayai oleh**  
**DIPA Universitas Jember Tahun Anggaran 2013**  
**No. DIPA-023.04.2.414995/2013**

**UNIVERSITAS JEMBER**  
**DESEMBER, 2013**

## **EXECUTIVE SUMMARY**

Judul : Efek Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*)  
Terhadap Kemampuan Adhesi dan Viabilitas  
Neutrofil Yang Di papar *Porphyromonas gingivalis*

Peneliti/Pelaksana  
Nama Lengkap : drg. Tantin Ermawati, M.Kes  
NIDN : 0022038007  
Sumber Dana : DIPA Universitas Jember  
Diseminasi : belum ada  
Alamat surel (e-mail) : tantin.ermawati@gmail.com  
Perguruan Tinggi : Universitas Jember

Fakultas kedokteran Gigi Universitas Jember

Jember, 23 Desember 2013  
Ketua,

drg. Tantin Ermawati, M.Kes  
NIP. 198003222008122003

**EFEK EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea robusta*)  
TERHADAP  
KEMAMPUAN ADHESI DAN VIABILITAS NEUTROFIL  
YANG DIPAPAR *Porphyromonas gingivalis***

**Tantin Ermawati**  
**Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember**

**Abstract**

**Background** . The new paradigm that has been developed for the treatment of periodontal infection is host modulation therapy, therapy aimed at improving the immune response. Infection therapy which has been used only aim to kill the bacteria without regard to the balance of the host response. Therefore, it is necessary to develop a drug therapy to improve the resilience of neutrophils in fighting bacterial infections . **Purpose** . This study is aimed to potential of Robusta coffee bean extract in modulating the adhesion of *P. gingivalis* on neutrophils as well as its effect on the viability of neutrophils exposed to *P. gingivalis* . **Method** . Experimental studies in vitro using isolated neutrophils samples from human peripheral venous blood . 1) Test the adhesion of *P. gingivalis* in neutrophils. Neutrophil suspension coated on plastic micro plates ( 24 wells ) were given a cover slip , and incubated robusta coffee bean extract concentration of 100 % , 50 % , 25 % , as control neutrophils incubated RPMI . Furthermore, neutrophils exposed to *P. gingivalis*  $3 \times 10^8$  CFU / ml . Fixation with methanol and Giemsa dye staining and counting the adhesion of *P. gingivalis* in neutrophils microscopically. 2) Test the viability, in brief neutrophil suspensions were divided into four test groups ie , incubated robusta coffee bean extract concentration of 100 % , 50 % , 25 % and as control neutrophils incubated RPMI . Incubation was performed for 18 hours in a roller tool . Furthermore, neutrophils exposed to a suspension of *P. gingivalis*  $3 \times 10^8$  CFU / ml and incubation was 1 hour, then test the viability of using trypane blue dye. Neutrophils were viable (living) does not absorb trypane blue so it looks clear or transparant, while the dead neutrophils trypane absorbs blue color. **Results** a). Neutrophil adhesion smallest in group IV (coffee extract 100 % ) , b). Viability of neutrophils are most often found in group III (50 % coffee extract). **Conclusion**. Robusta coffee bean extract can reducing the amount of adhesion *P. gingivalis* on neutrophils as well as increasing the number of neutrophils in cell viability.

Keywords: adhesion, viability, neutrophils, *P.gingivalis*, robusta coffee beans

**Pendahuluan**

*Paradigma baru yang berkembang saat ini pada terapi penyakit infeksi periodontal adalah menggunakan host modulator terapi, yakni untuk memperbaiki respon imun host terhadap infeksi bakteri. Respon imun yang baik sangat diperlukan*

dalam meningkatkan fungsi fagositosis dalam hal ini diperankan oleh sel neutrofil, monosit dan makrofag yang bertugas sebagai garis pertahanan pertama melawan infeksi bakteri. Salah satu bakteri penyebab infeksi periodontal adalah *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)<sup>1</sup>.

Respon imun yang berperan pertama kali terhadap invasi bakteri adalah neutrofil. Adanya adhesi bakteri terhadap neutrofil, menyebabkan neutrofil mengeluarkan substansi mikrobisidal dengan menghancurkan membran bakteri serta memfagosit bakteri. Sebuah neutrofil dapat memfagosit 3 sampai 20 bakteri sebelum sel itu menjadi inaktif atau lisis. Proses fagositosis yang terjadi dapat berdampak pada lisisnya neutrofil. Hal ini bisa menimbulkan akibat yang sangat fatal karena apabila neutrofil lisis maka komponen kimia serta enzim-enzim ini pecah ke jaringan akan menimbulkan kerusakan berbagai molekul organik jaringan sekitarnya.<sup>2</sup> Saat ini di Indonesia banyak dikembangkan penelitian tentang tanaman yang bermanfaat sebagai obat, diantaranya adalah biji kopi Robusta. Biji kopi robusta secara alami mempunyai kandungan seperti kafein, senyawa fenolik, trigonellin dan asam klorogenik yang memiliki aktifitas antibakteri.<sup>3</sup> Berdasarkan latar belakang di atas maka peneliti ingin mengembangkan tanaman biji kopi robusta sebagai obat untuk host modulator terapi yaitu untuk mempertahankan kelangsungan hidup neutrofil dengan melihat tingkat adhesi bakteri terhadap neutrofil dan viabilitas sel neutrofil terhadap *P. gingivalis* yang diberi ekstrak biji kopi robusta yang nantinya dapat bermanfaat untuk mencegah infeksi jaringan periodontal rongga mulut.

### ***Bahan dan Metode***

Penelitian dilakukan secara eksperimental *in vitro* dengan rancangan *post test only control group design*. Variabel bebas adalah ekstrak biji kopi konsentrasi 100%, 50% dan 25%. Variabel tergantung adalah 1) indeks adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil dan 2) viabilitas neutrofil.

#### **a. Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta**

Ekstrak biji kopi diperoleh dengan memblender biji kopi robusta kering hingga menjadi serpihan kecil dan dilakukan maserasi dalam larutan etanol 97%. Setelah itu sampel disaring menggunakan pompa vakum dan dipekatkan menggunakan *rotary*

evaporator dan diperoleh ekstrak pekat 100% . Kemudian ekstrak biji kopi robusta dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 100%, 50% serta 25%.

#### **b. Kultur murni *P.gingivalis***

*P.gingivalis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Jember. Kultur dilakukan pada media BHI-B yang diperkaya dengan 10 µl vit K, 50 µl hemin dan 50 µl yeast ekstrak dalam tabung reaksi dan diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Selanjutnya dilakukan pengenceran dan diukur absorbansinya menggunakan standart Mc.farland 0,5, absorbansi 0,05 dengan panjang gelombang 560 menggunakan *spectrophotometer*

#### **c. Uji adhesi neutrofil**

Penelitian dilakukan secara eksperimental in vitro menggunakan sampel isolat neutrofil yang diisolasi dari darah vena peripheral manusia. 1) Uji adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil. Suspensi neutrofil dilapiskan dalam *plastic micro plate* (24 wells) yang di dalamnya telah diberi cover slip, kemudian diinkubasi dengan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 100%, 50%, 25% dan sebagai kontrol adalah neutrofil diinkubasi dengan RPMI. Selanjutnya neutrofil dipapar suspensi *P. gingivalis* 3x10<sup>8</sup> CFU/ml dan diinkubasi selama 1 jam. Setelah itu medium dibuang dicuci 2 kali dengan HBSS dan dilakukan fiksasi dengan methanol dan pengecatan dengan *Giemsa dye*. Setelah itu dilakukan penghitungan adhesi *P. gingivalis* pada neutrofil secara mikroskopis.

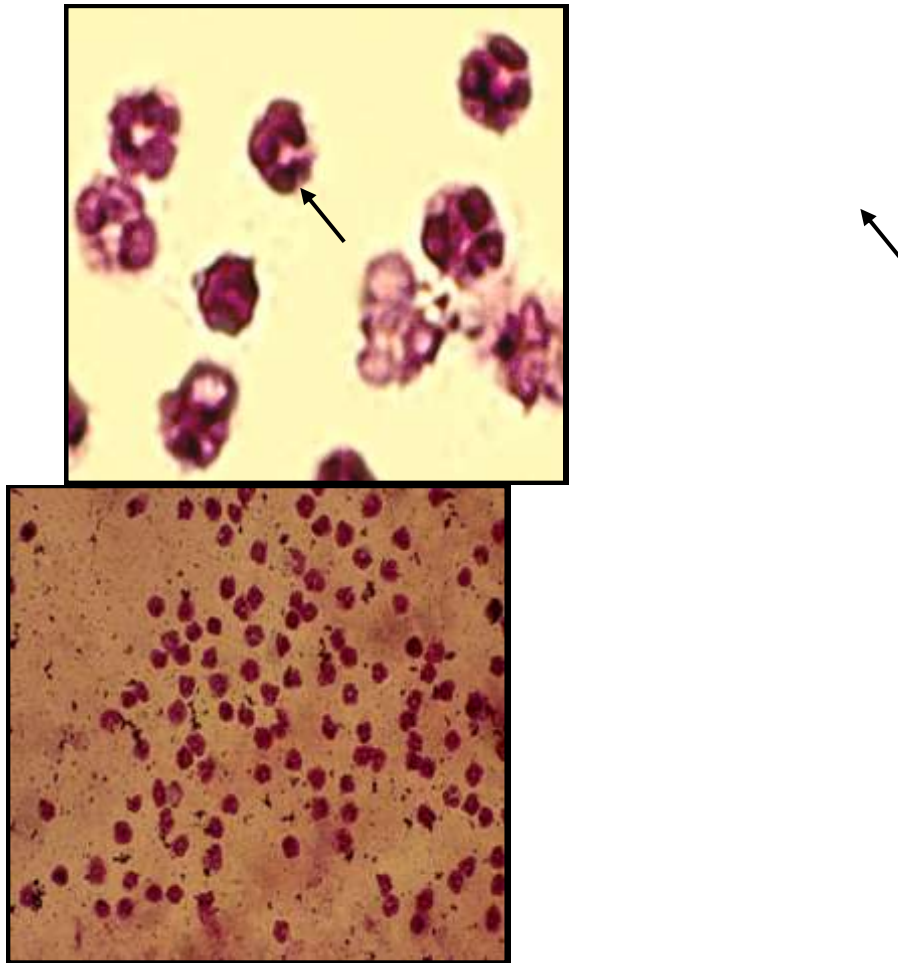
#### **d. Uji Viabilitas Neutrofil**

Uji viabilitas, secara ringkas, suspensi neutrofil dibagi menjadi 4 kelompok uji yakni, diinkubasi ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 100%, 50%, 25% dan sebagai kontrol adalah neutrofil diinkubasi dengan RPMI. Inkubasi dilakukan selama 18 jam dalam alat roler. Selanjutnya netrofil dipapar suspensi *P. gingivalis* 3x10<sup>8</sup> CFU/ml dan inkubasi selama 1 jam, kemudian dilakukan uji viabilitas menggunakan *trypane blue dye*. Pengamatan viabilitas neutrofil dilakukan menggunakan hemositometer diamati di bawah mikroskop inverted dengan pembesaran 400 kali. Neutrofil yang viable (hidup) tidak menyerap *trypane blue* sehingga tampak bening atau transparan, sedangkan neutrofil yang mati menyerap warna biru *trypane blue*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Isolasi Neutrofil

Penelitian di lakukan di laboratorium Bio Science Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Penelitian ini menggunakan sampel berupa isolat netrofil yang diisolasi dari darah orang sehat. Hasil isolasi neutrofil dapat dilihat pada gambar berikut



Gambar 1. Preparat hasil isolasi netrofil. Menunjukkan netrofil yang berwarna pink keunguan(Pengecatan Giemsa, pembesaran 400x), tampak bentukan polimorfonuklear, yaitu nukleus yang memiliki lobus-lobus), sehingga nucleus tampak lebih dari satu (ditunjukkan dengan anak anah)

### 2 Hasil Uji Adhesi Neutrofil

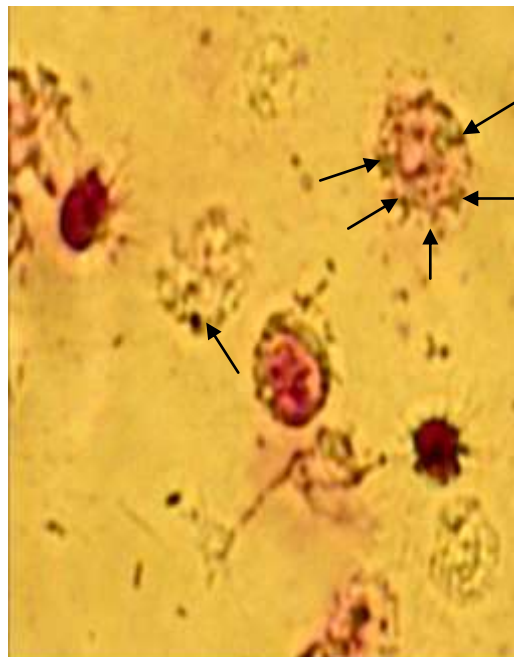
Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa adhesi *P. gingivalis* terhadap sel neutrofil pada kelompok kontrol mempunyai jumlah yang lebih banyak dibandingkan pada kelompok lain yang diinkubasi dengan ekstrak biji kopi 25%, 50% dan 100%. Pada kelompok perlakuan (ekstrak 100%) rata-rata adhesi bakteri

lebih sedikit dibandingkan kelompok perlakuan 25% dan 50%. Hal ini dapat dilihat pada Table 1

**Tabel 1. Rata-rata adhesi *P.gingivalis* pada neutrofil antara kelompok kontrol dan perlakuan**

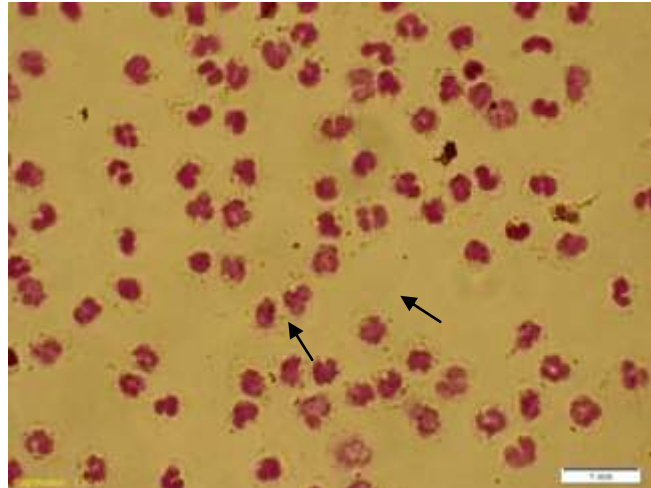
Adhesi <i>P. gingivalis</i> pada Neutrofil				
Kelompok kontrol	Kelompok I (ekstrak kopi 25%)	Kelompok II (ekstrak kopi 50%)	Kelompok III (ekstrak kopi 100%)	
<b>X±SD</b> 9,06 ± 0,55	8,38 ± 0,45	6,09 ± 0,57	0,68 ± 0,43	

Gambaran adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil yang tidak diikubasi dengan ekstrak biji kopi (kontrol) dapat ditunjukkan pada Gambar 2. Pada gambar tersebut terlihat bahwa jumlah *P. gingivalis* yang menempel pada sel neutrofil sangat banyak. Hal ini menyebabkan sel neutrofil menjadi lisis yang berakibat pada kematian sel neutrofil.



Gambar 2. Adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil ditunjukkan dengan anak panah, sel neutrofil mengalami lisis yang ditandai kerusakan dinding sel (Pembesaran 1000x).

Pada kelompok perlakuan didapatkan jumlah bakteri yang menempel pada sel neutrofil lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.3 berikut ini:



Gambar 3 Adhesi *P. gingivalis* pada sel neutrofil pada kelompok perlakuan (ekstrak biji kopi). Anak panah menunjukkan jumlah bakteri yang menempel pada sel neutrofil

Untuk melihat adanya perbedaan jumlah adhesi bakteri, maka sebelumnya dilakukan uji normalitas data untuk dapat dilanjutkan analisis menggunakan one way anova. Berdasarkan hasil analisis didapatkan bahwa data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) (Tabel 3). Setelah data yang diperoleh terdistribusi normal, maka dilanjutkan uji one way anova untuk melihat perbedaan jumlah adhesi pada kelompok perlakuan. Berdasarkan Tabel 5.3 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan diantara kelompok perlakuan ( $p < 0,05$ ).

**Tabel.3 Uji One Way Anova**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	130.076	3	43.359	280.623	.000
Within Groups	1.236	8	.155		
Total	131.312	11			

Berdasarkan analisis data one way anova didapatkan perbedaan yang signifikan, oleh karena itu dilanjutkan uji LSD untuk mengetahui perbedaan pada setiap kelompok perlakuan.

**Tabel .4 Rangkuman Hasil uji LSD Adhesi *P.gingivalis* pada sel Neutrofil**

Kelompok	I	II	III	IV
I		0,673	2,970*	8,380*
II			2,296*	7,706*



III				5,41*
IV				

Keterangan : \* : Bermakna

Kelompok I : Neutrofil dipapar *P.gingivalis* tanpa inkubasi ekstrak biji kopi

Kelompok II : Neutrofil dipapar *P.gingivalis* + diinkubasi ekstrak biji kopi 25%

Kelompok III : Neutrofil diinkubasi *P.gingivalis* +inkubasi ekstrak biji kopi 50%

Kelompok IV :Neutrofil diinkubasi *P.gingivalis* +inkubasi ekstrak biji kopi 100%

Berdasarkan uji LSD didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan diantara kelompok perlakuan, kecuali antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 25% (II) didapatkan perbedaan yang tidak signifikan ( $p>0,05$ ).

### 3. Hasil Uji Viabilitas Neutrofil

Data hasil uji viabilitas neutrofil yang dipapar dengan *P.gingivalis* dan diinkubasi dengan ekstrak biji kopi robusta dapat dilihat pada Tabel 5.5.

**Tabel 5 Rata-rata viabilitas neutrofil antara kelompok kontrol dan perlakuan**  
Adhesi *P.gingivalis* pada Neutrofil

	Kelompok kontrol	Kelompok I (ekstrak kopi 25%)	Kelompok II (ekstrak kopi 50%)	Kelompok III (ekstrak kopi 100%)
<b>X±SD</b>	60,31± 3,19	26,89± 2,45	37,49 ± 2,17	29,67 ± 0,66

Keterangan:

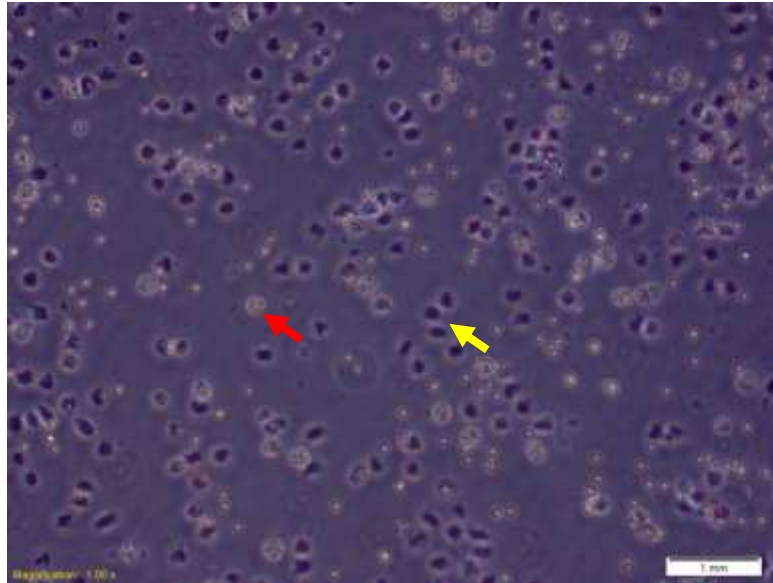
Kelompok I : Neutrofil + Medium komplet

Kelompok II : Neutrofil dipapar *P.gingivalis* + diinkubasi ekstrak biji kopi 25%

Kelompok III : Neutrofil diinkubasi *P.gingivalis* +inkubasi ekstrak biji kopi 50%

Kelompok IV :Neutrofil diinkubasi *P.gingivalis* +inkubasi ekstrak biji kopi 100%

Berdasarkan Tabel diatas dapat diketahui bahwa diantara kelompok perlakuan dengan ekstrak biji kopi robusta yang mempunyai kemampuan hidup (viabel) adalah kelompok II (neutrofil yang dipapar *P.gingivalis* dan diinkubasi dalam ekstrak 50%), sedangkan pada konsentrasi ekstrak 100% jumlah sel viabel mengalami penurunan. Penghitungan tiap sampel menggunakan hemositometer yang dilihat dengan mikroskop inverted, sehingga didapatkan gambar sebagai berikut



Gambar 4 a. Sel neutrofil yang viabel (hidup) menghasilkan warna terang (anak panah merah), b. sel neutrofil yang mati menyerap warna menjadi gelap (anak panah kuning).

Analisis terhadap viabilitas neutrofil yang dilakukan pertama kali adalah melihat homogenitas dan normalitas data. Berdasarkan data yang diperoleh diketahui bahwa signifikansi ( $p < 0,05$ ) sehingga data yang diperoleh tidak homogen sehingga dilakukan uji non parametrik kruskal wallis dan dilanjutkan uji man whitney untuk melihat adanya perbedaan antar kelompok perlakuan.

**Tabel 6 Hasil Uji Kruskal Wallis viabilitas neutrofil**

Chi-Square	df	Asymp. Sig.
9,842	3	0,020

Hasil Kruskal Wallis menunjukkan nilai  $p < 0,05$ , hal ini berarti terdapat perbedaan yang signifikan jumlah viabilitas neutrofil pada keempat kelompok perlakuan. Selanjutnya dilanjutkan uji Mann Whitney untuk melihat perbedaan pada tiap-tiap kelompok perlakuan.

**Tabel 7. Rangkuman Hasil uji LSD Adhesi *P.gingivalis* pada sel Neutrofil**

Kelompok	I	II	III	IV
I		0,00*	0,00*	0,00*
II			0,00*	1,50*
III				0,00*

IV				
----	--	--	--	--

Berdasarkan data diatas dapat dilihat adanya perbedaan antar tiap kelompok, kecuali pada kelompok (II-IV) mempunyai nilai yang tidak signifikan ( $p>0,05$ ).

## **Pembahasan**

### **1. Adhesi neutrofil**

Penelitian yang telah dilakukan terhadap adanya adhesi bakteri *P.gingivalis* pada sel neutrofil yang dipapar ekstrak biji kopi robusta menunjukkan nilai adhesi terbesar adalah pada kelompok perlakuan II (ekstrak kopi 25%) dibandingkan kelompok perlakuan yang lain, dan adhesi yang terendah adalah kelompok IV (ekstrak biji kopi 100%). Tingkat adhesi pada kelompok kontrol mempunyai nilai yang paling tertinggi di bandingkan dengan semua kelompok perlakuan, hal ini kemungkinan karena tidak adanya kandungan bahan lain yang mampu mencegah perlekatan bakteri terhadap sel neutrofil seperti yang dimiliki oleh ekstrak biji kopi.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fardiaz menunjukkan bahwa biji kopi robusta mempunyai kandungan kafein, senyawa fenolik, trigonelline, dan asam khlorogenik yang mempunyai aktivitas antibakteri. Salah satu kandungan kopi yang juga berperan sebagai antibakteri adalah kafein dengan jumlah 1,6-2,4 % didalam biji kopi robusta.<sup>4</sup> Hal ini didukung oleh penelitan Ferrazano yang menyatakan bahwa kafein yang ada dalam biji kopi mempunyai daya anti adhesi yang tertinggi terhadap bakteri.<sup>5</sup>

Selain kandungan kafein, biji kopi robusta juga mempunyai kandungan senyawa fenol yang berperan sebagai anti bakteri. Senyawa fenol merupakan flavonoid yang terdapat dalam biji kopi yang mempunyai aktivitas merusak dinding sel bakteri melalui perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk kedalam inti sel bakteri.<sup>6</sup>

Kandungan flavonid yang terdapat pada biji kopi juga memiliki efek antiinflamasi dengan cara mengikat protein dan menurunkan hidrofobisitas pada membran sel inang dan bakteri.<sup>7</sup> *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri yang mempunyai fimbrie dan hemaglutini yang berfungsi sebagai hidrofobin yang bertanggung jawab terhadap interaksi bakteri dengan protein pada membrane

neutrofil yang relative hidrofob. Flavonoid ini yang dapat menurunkan hidrofobisitas dan berperan dalam menurunkan adhesi bakteri pada sel neutrofil.

## **2 Viabilitas Neutrofil**

Pada penelitian yang dilakukan terhadap viabilitas neutrofil yang telah dipapar *P. gingivalis* dan diinkubasi dengan ekstrak biji kopi menunjukkan bahwa prosentase sel yang viabel (hidup) tertinggi diantara kelompok perlakuan dijumpai pada kelompok perlakuan III (inkubasi dengan ekstrak biji kopi 50%). Sedangkan prosentase yang paling rendah didapatkan pada kelompok perlakuan II (ekstrak 25%). Pada kelompok kontrol jumlah sel neutrofil yang viabel jumlahnya paling tinggi dibandingkan kelompok perlakuan lain, hal ini disebabkan karena pada kelompok kontrol tidak dilakukan pemaparan *P. gingivalis*, jadi sel neutrofil hanya diberi media pertumbuhan M199, sehingga sel neutrofil lebih banyak yang viable (hidup).

Kandungan biji kopi yang berperan sebagai antibakteri salah satunya adalah kafein, yang mempunyai kemampuan untuk dapat menangkal radikal bebas dan menghancurkan molekul yang dapat merusak sel DNA.<sup>8</sup> Viabilitas sel dipengaruhi oleh adanya radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Radikal bebas menyerang molekul stabil yang terdekatnya dan mengambil elektron, sehingga zat yang terambil elektronnya akan menjadi tidak stabil. Peningkatan jumlah radikal bebas ini menyebabkan terjadinya suatu keadaan dimana tingkat oksigen reaktif intermediate (ROI) yang toksik melebihi pertahanan antioksidan endogen yang disebut stres oksidatif. Stres oksidatif menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang merusak membran sel, lipoprotein dan struktur sel lainnya yang mengandung lipid. Kerusakan membran sel mengakibatkan aktivitas biokimia dalam sel terganggu, sehingga sel tidak mampu dalam mempertahankan kehidupannya.<sup>9,10,11</sup>

Penelitian tentang viabilitas neutrofil yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan IV (inkubasi ekstrak 100% menunjukkan angka penurunan viabilitas dibandingkan kelompok II dan kelompok III. Hal ini diduga bahwa pada konsentrasi ekstrak biji kopi 100% merupakan jumlah konsentrasi yang sudah bersifat toksik, sehingga banyak sel yang mengalami kematian.

Berdasarkan penelitian diatas dapat disimpulkan adanya kemampuan ekstrak biji kopi robusta terhadap adhesi dan viabilitas neutrofil. Uji adhesi dan viabilitas neutrofil ditujukan untuk memperbaiki sel host terhadap suatu jejas dari luar. Sehingga ekstrak biji kopi yang mempunyai kemampuan untuk mencegah adhesi *P gingivalis* terhadap neutrofil nantinya dapat dijadikan dasar pembuatan bahan topikal di rongga mulut yang mempunyai peranan sebagai immunomodulator host.

#### **DAFTAR PUSTAKA**

1. Carranza, F., Newman M., Takei H., dan Klokkevoold, P. 2006. *Clinical periodontology. 10<sup>th</sup> edition. Philadelphia: WB Saunders*
2. Nussbaum, G., Shapira, L. 2011. *How Has Neutrophil Research Improved Our Understanding of Periodontal Pathogenesis?. J. Clin Periodontol.38 (Suppl. 11)49-59*
3. Fardiaz, S. 1995. Antimicrobial Activity of Coffee (Coffee Robusta) Extract. *Asean Food J. 10 (3)*
4. Widyotomo, S. dan Sri, M. 2007. *Kafein: Senyawa penting pada Biji Kopi. Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Vol. 23 No.1*
5. Ferrazzano, Amato, Ingenito, Natale, and Pollio 2009. Anti-Cariogenic Effect of Polyphenols from Plant Stimulant Beverages (Cocoa, Coffee, Tea). *J. Fitoterapia.80:252-282*
6. Gunawan, I.W.A . 2009. Potensi Buah Pare (*momordica carantia L*) Sebagai antibakteri *Salmonella typhimurium*. Denpasar : Program Studi Pendidikan Biologi fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Mahasaraswati
7. Hamsafir, E. 2010. Teh Dapat Menghambat Pembentukan Karies Gigi.[serialonline].<http://www.infogigi.com/kesehatan-gigi/teh-dapat-menghambat-pembentukan-karies-gigi.html>. [1 Juni 2011]
8. Harmandini, F. 2009. Manfaat Kopi Untuk mencegah Berbagai Macam Penyakit Female *kompas[SerialOnline].http://female.kompas.com/read/2009/07/27/11533750/Manfaat Kopi untuk Mencegah Berbagai.Penyakit. [17 April 2011].*
9. Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Yogyakarta: Kanisius*
10. Baskin, S.I. dan Salem, H.1997. *Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals.Washington: Taylor and Francis.*
- 11 Shafie, F.M. 2011. *Hubungan Radikal Bebas Dan Antioksidan Terhadap Penyakit Periodontal. Skripsi. Medan. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sumatra Utara*