



**EFEK KONSUMSI KOPI TERHADAP PEMBENTUKAN LESI
ATEROSKLEROSIS KORONER PADA MODEL
TIKUS PERIODONTITIS**

SKRIPSI

Oleh
Christian Agung Prasetya
131610101080

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**EFEK KONSUMSI KOPI TERHADAP PEMBENTUKAN LESI
ATEROSKLEROSIS KORONER PADA MODEL
TIKUS PERIODONTITIS**

SKRIPSI

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

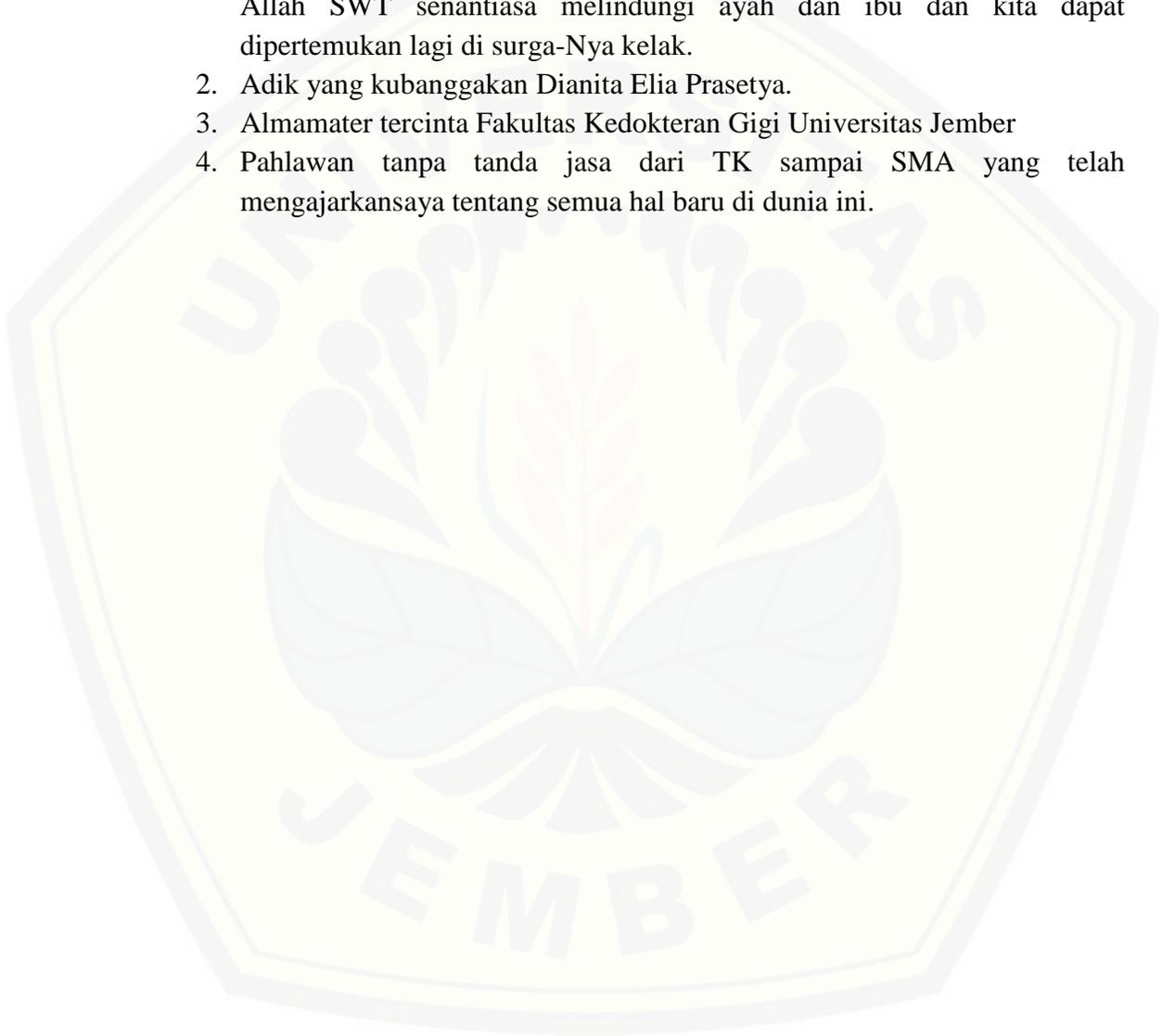
Oleh
Christian Agung Prasetya
131610101080

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Dengan nama Allah Yang Maha Pengasih dan Penyayang, kupersembahkan karya ini untuk:

1. Ibundaku tercinta Sri puji rahayu yang telah rela mengabdikan seluruh hidupnya untuk keluarga kecil kami dan Ayahanda tersayang Ranu Puspo Wiboso yang selalu berusaha agar aku tak kurang suatu apapun. Semoga Allah SWT senantiasa melindungi ayah dan ibu dan kita dapat dipertemukan lagi di surga-Nya kelak.
2. Adik yang kubanggakan Dianita Elia Prasetya.
3. Almamater tercinta Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
4. Pahlawan tanpa tanda jasa dari TK sampai SMA yang telah mengajarkansaya tentang semua hal baru di dunia ini.



MOTTO

*Try not to become a man of success, but rather try to become
a man of value. ^{*)}*



^{*)} Albert Einstein.

PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Christian Agung Prasetya

NIM : 131610101080

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Konsumsi Kopi Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Koroner Pada Model Tikus Periodontitis” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

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

Jember, 1 Februari 2017

Yang menyatakan

Christian Agung Prasetya
NIM 131610101080

SKRIPSI

**EFEK KONSUMSI KOPI TERHADAP PEMBENTUKAN LESI
ATEROSKLEROSIS KORONER PADA MODEL
TIKUS PERIODONTITIS**

Oleh
Christian Agung Prasetya
131610101080

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes
Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Nuzulul Hikmah, M. Biomed

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Konsumsi Kopi Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Koroner Pada Model Tikus Periodontitis” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 1 Februari 2017

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

drg. Abdul Rochim, M.Kes, M.M.R
NIP. 195804301987031002

drg. Rudy Joelijanto, M. Biomed
NIP.197207151998021001

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Dr. drg. I. D. A. Susilawati, M. Kes
NIP. 196109031986022001

drg. Nuzulul Hikmah, M. Biomed
NIP. 198107172008012017

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

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

RINGKASAN

Efek Konsumsi Kopi terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Koroner pada Model Tikus Periodontitis. Christian Agung Prasetya. 131610101080; 2017; 70 Halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Aterosklerosis merupakan proses patologis kompleks yang mengacu pada pembentukan plak ateroma pada lumen pembuluh darah. Aterosklerosis yang terjadi pada pembuluh koroner akan terjadi Penyakit Jantung Koroner (PJK) yang merupakan penyakit yang paling mematikan di dunia, termasuk juga di Indonesia. Proses inflamasi dan stress oksidatif memiliki peranan penting dalam patogenesis aterosklerosis dan pada saat ini terdapat paradigma yang dihubungkan dengan periodontitis. Diperlukan suatu bahan yang memiliki potensi dalam penghambatan pembentukan lesi aterosklerosis dan salah satunya yang memiliki potensi tersebut adalah kopi. Terdapat dua tipe kopi yang memiliki senyawa bioaktif yang berpotensi yaitu kopi robusta dan kopi arabika. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi efek konsumsi kopi arabika dan robusta terhadap pembentukan lesi aterosklerosis koroner pada model tikus periodontitis.

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimen laboratoris dengan rancangan *the post test only control group design*. Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Obyek penelitian adalah tikus wistar jantandengan 4 tikus dalam tiap kelompok dan Hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok secara acak, yaitu: kelompok I merupakan kelompok kontrol, kelompok II merupakan kelompok periodontitis, kelompok III merupakan kelompok periodontitis dan kopi robusta, dan kelompok IV merupakan kelompok periodontitis dan kopi arabika.

Pembuatan model tikus periodontitis dilakukan dengan cara injeksi 0,05 ml *Porphyromonas gingivalis* dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml pada area sulkus gingiva distobukal gigi molar pertama rahang bawah kiri dengan pengulangan injeksi tiga kali dalam seminggu selama 28 hari dan pemasangan *Wire ligature* berdiameter 0,5 mm dibentuk menyerupai huruf U sehingga dapat dipasang memeluk mesial pada

gigi molar kiri rahang bawah. Periodontitis dilihat melalui penampakan foto klinis dan foto radiografi terhadap resorpsi tulang alveolar. Kopi yang digunakan merupakan kopi murni yaitu kopi arabika dan kopi jenis produksi perkebunan kopi PTPN XII ijen. Pembuatan seduan kopi dengan cara mencampurkan air panas 100° C sebanyak 200 ml dengan 12 gram kopi yang di aduk secara merata. Sondase tikus dilakukan setiap hari selama 28 hari sebanyak 0.6 ml yang telah konversikan setara dengan satu cangkir kopi pada manusia.

Prosedur penelitian dimulai dengan masa adaptasi tikus selama seminggu. Kemudian tikus dipasangkan *wire ligature*, injeksi *P.gingivalis*, dan sondase kopi selama 28 hari. Pada hari ke-29, tikus dikorbankan dengan dianastesi kloroform dan kemudian difiksasi untuk dilakukan pengambilan organ jantung. Pengambilan organ jantung untuk mendapatkan arteri koroner yang kemudian di simpan dalam larutan PBS formalin 10%. Pemotongan jaringan pada penelitian ini menggunakan metode Potongan beku (*Frozen section*). Pewarnaan jaringan menggunakan *Picrosirius Red* dan *Sudan IV*. Pengamatan jaringan menggunakan mikroskop dan optilab.

Parameter aterosklerosis dalam penelitian ini adalah ketebalan dinding pembuluh darah (*Intima-media Thickness -IMT*), disintegrasi kolagen intimal, dan disintegrasi endotel. Pengecatan *Picrosirius Red* digunakan untuk mengamati ketebalan dinding pembuluh darah dengan satuan mikrometer (μm) pada perbesaran 400x dan ada tidaknya disintegrasi kolagen pada perbesaran 1000x. Sedangkan pengecatan *Sudan IV* digunakan untuk mengamati ada tidaknya disintegrasi endotel. Data yang ketebalan dinding yang diperoleh kemudian di uji homogenitas dan uji normalitas, kemudian uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar kelompok. Dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference (LSD)* membandingkan antara kelompok. Hasil pengamatan disintegrasi endotel dan disintegrasi kolagen intimal dinyatakan dalam persentase.

Data pengukuran ketebalan arteri menunjukkan data yang homogen dan normal. Hasil uji statistik *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan hasil ketebalan dinding arteri koroner yang signifikan. Berdasarkan uji *LSD*, kelompok kopi arabika dan kelompok kopi robusta didapatkan perbedaan yang

signifikan terhadap kelompok kontrol dan kelompok periodontitis. Sedangkan pada kelompok kopi arabika dibandingkan dengan kelompok robusta tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Penelitian ini telah menunjukkan bahwa konsumsi kopi robusta dan arabika dapat menghambat terjadinya penebalan dinding arteri. Hasil pengamatan disintegrasi kolagen intimal dan disintegrasi endotel, yaitu pada kelompok kopi robusta dan kelompok kopi arabika memiliki presentase yang lebih rendah dibandingkan kelompok periodontitis.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah konsumsi kopi menghambat pembentukan lesi aterosklerosis koroner pada model tikus periodontitis. Namun, penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan sehingga dibutuhkan studi lanjut untuk menyempurnakan pemahaman mengenai derajat keparahan periodontitis terhadap pembentukan lesi aterosklerosis, derajat inflamasi sistemik terhadap pembentukan lesi aterosklerosis, dan kandungan tertentu dalam kopi yang lebih spesifik dalam menghambat pembentukan lesi aterosklerosis, serta dosis kopi, lama pemberian konsumsi kopi, dan jenis kopi lain yang digunakan dalam penelitian.

PRAKATA

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “Efek Konsumsi Kopi Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Koroner Pada Model Tikus Periodontitis”. Skripsi ini disusun dalam rangka menyelesaikan pendidikan Strata 1 (S1) Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penulis menyadari dalam pembuatan skripsi ini tidak luput dari kekurangan. Dibutuhkan peran dari berbagai pihak sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Tidak lupa pula penulis mengucapkan terimakasih sedalam-dalamnya kepada:

1. drg. R Rahardyan Parnaadji, M.Kes. Sp.Pros selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. Dr. drg. I. D. A. Susilawati, M. Kesselaku Dosen Pembimbing Utamayang telah memberikan ilmu, bimbingan, saran dan motivasi serta penuhkesabaran membimbing saya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan denganbaik;
3. drg. Nuzulul Hikmah, M. Biomedselaku Dosen Pembimbing Pendampingyang telah memberikan ilmu, bimbingan, saran dan motivasi serta penuh kesabaran membimbing saya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan denganbaik;
4. drg. Abdul Rochim, M.Kes, M.M.R selaku Dosen Penguji Ketuata telah banyakmemberi masukan demi kesempurnaan skripsi ini;
5. drg. Rudy Joelijanto, M. Biomedselaku Dosen Penguji Anggotatelah banyakmemberi masukan demi kesempurnaan skripsi ini;
6. Proyek HiKom Kementrian Ristek dan Dikti tahun 2016 yang diketuai oleh Dr. drg. I.D.A Susilawati, M. Kes ;
7. drg. Lusi Hidayati, M. Kes selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing saya selama perkuliahan selama ini;

8. Teman dalam segala hal, amel, terimakasih untuk setiap semangat yang di berikan kepadaku :
9. Teman-teman proyek penelitian “*Pejuang Ateros*” 2016;
10. Teman-teman FKG angkatan 2013;
11. Seluruh staf dan civitas akademika FKG Universitas Jember yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini;

Karya ini masih jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharapkan saran dan kritikan dari berbagai pihak sehingga skripsi ini dapat menjadi lebih baik. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan kontribusi lebih untuk kemajuan ilmu pengetahuan di masa yang akan datang.

Jember, 1Februari 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Periodontitis.....	5
2.1.1. Etiologi.....	5
2.1.2. Patogenesis Periodontitis.....	6
2.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	6
2.2.1 Klasifikasi	6
2.2.2 Metabolisme.....	7
2.3 Arteri Koroner	7

2.4. Aterosklerosis	9
2.4.1. Faktor Resiko Aterosklerosis	9
2.4.2. Patogenesis Aterosklerosis	10
2.5 Hubungan Periodontitis dan Ateroklerosis	13
2.6 Kopi	14
2.5.1 Komposisi dalam Kopi	14
2.5.2 Bioaktivitas dalam Kopi	16
2.7 Hubungan Kopi dan Aterosklerosis	20
2.8 Kerangka Konsep Penelitian	22
2.9 Hipotesis Penelitian	23
BAB 3. METODE PENELITIAN	24
3.1 Jenis Penelitian	24
3.2 Rancangan Penelitian	24
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	24
3.3.1. Tempat Penelitian	24
3.3.2. Waktu Penelitian	24
3.4. Identifikasi Penelitian	25
3.4.1 Variabel Bebas	25
3.4.2 Variabel Terikat	25
3.4.3 Variabel Terkendali	25
3.5. Definisi operasional	25
3.5.1 Periodontitis	25
3.5.2 Konsumsi Kopi	25
3.5.3 Lesi Aterosklerosis	26
3.6. Obyek Penelitian	27
3.6.1. Kriteria Obyek Penelitian	27
3.6.2. Besar Sampel dan Kelompok Penelitian	27
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	28
3.7.1. Alat-Alat	28
3.7.2. Bahan	29

3.8 Prosedur Penelitian	29
3.8.1. Persiapan Penelitian	29
3.8.2. Persiapan Kelompok Hewan Coba.....	29
3.8.3. Persiapan Bahan Perlakuan	29
3.8.4. Pelaksanaan Penelitian	30
3.8.5. Pengambilan Jantung.....	31
3.8.6. Pemrosesan Jaringan	31
3.8.7. Tahap Pengamatan	34
3.9 Analisis Data	35
3.10 Alur Penelitian	36
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1. Hasil Penelitian	37
4.1.1 Periodontitis Pada Tikus.....	37
4.1.2 Pengukuran Ketebalan Arteri Koroner	37
4.1.3 Pengamatan Disintegrasi Kolagen Intimal	38
4.1.4 Pengamatan Disintegrasi Endotel.....	38
4.2. Pembahasan	39
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	46
5.1. Kesimpulan	46
5.2. Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	50

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi Kimia dari Kopi Arabika dan Kopi Robusta.....	15
Tabel 4.1 Ketebalan Arteri (<i>intima-media thickness</i>) Koroner Tikus yang diberi Konsumsi Kopi	38
Tabel 4.2 Hasil Uji LSD pada Ketebalan arteri (<i>intima-media thickness</i>) koroner tikus.....	38
Tabel 4.3 Pengamatan disintegrasi kolagen intimal dan disintegrasi endotel pada arteri koroner tikus yang diberi konsumsi kopi.....	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Gambaran Histologi dari Arteri Koroner dengan Pewarnaan <i>Hematoxylin and Eosin-stained</i>	8
Gambar 2.2 Tahapan dalam Pembentukan Lesi Aterosklerosis.....	10
Gambar 2.3 Interaksi Antara Metalloproteinase dan Regulator (Aktivator dan Inhibitor).....	12
Gambar 2.3 Struktur Kimia Kafein.....	16
Gambar 2.4 Struktur Kimia <i>Chlorogenic acid</i>	17
Gambar 2.5 Struktur Kimia <i>Ferulic acid</i>	18
Gambar 2.6 Struktur Kimia <i>Caffeic acid</i>	19
Gambar 2.7 Struktur Kimia <i>Cafestol</i> dan <i>Kahweol</i>	19
Gambar 2.8 Kerangka Konsep.....	22
Gambar 3.1 Gambaran Histologi Aterosklerosis.....	26
Gambar 3.2 Alur Penelitian.....	36
Gambar 4.1 Pengukuran Ketebalan Dinding Arteri (<i>intima-media thickness</i>) dengan Pengecatan <i>Picrosirius Red</i> 400x.....	37
Gambar 4.2 Pengamatan Disintegrasi Kolagen Intimal Arteri koroner Tikus dengan Pengecatan <i>Picrosirius Red</i> 400x dan 1000x.....	40
Gambar 4.3 Pengamatan Disintegrasi Endotel Arteri Koroner Tikus Dengan Pengecatan <i>Sudan IV counter stain Hematoxilin</i> 400x dan 1000x.....	41

Daftar Lampiran

A. <i>Ethical Clearance</i>	53
B. Identifikasi bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i>	54
C. Surat Identifikasi Bakteri	55
D. Alat dan Bahan Penelitian.....	56
E. Prosedur Penelitian	60
F. Hasil foto klinis dan radiografis mandibula kiri tikus.....	61
G. Data Hasil Penelitian.....	62
H. Hasil Uji Statistik.....	67
I. Surat Ijin Penelitian.....	69

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Aterosklerosis merupakan proses patologis kompleks yang mengacu pada pembentukan plak ateroma pada lumen pembuluh darah (Libby *et al.*, 2011). Jika terjadi aterosklerosis di pembuluh koroner maka akan terjadi Penyakit Jantung Koroner (PJK) yang merupakan penyakit yang paling mematikan di dunia (Becket *et al.*, 2004; Ross, 2004). Data WHO menyatakan, dari 17,3 juta kematian akibat penyakit jantung, serangan jantung bertanggung jawab untuk 7,3 juta kematian dan stroke bertanggung jawab untuk 6,2 juta kematian (WHO, 2008). Sedangkan prevalensi penyakit jantung di Indonesia 0,5% yang terdiagnosis dokter dan nilai ini jauh meningkat pada kasus yang tidak terdiagnosis (Risikesdas, 2013).

Faktor resiko aterosklerosis bersifat multifaktorial yang dapat disebabkan oleh berbagai rangsangan seperti dislipidemia, hipertensi dan inflamasi sistemik. Rangsangan tersebut menyebabkan perubahan paralel dalam permeabilitas endotel dan komposisi matriks ekstraselular endotel sehingga memudahkan masuk dan retensinya *low-density lipoprotein* (LDL) pada dinding arteri (Libby *et al.*, 2011). Proses inflamasi memiliki peranan penting dalam patogenesis aterosklerosis dan pada saat ini terdapat paradigma baru tentang faktor resiko aterosklerosis yaitu terdapat hubungan antara aterosklerosis dan periodontitis yang juga didasari proses inflamasi (Bartova *et al.*, 2014).

Periodontitis dapat disebabkan oleh bakteri yang terdapat pada jaringan periodontal dan dapat dengan mudah masuk ke dalam sirkulasi darah sehingga memicu respon inflamasi vaskuler dan sistemik. Bakteri yang berpotensi menyebabkan hal tersebut adalah *Porphyromonas gingivalis*. Faktor virulensi pada *P. gingivalis* seperti reseptor membran luar yang spesifik, adhesin, lipopolisakarida (LPS) dan produk ekstraseluler yang dapat menyebabkan inflamasi sistemik (Mysak *et al.*, 2014). Proses inflamasi sistemik yang terjadi dapat mempengaruhi sel endotel,

metabolisme lemak, dan koagulasi darah yang dapat meningkatkan resiko terjadinya aterosklerosis (Bartova *et al.*, 2014).

Inflamasi sistemik memainkan bagian penting dalam patofisiologi aterosklerosis dan komplikasinya. Inflamasi juga dapat meningkatkan produksi stress oksidatif yaitu *reactive oxygen species* (ROS). Peningkatan inflamasi secara sistemik juga meningkatkan faktor adhesi pada permukaan endotel. Proses ini merupakan langkah awal dari pembentukan lesi aterosklerosis. (Spagnoli *et al.*, 2007)

Terjadinya stress oksidatif dan inflamasi secara terus-menerus akan mengakibatkan bioavailabilitas dari *nitric oxide* (NO) pada endotel menurun. Hal tersebut menyebabkan terjadinya disintergrasi endotel yaitu disfungsi sel endotel yang diikuti oleh apoptosis sel, sehingga mengakibatkan disintegrasi fungsional dan struktural dari lapisan sel endotel (Fliser *et al.*, 2011).

Disintegrasi endotel dapat meningkatkan permeabilitas vaskuler sehingga memungkinkan penetrasi LDL pada dinding pembuluh darah. Teroksidasi LDL (LDL_{ox}) yang disebabkan oleh ROS akan memicu perekrutan sel pro-inflamasi (monosit dan mediator lainnya). Aktivasi monosit menjadi makrofag akan menyebabkan terbentuknya *foam cell* dengan penyerapan LDL_{ox}. Kemudian, inflamasi yang terjadi juga meningkatkan proliferasi *smooth muscle cells* (SMC) dan pelepasan *metalloproteinase* (MMP) yang mendegradasi serat kolagen sehingga terjadi disintegrasi kolagen intimal pembuluh darah (Fonsesca *et al.*, 2014). Penumpukan *foam cell* dan proliferasi SMC secara terus-menerus dapat menyebabkan penebalan dinding pembuluh darah dan terbentuknya plak aterosklerosis (Andrew *et al.*, 2009; Vogiatzi *et al.*, 2009; Spagnoli *et al.*, 2007).

Parameter dalam identifikasi terhadap aterosklerosis sangatlah beragam. Penelitian terhadap kadar lipid dalam darah dan tingkat inflamasi sistemik melalui *C-reactive protein*, serum fibrinogen dan leukosit telah banyak dilakukan (Deric *et al.*, 2008). Parameter histologis dari lesi aterosklerosis juga banyak diteliti, yaitu penebalan dinding pembuluh darah, disintegrasi kolagen intima, disintegrasi endotel, ateroma, stenosis, dan deposisi lipid (Nafilah *et al.*, 2015).

Saat ini dibutuhkan bahan yang dapat mengatasi stress oksidatif dan inflamasi yang merupakan proses patologis aterosklerosis. Salah satu bahan alami yang memiliki potensi antibakteri, antiinflamasi dan antioksidan adalah kopi. Potensi antioksidan pada kopi dihubungkan dengan kandungan *caffeic acid*, *cafestol*, *kahweol*, *chlorogenic acids* (CGAs), *ferulic acids*, kafein, *melanoidim*, dan *trigonelline* (Hall *et al.*, 2015; Buscemi *et al.*, 2014; Yukawa *et al.*, 2004).

Kandungan CGAs dan *caffeic acid* pada kopi mempunyai banyak manfaat, yaitu sebagai antibakteri, antiinflamasi dan juga antioksidan (Lou *et al.*, 2011). Senyawa CGAs memiliki potensi sebagai antiinflamasi karena dapat mengurangi sekresi sitokin proinflamasi *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α), *Interleukin 1 beta* (IL-1 β), *Interleukin-6* (IL-6) dan berpotensi sebagai antioksidan karena menghambat terjadinya reaksi oksidasi dari ROS dengan cara melakukan donor atom hidrogen (Liang *et al.*, 2015). Dalam penelitian lain, Kafein tidak mempengaruhi tingkat lipid serum dan tekanan darah, namun sebaliknya, kafein secara signifikan mengurangi pembentukan lesi aterosklerosis dengan bertindak sebagai antioksidan (John *et al.*, 2012). Kandungan *ferulic acid*, *melanoidim*, dan *trigonelline* dalam kopi juga memiliki potensi dalam menghambat peroksidasi lipid, sehingga dapat mencegah terjadinya aterosklerosis (Hall *et al.*, 2015; Buscemi *et al.*, 2014). Potensi kopi juga didukung dengan penelitian eksperimental pada tikus model periodontitis yang diberikan konsumsi kopi jenis robusta yang dapat melindungi arteri koroner dari pembentukan aterosklerosis (Susilawati *et al.*, 2014).

Fenomena adanya hubungan antara periodontitis dengan aterosklerosis serta potensi kopi serta jenis kopi lain seperti kopi arabika dalam pencegahan aterosklerosis belum banyak diteliti. Hal tersebut yang mendorong peneliti untuk melakukan penelitian tentang efek konsumsi kopi terhadap pembentukan aterosklerosis pada model tikus periodontitis.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat pembentukan lesi aterosklerosis pada tikus model periodontitis yang diberikan konsumsi kopi?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi efek konsumsi kopi arabika dan robusta terhadap pembentukan lesi aterosklerosis koroner pada model tikus periodontitis.

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengidentifikasi efek konsumsi kopi robusta dan kopi arabika terhadap pembentukan lesi aterosklerosis pada model tikus dengan injeksi *P. gingivalis* yang meliputi ketebalan dinding arteri koroner, disintegrasi kolagen intimal, dan disintegrasi endotel.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan pengetahuan tentang efek konsumsi kopi terhadap pembentukan lesi aterosklerosis koroner yang disebabkan oleh periodontitis.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar dalam melakukan baik tindakan untuk menurunkan mortalitas penderita aterosklerosis.
3. Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk pengembangan penelitian-penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Periodontitis

Periodontitis merupakan suatu penyakit peradangan jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh kelompok organisme tertentu sehingga mengakibatkan kerusakan progresif ligamen periodontal dan tulang alveolar, ditandai dengan pembentukan poket, resesi, atau keduanya. Periodontitis dikenal sebagai *bacterial inflammatory disease*, yaitu suatu infeksi mikroba yang merangsang respon inflamasi pada jaringan periodontal dan mengakibatkan kerusakan jaringan pendukung gigi. Proses ini ditandai dengan adanya destruksi perlekatan gingiva, kehilangan tulang alveolar, migrasi *junctional epithelium* kearah apikal dan pembentukan saku periodontal (Newman *et al.*, 2012).

2.1.1 Etiologi

Sulkus gingiva memiliki anatomi yang unik, dikelilingi oleh jaringan keras dan jaringan lunak. Pada sulkus gingiva, terdapat hingga 700 spesies bakteri dalam jumlah yang bervariasi, sekitar 10^3 bakteri dalam sulkus yang sehat dan $>10^8$ bakteri keadaan patologis. Beberapa bakteri yang selaras dengan *host*, namun bakteri tertentu dapat mengganggu homeostasis bakteri-*host* (Ji *et al.*, 2015).

Kolonisasi bakteri yang terjadi pada sulkus gingival sangat ditentukan oleh pembentukan biofilm plak. Pada tahap awal kolonisasi, protein saliva, termasuk *sialylated mucins*, *proline-rich protein*, *α -amylase* dan *salivary agglutinin* membentuk pelikel pada permukaan gigi dan menyediakan reseptor untuk adhesin bakteri. Bakteri utama, seperti *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* dan *Streptococcus sanguinis*, memiliki adhesin yang dapat mengenali reseptor saliva sehingga mengakuisisi pelikel dan dapat memberikan reseptor untuk penjajah sekunder, seperti *Actinomyces naeslundii*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens*, *Haemophilus parainfluenzae* dan *Veillonella atypica*. Pada akhir kolonisasi terdapat *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* dan *Tannerella forsythia*, Ketiga spesies ini sangat

terkait dengan kerusakan periodontal dan merupakan bakteri patogen periodontal (Ji *et al.*, 2015; Mysak *et al.*, 2014).

2.1.2 Patogenesis Periodontitis

Lipopolisakarida (LPS) dari dinding *P. gingivalis* dianggap sebagai antigen oleh tubuh host dan dihadang oleh sistem imun seperti monosit dan makrofag. Makrofag berperan sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) pada awal invasi, kemudian APC mengikat antigen dan mengekspresikan ke permukaan agar dikenali oleh limfosit T *helper*. Limfosit T *helper* akan mengaktifkan limfosit B dan limfosit T sitotoksik untuk mengeliminasi antigen. Pada proses eliminasi antigen tersebut terjadi pengaktifan respon inflamasi dan pelepasan sitokin yang berdampak pada kerusakan jaringan periodontal, pembentukan poket patologis, kerusakan ligamen periodontal dan kerusakan tulang alveolar. Selain itu produk LPS dari *P. gingivalis* dapat beredar secara sistemik melalui pembuluh darah, dalam kondisi kronis infeksi *P. gingivalis* dapat menyebabkan respon inflamasi secara sistemik dan merusak jaringan lainnya (Hajishengallis, 2015; Ji *et al.*, 2015).

2.2 *Porphyromonas gingivalis*

2.2.1 Klasifikasi

Secara taksonomi, *P. gingivalis* diklasifikasikan sebagai berikut (Olsen *et al.*, 1999) :

Kingdom	: Bacteria
Superphylum	: Bactroidetes/Chlorobi group
Phylum	: Bacteroidetes
Class	: Bacteroides
Ordo	: Bacteroidales
Family	: Porphyromonadaceae
Genus	: <i>Porphyromonas</i>
Species	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>

2.2.2 Metabolisme

Porphyromonas gingivalis adalah bakteri yang banyak berperan dalam terjadinya periodontitis. Asam amino dan sejumlah produk metabolit yang dihasilkannya bakteri ini bersifat racun terhadap jaringan periodontal dimana hasil dari metabolisme tersebut bersifat basa sehingga dapat menyebabkan terjadinya karang gigi.

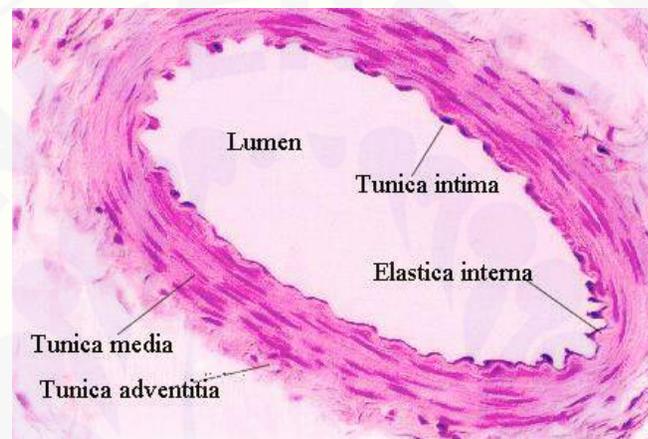
Porphyromonas gingivalis dapat bertahan dan melawan pertahanan *host* dengan faktor virulensi yang dimiliki, seperti LPS, reseptor membran luar yang spesifik, adhesin, dan produk ekstraselular (Mysak *et al.*, 2014). LPS dari *P.gingivalis* menginduksi dan melepaskan sel-sel radang, seperti ROS dan dapat menyebabkan reaksi berantai dan menghasilkan senyawa radikal bebas baru (Mysak *et al.*, 2014). Adhesin memfasilitasi *P.gingivalis* untuk tumbuh di sel *host*, salah satunya adalah fimbria. Fimbria merupakan faktor penting yang memediasi interaksi antara organisme dengan jaringan *host*. Fimbria *P.gingivalis* berperan dalam proses invasi ke sel *host* dan mengganggu signal sel melalui *matrix extracellular* (Mysak *et al.*, 2014).

Produk ekstraselular yang berperan penting dalam faktor penyebab terjadinya penyakit periodontal adalah *cysteine proteases*. Enzim ini berperan dalam merusak jaringan periodontal dan mengganggu mekanisme pertahanan melalui degradasi imunoglobulin dan faktor komplemen yang menyebabkan penyakit berkembang (Mysak *et al.*, 2014).

2.3 Arteri Koroner

Arteri koroner adalah arteri berukuran sedang yang merupakan pembuluh darah dalam organ jantung yang berfungsi menyuplai makanan bagi sel-sel jantung. Arteri koroner kanan dan kiri yang mendistribusikan darah ke otot jantung. Apabila arterosklerosis mempengaruhi pembuluh darah ini maka penamaan penyakit menjadi aterosklerosis koroner (Libby *et al.*, 2011). Susunan dasar arteri koroner adalah tunika intima, tunika media, dan tunika adventisia seperti pada gambar 2.1.

Komponen yang membentuk dinding pembuluh darah adalah serat kolagen dan elastin, dan sel-sel otot polos yang dapat diamati secara histologis. Kolagen merupakan bagian penting penyusun dari lapisan intima. Mayoritas dari dinding arteri merupakan protein kolagen tipe 1, III, dan IV. Kolagen tipe I dan III mewakili sekitar 90% dari total kolagen pembuluh darah. Secara umum kolagen tipe 1 dan III merupakan penyusun dalam semua tiga lapisan dinding arteri, dan secara khusus ditemukan dalam intima dari plak aterosklerosis (Zoumi *et al.*, 2004)



Gambar 2.1 Gambaran histologi dari arteri koroner dengan pewarnaan *hematoxylin and eosin-stained* (childs, 2014).

Berikut adalah penjelasan dari susunan-susunan dari pembuluh darah:

1. Tunika intima (tunika interna) sebagai lapisan dalam yang terdiri dari selapis sel-sel endotel. Di bawah lamina endotel terdapat jaringan ikat yang sangat tipis, tidak jelas disebut lamina subendotel. Pada lamina subendotel dijumpai serabut-serabut elastik yang tampak kurang jelas. Pada batas tunika intima dengan tunika media serabut-serabut elastik kelihatan lebih jelas, bergelombang dengan arah sirkuler disebut sebagai membrana elastika internal oleh karena serabut-serabut elastik ini tebal dan merupakan membrana.
2. Tunika media adalah lapisan serabut otot polos yang mempunyai arah sirkuler dengan susunan serabut-serabut yang rapat dan diantaranya terdapat serabut-serabut elastik. Lapisan ini jauh lebih tebal dibanding dengan tunika intima (dua kali tebal tunika intima).

3. Tunika adventitia menyelubungi tunika media dari sebelah luar adalah jaringan ikat fibro elastik yang lebih tipis dari tunika media. Sebagai batas tunika media dan tunika adventitia cukup jelas kelihatan lamina elastika eksterna, tetapi tidak setebal dan sejelas lamina elastika interna (Eroschenko, 2008; Suryodoyo, 2002).

2.4 Aterosklerosis

Aterosklerosis berasal dari bahasa Yunani, yaitu *atero* dan *sklerosis*. Kata *atero* atau *atera* berarti suatu bentuk yang menunjukkan degenerasi lemak atau berhubungan dengan ateroma, sedangkan *sklerosis* berarti indurasi dan pengerasan, seperti pengerasan karena peradangan atau pembentukan jaringan ikat yang meningkat (Dorland, 2006).

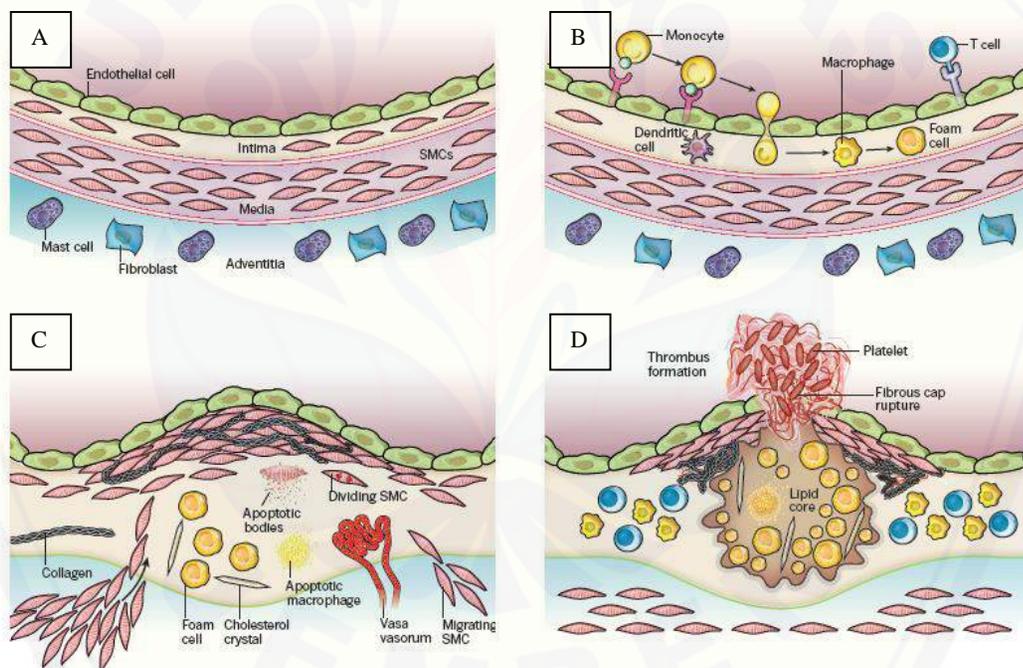
Aterosklerosis adalah penyakit kronis dinding arteri, dan merupakan penyebab utama kematian dan hilangnya nyawa tiap tahun di seluruh dunia. Penelitian yang dilakukan telah menyebabkan banyak hipotesis yang menarik tentang patofisiologi pembentukan lesi aterosklerosis dan komplikasi seperti penyakit jantung koroner, infark miokard dan stroke. Penelitian juga menunjukkan bahwa proses seperti oksidasi lipoprotein, inflamasi dan sistem imun memiliki keterlibatan penting dalam pembentukan lesi aterosklerosis pada manusia (Libby *et al.*, 2011).

2.4.1 Faktor Resiko Aterosklerosis

Aterosklerosis adalah penyakit yang kompleks dan dapat terjadi pada pembuluh darah sedang hingga besar yang secara perlahan dapat menyumbat dinding pembuluh darah. Aterosklerosis dapat mempengaruhi berbagai daerah sirkulasi dan menghasilkan manifestasi klinis yang berbeda tergantung pada tempat peredaran darah tertentu yang terjadi aterosklerosis. Faktor risiko aterosklerosis dapat dibedakan menjadi dua yaitu, yang termasuk tidak dapat dimodifikasi seperti usia, jenis kelamin laki-laki, dan genetika sedangkan dimodifikasi seperti merokok, obesitas, aktivitas fisik, gangguan lipid, hipertensi, diabetes, stres, inflamasi dan bakteri (Keche *et al.*, 2012; Chun *et al.*, 2005).

2.4.2 Patogenesis Aterosklerosis

Aterogenesis mengacu pada perkembangan plak ateromatosa di lapisan dalam arteri seperti pada gambar 2.2 bagian A. Atas dasar percobaan pada hewan dan pengamatan dalam spesimen manusia, terdapat perubahan paradigma bahwa aterosklerosis merupakan suatu rangkaian mekanisme kompleks antara oksidasi lemak, mediator inflamasi dan radikal bebas (Libby *et al.*, 2011). Terdapat pergeseran fokus dalam pemahaman tentang aterosklerosis, dimana aterosklerosis tidak hanya berhubungan dengan faktor risiko klasik seperti merokok, hipertensi dan tingginya kadar kolesterol, tetapi juga berhubungan dengan infeksi bakteri yang persisten. Patogen infeksi yang persisten dapat menyebabkan respon imun dari tubuh hostnya dan merangsang patogenesis dari aterosklerosis (Spagnoliet *al.*, 2007).



Gambar 2.2 Tahapan dalam pembentukan lesi aterosklerosis (Libby *et al.*, 2011).

Aterosklerosis diawali dari adanya kerusakan lapisan endotel dinding arteri yang diikuti perubahan permeabilitas sel endotel dan peningkatan ekspresi molekul adhesi sehingga pasien dengan disfungsi endotel memiliki peningkatan risiko kejadian kardiovaskular di masa depan. Sel endotel memproduksi berbagai faktor vasorelaksan, yang paling signifikan yaitu NO. Nitric oxide dapat yang

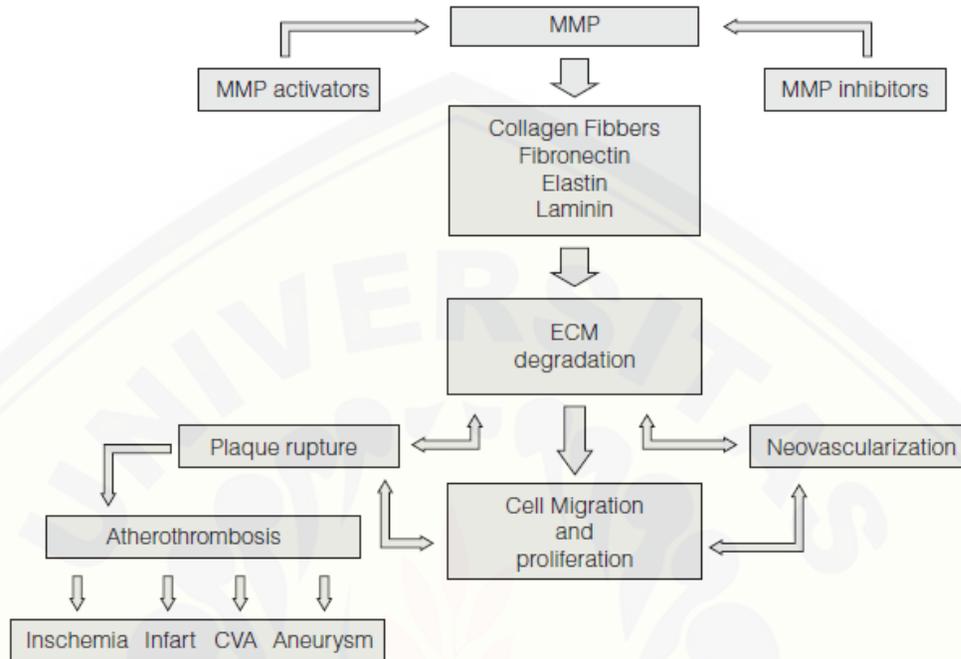
merangsang relaksasi sel otot polos pada pembuluh darah dan menghambat proliferasi yang berlebih dari sel otot polos, mencegah adhesi leukosit untuk migrasi ke dinding arteri, dan adhesi platelet pada endotel (Fliser *et al.*, 2011).

Terjadinya stress oksidatif dan inflamasi secara terus-menerus akan mengakibatkan bioavailabilitas dari NO pada endotel menurun. Sitokin dapat menurunkan bioavailabilitas NO, meningkatkan produksi ROS. Radikal bebas dapat mengurangi NO baik secara langsung dengan bereaksi dengan sel-sel endotel, ataupun secara tidak langsung, melalui modifikasi oksidatif *inducible Sintase Nitric Oxide* (iNOS) (Spagnoli *et al.*, 2007). Rendahnya bioavailabilitas NO dapat meregulasi ekspresi *intercellular adhesion molecule 1* (VCAM-1). VCAM-1 mengikat monosit dan limfosit pada endotel yang merupakan langkah pertama dalam invasi dari dinding pembuluh darah, melalui induksi *nuclear factor- κ B* (NF- κ B). Efek lain dari NO adalah penghambatan leukosit adhesi. Pengurangan NO menginduksi ekspresi *monosit chemotactic protein 1* (MCP-1), yang dapat merekrut monosit ke pembuluh darah (Spagnoli *et al.*, 2007). Hal tersebut menyebabkan terjadinya disintegrasi endotel yaitu disfungsi sel endotel yang diikuti oleh apoptosis sel, sehingga mengakibatkan disintegrasi fungsional dan struktural dari lapisan sel endotel (Fliser *et al.*, 2011).

Disintegrasi endotel dapat meningkatkan permeabilitas vaskuler sehingga memungkinkan penetrasi LDL pada dinding pembuluh darah. Teroksidasi LDL (LDLox) yang disebabkan oleh ROS akan memicu perekrutan sel pro-inflamasi (monosit dan mediator lainnya). Aktivasi monosit menjadi makrofag akan menyebabkan terbentuknya *foam cell* dengan penyerapan LDLox.

Inflamasi yang terjadi juga meningkatkan proliferasi sel SMC dan pelepasan MMP yang mendegradasi serat kolagen sehingga terjadi disintegrasi kolagen intimal pembuluh darah seperti pada gambar 2.3. Dalam proses aterosklerosis, aksi MMP dimulai setelah inisiasi inflamasi, ketika sel-sel dengan tindakan inflamasi (makrofag dan *foam cell* terbentuk) sudah dalam intima. MMP-1 atau *collagenases* adalah salah satu MMP paling menonjol sebagai indikator dari risiko penyakit kardiovaskular.

Diinduksi oleh *hepatocyte growth factor*(HGF), *thrombin*, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) and $TNF-\alpha$ (Fonsesca *et al.*, 2014).



Gambar 2.3 interaksi antara metalloproteinase dan regulator (aktivator dan inhibitor). Terjadi degradasi matriks ekstraselular dalam proses aterogenik (Fonsesca *et al.*, 2014).

Monosit dan sel akan bermigrasi ke dalam lapisan intima dinding pembuluh darah. Di dalam intima, monosit berdiferensiasi menjadi makrofag yang kemudian akan memakan oxLDL dan membentuk *foam cell* seperti pada gambar 2.1 bagian B. Penumpukan *foam cell*, sel T dan beberapa sel otot polos ini membentuk *fatty streak*. Selanjutnya *foam cell* mensekresikan *cytokines attracting monocytes* dan terperangkapnya makrofag akan menyebabkan terjadinya rekrutmen monosit yang terus menerus sehingga mengakibatkan penebalan lesi aterosklerosis (Spagnoliet *al.*, 2007).

Jika respon inflamasi tidak mereda, maka arteri akan mengalami remodeling, yaitu penebalan dan pelebaran dinding arteri bertahap, sampai lumen arteri tidak dapat berdilatasi lagi. PoliferasiSMC yang terus menerus dari tunika media - lapisan tengah dinding arteri - ke dalam tunika intima akan membentuk ateroma seperti pada gambar 2.1 bagian C (Libby *et al.*, 2011).Komplikasi trombotik tidak selalu terjadi

pada situs penyempitan arteri yang paling parah oleh plak. Sebaliknya, thrombus sering timbul setelah gangguan fisik dari plak, yang paling umum pecahnya *fibrous cap* yang mengekspos bahan pro-koagulan dari inti plak untuk yang memicu koagulasi dalam darah, dan memicu terjadinya trombosis seperti pada gambar 2.1 bagian D. Plak yang pecah biasanya memiliki *fibrous cap* yang tipis dengan beberapa SMC tapi makrofag berlimpah. Sel-sel inflamasi juga dapat mempercepat gangguan plak dengan mengelaborasi enzim yang dapat menurunkan kolagen, dan dengan menghasilkan mediator yang memprovokasi kematian SMC (Libby *et al.*, 2011).

2.5 Hubungan Periodontitis dan Aterosklerosis

Hubungan periodontitis dan aterosklerosis telah banyak dibicarakan oleh para ahli. Periodontitis diduga menjadi faktor risiko independen pengembangan aterosklerosis. Mekanisme potensial yang bisa menjelaskan peran periodontitis terhadap perkembangan lesi aterosklerotik adalah mekanisme inflamasi. (Hajishengallis, 2015).

Lesi aterosklerosis dapat terjadi pada arteri elastis berukuran besar dan menengah, hal ini dapat menyebabkan lesi iskemik dan dapat mengakibatkan thrombus dan infark yang merusak pembuluh darah. Dalam sebuah penelitian menyebutkan bahwa bakteri gram negatif dan produk lipopolisakaridanya menyebabkan infiltrasi sel – sel inflamasi ke dalam dinding arteri, proliferasi SMC arteri dan koagulasi intravaskuler. Bukti menunjukkan bahwa LPS *P.gingivalis* dan vesikel membran terluar mampu menginduksi makrofag untuk meningkatkan LDL untuk membentuk *foam cell*, kemotaksis monosit dari sel endotel dan oksidasi dari LDL. Faktor virulensi dari *P.gingivalis* dapat merekrut sel – sel inflamasi ke dalam pembuluh darah utama dan mempengaruhi mediator inflamasi seperti IL-1 β dan TNF- α pada endotelium vaskuler, dan meningkatkan proliferasi SMC, agregasi platelet, degenerasi lemak dan pengendapan di dinding pembuluh darah sehingga lumen pembuluh darah menjadi sempit dan aliran darah tidak normal (Ross, 2004; Hajishengallis, 2015).

LPS dari bakteri periodontal secara tidak langsung merangsang hati untuk memproduksi protein fase akut atau *C-Reactive Protein* (CRP), secara khusus CRP mengikat sel yang rusak dan mengaktifkan neutrofil kemotaksis (Hajishengallis, 2015). Inflamasi sistemik dapat diketahui dari peningkatan kadar CRP pada pasien, dengan kata lain peningkatan kadar CRP pada pasien dapat dijadikan gradien infeksi periodontal dan inflamasi sistemik. Efek dari peningkatan kadar CRP disertai agregasi platelet dan penyempitan lumen pembuluh darah adalah penyakit kardiovaskuler salah satunya aterosklerosis koroner (Ross, 2004; Hajishengallis, 2015).

Hubungan klinis antara periodontitis dan aterosklerosis telah banyak dilakukan penelitian. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa aterosklerosis umum terjadi pada pasien periodontitis sehingga diperkirakan periodontitis dan penyakit jantung koroner (aterosklerosis koroner) memiliki penyebab yang sama dan saling berkaitan. (Hajishengallis, 2015).

2.6 Kopi

Kopi telah dikonsumsi selama lebih dari 1.000 tahun dan hari ini merupakan minuman yang paling banyak dikonsumsi di dunia (lebih dari 400 miliar cangkir pertahun). Daerah Saudi bertanggung jawab untuk penyebaran budaya kopi dan dalam naskah kuno menyebutkan budaya kopi dari yaman, tetapi hanya pada abad XVI di Persia, biji kopi pertama panggang menjadi berubah menjadi minuman yang kita kenal sekarang.

2.6.1 Komposisi dalam Kopi

Kafein merupakan komponen yang paling dikenal dari biji kopi. Di dalam kopi jenis arabika, kafein dapat ditemukan dalam kadar yang berbeda-beda antara 0,8% dan 1,4%, sedangkan untuk Robusta terdapat berbagai nilai yang bervariasi antara 1,7% dan 4,0%. Namun, biji kopi didasari oleh beberapa komponen lainnya, termasuk selulosa, mineral, gula, lipid, tanin, dan polifenol. Kandungan mineral termasuk kalium, magnesium, kalsium, natrium, besi, mangan, rubidium, seng, tembaga, strontium, kromium, vanadium, barium, nikel, kobalt, timah, molibdenum,

titanium, dan kadmium. Kandungan gula, terdapat sukrosa, glukosa, fruktosa, arabinosa, galaktosa, dan manosa. Beberapa asam amino seperti alanin, arginin, asparagin, sistein, asam glutamat, glisin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, tirosin, dan valin juga dapat ditemukan. Selain itu, biji kopi mengandung vitamin B kompleks, niacin (vitamin B3), dan CGAs dalam proporsi yang mungkin berbeda dari 7% menjadi 12%, tiga sampai lima kali lebih dari kafein (Farah, 2012).

Tabel 2.1 Komposisi Kimia dari Kopi Arabika dan Kopi Robusta.

Komponen	Konsentrasi (g/100g)	
	Kopi Arabika	Kopi Robusta
Karbohidrat		
Sukrosa	4.2-tr	1.6-tr
<i>Reducing sugars</i>	0.3	0.3
Polisakarida (<i>arabinogalactan, mannan,</i> dan <i>glucan</i>)	31–33	37
lignin	3.0	3.0
pektin	2.0	2.0
Senyawa Nitrogen		
Protein	7.5–10	7.5–10
Asam Amino Bebas	ND	ND
Kafein	1.1–1.3	2.4–2.5
<i>Trigonelina</i>	1.2–0.2	0.7–0.3
<i>Nicotinic acid</i>	0.016–0.026	0.014–0.025
Lipid		
Minyak Kopi (<i>trigliserida</i> dengan <i>unsaponifiables</i>)	17.0	11.0
Diterpene Esters	0.9	0.2
Mineral	4.5	4.7
Acids dan esters		
<i>Chlorogenic acids</i>	1.9–2.5	3.3–3.8
<i>Aliphatic acids</i>	1.6	1.6
<i>Quinic acid</i>	0.8	1.0
<i>Melanoidins</i>	25	25

Sumber: (Farah, 2012).

Di antara zat-zat yang ada dalam komposisi kimia kopi, hanya kafein yang termotabil, yaitu tidak dihancurkan oleh pemanggangan yang berlebihan. Zat lain

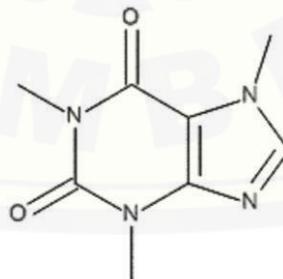
seperti protein, gula, CGAs, trigonelina, dan lemak dapat menjadi diawetkan atau bahkan hancur dan berubah menjadi produk reaktif selama proses pemanggangan kopi (Solange *et al.*, 2011).

2.6.2 Bioaktivitas dalam kopi

Kopi mengandung banyak komponen biologis aktif, semisal polifenol dan alkaloid. Alkaloid yang ditemukan dalam kopi meliputi kafein, senyawa aktif paling melimpah yang ditemukan dalam seduan kopi dan telah terbukti memiliki kemungkinan efek anti-inflamasi. Sejumlah komponen lain yang ditemukan dalam kopi adalah *tanin*, *flavanols*, *flavones*, *anthocyanins*, *proanthocyanidins*, *phenolic acids*, *hydroxybenzoic acids* dan *hydroxycinnamic acids*). Senyawa lainnya merupakan senyawa golongan polifenol, polifenol dalam kopi terdiri dari *CGAs*, *Ferulic acid* dan *Caffeic acid*. Polifenol telah terbukti memiliki efek biologis yang menguntungkan bagi jantung dan gangguan metabolik, inflamasi dan kanker, stres oksidatif, iskemia serebral, obesitas dan fungsi otak (Hall *et al.*, 2015).

1. Kafein

Kafein (1,3,7-trimethylxanthine) merupakan salah satu komponen kopi yang banyak diteliti. Senyawa ini merupakan kristal xanthine alkaloid putih alami di biji kopi. Telah dilaporkan bahwa konsentrasi kafein dalam kopi berkafain berkisar 29-130 mg/cup (240 ml), sedangkan pada kopi espresso, kafein adalah berkisar 58-76 mg (35-50 ml). Penghapusan kafein dapat dilakukan pada kopi melalui proses dekafeinasi sehingga mengurangi kapasitas antioksidan dan juga menyebabkan menurunnya kandungan polifenol (Buscemi *et al.*, 2014).



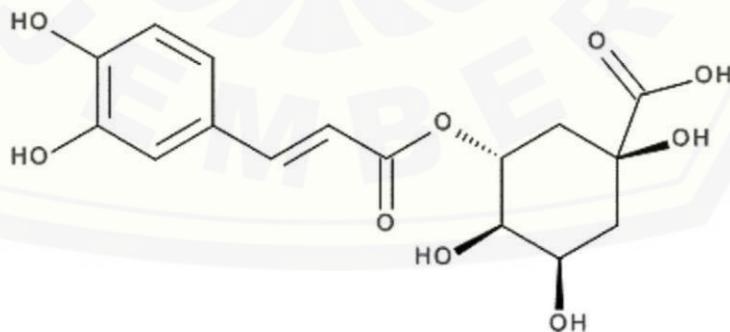
Gambar 2.3. Struktur kimia kafein (Hall *et al.*, 2015).

Penelitian telah mengevaluasi efek dari kafein dan metabolit terkait dengan inflamasi. Kafein dan salah satu metabolit utama, paraxanthine, telah ditunjukkan untuk menghambat produksi TNF- α yang dirangsang LPS. Kafein juga merupakan antioksidan kuat yang melindungi terhadap kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas dan peroksida. Penelitian telah menunjukkan bahwa kafein dan metabolitnya seperti *theobromine* dan *xanthine* melindungi terhadap produksi radikal bebas, seperti radikal hidroksil (OH), peroksil radikal (ROO.) (Hall *et al.*, 2015).

Kafein dapat berefek secara langsung dan tidak langsung pada jaringan pembuluh darah dengan mekanisme yang berbeda pada berbagai target molekul. Dalam sel endotel, kafein bertindak langsung dengan meningkatkan kalsium intraseluler dan merangsang produksi NO melalui ekspresi NO pada endotel sintase enzim yang menyebabkan vasodilatasi. Selain itu, kafein dapat secara tidak langsung menurunkan tekanan darah dengan meningkatkan ekskresi air dan elektrolit yang merangsang efek diuretic (Hall *et al.*, 2015; Buscemi *et al.*, 2014).

2. *Chlorogenic acid*

Salah satu polifenol yang paling banyak dipelajari yang terkandung dalam kopi, salah satunya adalah CGAs yang merupakan keluarga ester asam hydroxycinnamic. Namun konsentrasi CGAs dalam kopi tetap bervariasi, kandungan CGAs pada kopi espresso bervariasi 96-111 mg per 30 ml cangkir, sedangkan kandungan CGAs dalam cangkir 130ml dapat berkisar dari 143 mg (arabika) sampai 247 mg (robusta) (Buscemi *et al.*, 2014).



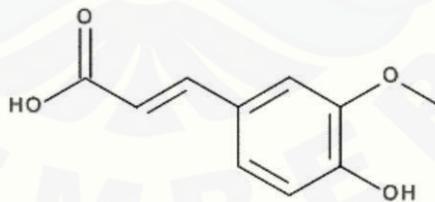
Gambar 2.4. Struktur kimia *Chlorogenic acid* (Hall *et al.*, 2015).

Chlorogenic acids menunjukkan sifat antioksidan yang kuat *in vitro*. CGAs telah terbukti mengurangi produksi sejumlah mediator proinflamasi, termasuk TNF- α , IL-1 β , IL-6 dan interferon- γ (IFN- γ) dalam sel makrofag (Hall *et al.*, 2015). CGAs juga mungkin memainkan peran sebagai faktor antitumor dengan menghambat matrix MMP-9, angiogenik enzim yang terlibat dalam genesis tumor hati manusia dan metastasis (Buscemi *et al.*, 2014).

Chlorogenic acids memainkan peran penting dalam pencegahan aterosklerosis dengan menghambat LDL mengalami oksidasi dalam plasma dan di bawah permukaan endotel (Meng *et al.*, 2012; Buscemi *et al.*, 2014). Dalam penelitian yang dilakukan pada metabolisme lipid pada hewan model diabetes. Efek antihyperlipidemic dari CGA tampaknya tergantung pada kapasitasnya untuk meningkatkan aktivitas 3-hidroksi 3-methylglutaryl koenzim A reduktase di hati dan ginjal dan menurunkan aktivitas lipoprotein lipase dan lesitin acyltransferase kolesterol dalam plasma. Selain itu, CGA mungkin mengurangi kerentan oksidasi LDL (Buscemi *et al.*, 2014).

3. *Ferulic acid*

Ferulic Acid telah terbukti memiliki banyak efek pada peradangan. *Ferulic acid* memicu penurunan produksi IL-1 β dan TNF- α . Selain itu *ferulic acid* juga dapat mempengaruhi katabolisme triptofan dalam otak sehingga berperan dapat digunakan sebagai biomarker depresi (Hall *et al.*, 2015).

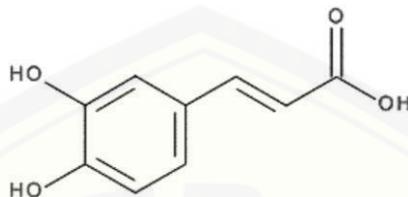


Gambar 2.5. Struktur kimia *ferulic acid* (Hall *et al.*, 2015).

Sejumlah penelitian telah mengungkapkan manfaat *ferulic acid* karena sifat antioksidan. *Ferulic acid* telah terbukti menghambat peroksidasi lipid pada tikus. Pada penelitian terhadap model sel saraf, *ferulic acid* telah terbukti memberikan perlindungan antioksidan terhadap hidroksil dan paparan radikal peroksil. (Hall *et al.*, 2015).

4. Caffeic acid

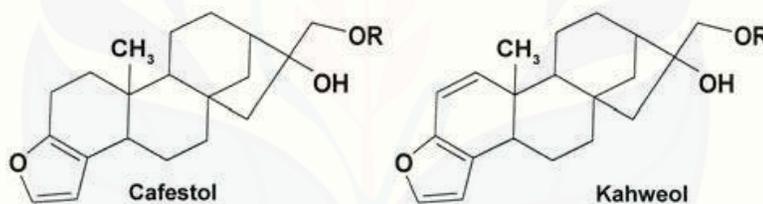
Caffeic acid memiliki potensi sebagai antioksidan yang kuat dan antiinflamasi. Secara khusus *Caffeic acid* dapat menekan aktivasi NF- κ B, yang penting dalam proses inflamasi (Hall *et al.*, 2015).



Gambar 2.6. Struktur kimia *Caffeic acid* (Hall *et al.*, 2015).

5. Diterpenes

Cafestol dan *kahweol* adalah dua diterpenes yang secara alami terdapat pada biji kopi. Biji kopi arabika mengandung sekitar 0,3-0,7% *cafestol* dan 0,1-0,3% *kahweol* (*cafestol* dan *kahweol* dengan konsentrasi individu berkisar 0,1-7 mg / ml dalam kopi) sedangkan pada kopi robusta, konsentrasi *cafestol* menurun (0,1-0,3%) dan *kahweol* (<0,01%) (Buscemi *et al.*, 2014).



Gambar 2.7. Struktur kimia *cafestol* dan *kahweol* (Buscemi *et al.*, 2014).

6. Melanoidins

Seduan kopi dianggap salah satu sumber utama dari *melanoidins* dalam diet manusia. Diperkirakan asupan dari *melanoidins* pada kopi menurut rata-rata konsumsi kopi menunjukkan hal bervariasi antara 0,5 dan 2,0 g per hari. Mekanisme aksi antioksidan dari *melanoidins* kopi masih belum jelas. Telah diasumsikan bahwa didasarkan pada aktivitas antioksidan. Selain itu, beberapa studi menunjukkan *melanoidins* berperan terhadap perlindungan dari oksidasi lipid (Buscemi *et al.*, 2014).

7. Trigonelline

N-methylnicotinic acid ($C_7H_7NO_2$), lebih dikenal sebagai *trigonelline*, adalah alkaloid yang merupakan derivat vitamin B6 dengan rasa pahit yang terkandung dalam biji kopi dan kemungkinan besar merupakan salah satu komponen utama yang berkontribusi untuk memberikan rasa pahit pada kopi. Jumlahnya di biji kopi umumnya berkisar antara 0,6% dan 1%, namun setelah proses pemanggangan pada $230^{\circ}C$, sekitar 85% dari *trigonelina* dipecah ke *nicotinic acid*, dan beberapa molekul *trigonelline* masih tersisa. *Trigonelline* mungkin memiliki efek menguntungkan terhadap di pankreas dan mungkin mengerahkan fungsi antioksidan dengan mengatur aktivitas enzim antioksidan serta penurunan peroksidasi lipid (Buscemi *et al.*, 2014).

2.7 Hubungan Kopi dan Aterosklerosis

Efek kopi terhadap kesehatan telah banyak diperdebatkan sepanjang empat abad terakhir. Baru-baru ini, banyak peneliti telah menyarankan bahwa senyawa polifenol sebagai antioksidan muncul pada kopi bermanfaat untuk melindungi tubuh manusia terhadap penyakit kardiovaskular, penyakit hati, dan penyakit degeneratif. Oleh karena itu, kopi diharapkan menjadi minuman yang bermanfaat bagi kesehatan manusia.

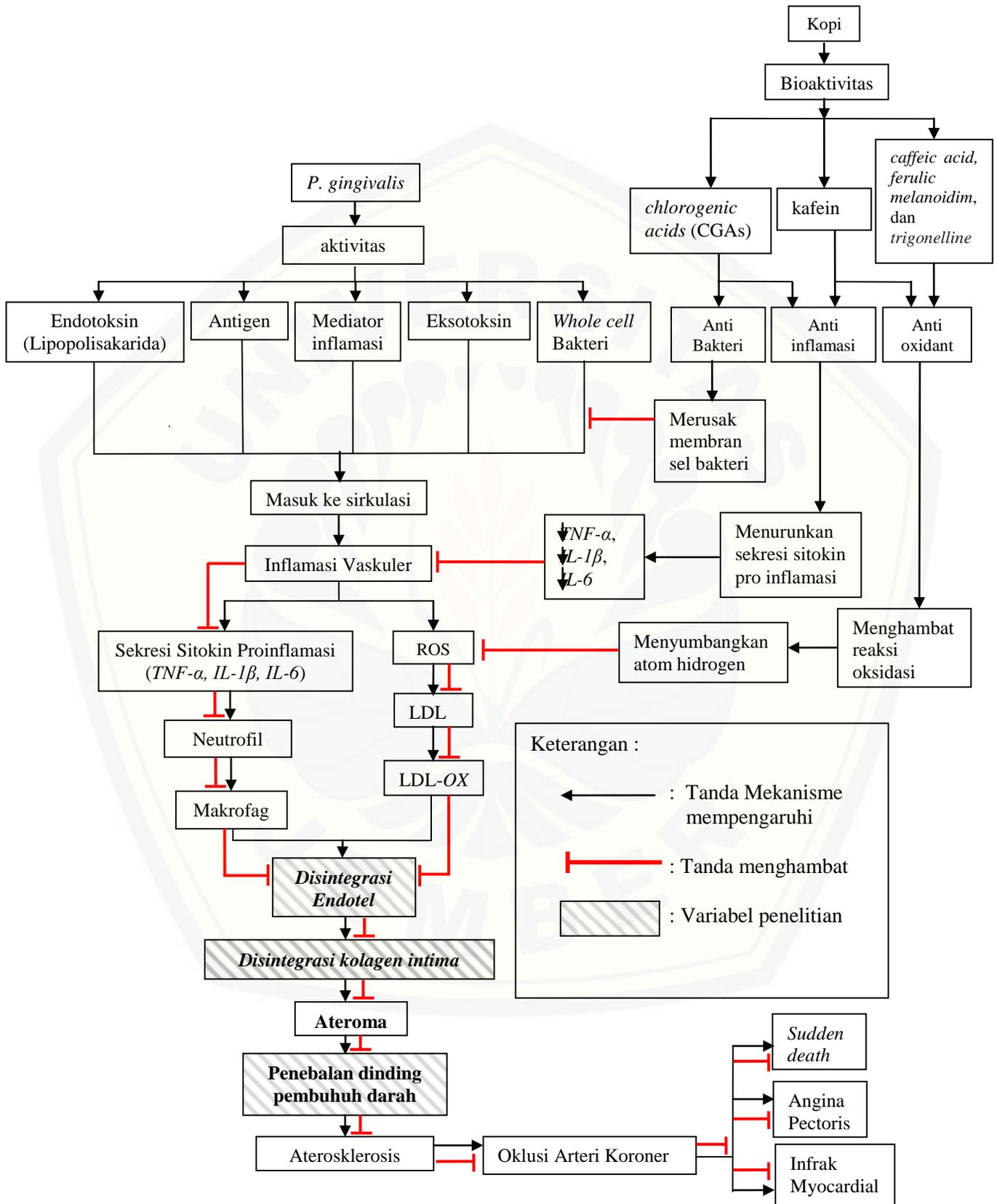
Hubungan antara kopi dan risiko penyakit kardiovaskular, terutama aterosklerosis, telah menjadi topik penelitian selama 20 tahun terakhir walaupun kesimpulan dari penelitian yang telah diterbitkan beragam (Engstrom, 2015). Aterosklerosis merupakan penyakit vaskuler dengan timbulnya plak ateroma, yaitu suatu tungkulan pada dinding arteri. Tahap awal, di daerah subintima ditemukan yang disebut *foam cell*. Terbentuknya *foam cell* terjadi setelah makrofag mengendositososis lipid teroksidasi (terutama oxLDL) melalui reseptor scavenger (Sc-R). Ekspresi Sc-R pada monosit dapat diinduksi oleh bakteri periodontitis *P. gingivalis*. Stimulasi *P. gingivalis* bersifat prooksidatif karena meningkatkan oksidasi LDL oleh monosit dan proinflamatorik karena menginduksi produksi sitokin proinflamatori TNF- α dan IL-1 β yang menginduksi ekspresi Sc-R, sehingga *P. gingivalis* memudahkan pembentukan *foam cell* (Libby *et al.*, 2011).

Hasil penelitian secara *in vitro*, menunjukkan bahwa filtrat seduan kopi dapat menghambat pembentukan *foam cell* dan ekspresi Sc-R (Susilawati *et al.*, 2013). Kopi mengandung bahan-bahan aktif antioksidan seperti flavonoid, xanthine, alkaloid yang dapat berfungsi sebagai antiinflamasi, antibakteri. Sehingga kemungkinan, adanya kopi akan mengurangi oksidasi lipid sehingga stimulasi terhadap ekspresi Sc-R berkurang dan dengan demikian pembentukan *foam cell* dihambat. Antioksidan diduga juga mempengaruhi viabilitas monosit, diduga antioksidan mengurangi peroksidasi lipid membran sel, sehingga integritas membran monosit dapat dipertahankan, dengan demikian juga berarti mengurangi efek merusak toksin *P. gingivalis* pada membran monosit. Kemungkinan lain, kopi juga bersifat antibakteri yang dapat berpengaruh terhadap kelangsungan dan aktivitas bakteri, sehingga efek patogeniknya berkurang (Susilawati *et al.*, 2013).

Kopi juga memiliki efek terhadap perlindungan endotel terhadap inisiasi awal dari aterosklerosis. Kafein bekerja langsung pada sel endotel, merangsang produksi NO dan pelepasan kalsium dari retikulum yang mendukung aktivasi sintesis NO endotel (Umemura *et al.*, 2006). Dengan meningkatnya produksi NO pada sel endotel akan menjaga tidak terjadinya disintegrasi endotel. Selanjutnya, kafein meningkatkan migrasi sel endotel dan re-endotelisasi, melalui protein AMP kinase. Mekanisme ini menunjukkan peran menguntungkan kafein pada perbaikan endotel (Spyridopoulos *et al.*, 2008). Komponen kopi, *Dihydrocaffeic acid* (DHCA) yang merupakan metabolit dari CGA dapat menghambat ekspresi dan aktivasi MMP sehingga dapat menghambat terjadinya disintegrasi kolagen intimal (Lee *et al.*, 2015).

Dalam penelitian lain, konsumsi kopi mengakibatkan penurunan yang signifikan dalam kadar serum kolesterol, kolesterol LDL, dan penurunan yang signifikan dalam kerentanan LDL untuk terjadi oksidasi (Yukawa *et al.*, 2004). Hal tersebut menunjukkan bahwa kekuatan konsumsi kopi melindungi terhadap aterosklerosis. Potensi kopi juga didukung dengan penelitian eksperimental pada tikus model periodontitis yang diberikan konsumsi kopi jenis *robusta* yang dapat melindungi arteri koroner dari pembentukan aterosklerosis (Susilawati *et al.*, 2014).

2.8 Kerangka Konseptual



2.9 Hipotesis Penelitian

Konsumsi kopi dapat menghambat pembentukan lesi aterosklerosis pada model tikus periodontitis.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris. Dipilih jenis ini karena baik pada sampel maupun perlakuan lebih terkendali, terukur dan pengaruh perlakuan dapat lebih dipercaya (Notoatmodjo, 2005).

3.2 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen laboratoris dengan rancangan *the post test only control group design*, yaitu melakukan pengamatan atau pengukuran setelah perlakuan dan hasilnya dibandingkan dengan kontrol (Notoatmodjo, 2005).

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

3.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk proses perlakuan hewan coba, pengecatan darah dan jaringan serta pembuatan suspensi bakteri *P. gingivalis*. Pemrosesan jaringan dengan metode *frozen section* dikerjakan di laboratorium patologi anatomi RSUD Soebandi, Jember. Pengecatan dan pengamatan jaringan dilakukan di laboratorium histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan September-Oktober 2016. Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas nama peneliti utama yaitu Dr. I Dewa Ayu Susilawati, drg, M.Kes dengan nomor 3.100/H25.1.11/KE/2016.

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah periodontitis dan konsumsi kopi.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah lesi aterosklerosis pada arteri koroner berupa penebalan dinding arteri koroner, disintegrasi endotel, dan disintegrasi kolagen intimal.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

1. kriteria hewan coba
2. pakan dan minum tikus
3. injeksi *Porphyromonas gingivalis*
4. konsumsi kopi

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Periodontitis

Periodontitis adalah injeksi 0,05 ml *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 hidup dengan konsentrasi 2×10^9 CFU/ml pada area sulkus gingiva distobukal gigi molar pertama rahang bawah kiri dengan pengulangan injeksi tiga kali dalam seminggu selama 28 hari dan pemasangan *Wire ligature* berdiameter 0,5 mm dipasangkan pada gigi molar kiri rahang bawah. Periodontitis dilihat melalui radiografi terhadap tingkat resorpsi tulang.

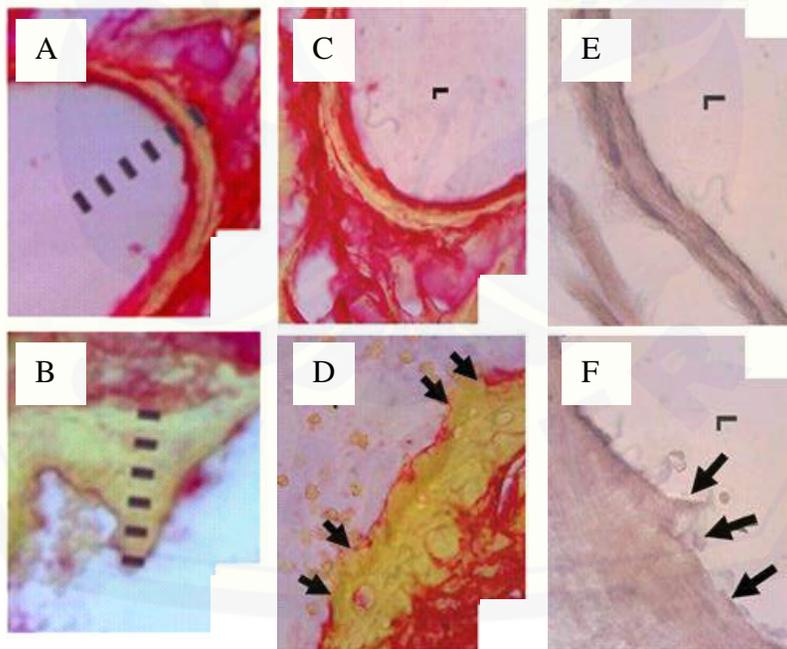
3.5.2 Konsumsi kopi

Konsumsi kopi adalah konsumsi kopi dengan mensondasekan pada tikus wistar setiap hari selama 28 hari. Kopi yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 0,6 ml dan terdapat dua jenis kopi yaitu jenis kopi robusta dan arabika yang merupakan produk hasil produksi dari kebun Perkebunan Nusantara XII, Kawah Ijen, Bondowoso.

3.5.3 Lesi aterosklerosis

Lesi aterosklerosis adalah pengamatan gambaran histologi yang dilihat pada jaringan arteri koroner yang dilakukan pewarnaan *Picrosirius red* dan *Sudan IV*. Gambaran histologi yang diamati adalah:

1. Ketebalan dindingarteri koroner adalah gambaran histologi dari ketebalan dinding arteri koroner yang diukur dari tunika media sampai tunika intima (*intima-media thickness/* IMT). Pada gambar 3.1, bagian A dan B dapat dilihat untuk pengukuran IMT dilakukan dari intima sampai media. Pengukuran dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x dalam satuan μ mdan diamati menggunakan optilab dan *Image Raster*.
2. Disintegrasi endotel adalah perubahan morfologi lapisan endotel berupa kerusakan (*injury*) endotel pada lapisan tunika intima dari arteri koroner.Pada gambar 3.1, bagian C dan D dapat dilihat untukpengamatan disintegrasi endotel. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dan optilab.



Gambar 3.1 Gambaran histologi aterosklerosis. (A) Pengukuran ketebalan dinding arteri koroner pada arteri tikus normal,(B) Pengukuran ketebalan dinding arteri koroner pada arteri tikus periodontitis,(C) Gambaran kolagen intimal normal, (D)Gambaran disintegrasi kolagen intimal, (E) Gambaran endotel normal, dan (F) Gambaran disintegrasi endotel (Nafilah *et al.*, 2015).

3. Disintegrasi kolagen intimal merupakan kerusakan pada lapisan kolagen intima dinding arteri koroner yang terlihat adanya penipisan/diskontinuitas kolagen intimal. Pada gambar 3.1, bagian E dan F dapat dilihat bahwa untuk pengamatan disintegrasi endotel. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dan optilab.

3.6 Obyek Penelitian

3.6.1 Kriteria Obyek Penelitian

Obyek penelitian adalah tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) dengan kriteria inklusi sebagai berikut, jenis kelamin jantan, berat badan 200-250 gram, umur 3-4 bulan, pakan seragam berupa diet normokolesterol standar, minum air mineral seragam secara *ad libitum*, dan kondisi sehat yang ditandai dengan nafsu makan yang baik dan perilaku normal.

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

3.6.2 Besar Sampel dan Kelompok Penelitian

Besar sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 4 ekor tikus tiap kelompok perlakuan. Adapun besar sampel didapat dari perhitungan rumus sebagai berikut (Daniel, 2005).

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

Keterangan :

- n : besar sample tiap kelompok
- Z : nilai Z pada tingkat kesalahan tertentu, jika $\alpha = 0,05$ maka $Z = 1,96$
- σ : standar deviasi sampel
- d : kesalahan yang masih dapat di toleransi

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

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

$$n \geq 3,84$$

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

$$n \geq 4$$

Berdasarkan rumus di atas, jumlah sampel minimum yang harus digunakan adalah 4 sampel untuk masing-masing kelompok. Jumlah tikus yang digunakan 16ekor tikus sebagai sampel yang terbagi secaraacak dalam 4 kelompokdengan rincian sebagai berikut:

- 1) Kelompok I merupakan kelompok kontrol.
- 2) Kelompok II merupakan kelompok periodontitis.
- 3) Kelompok III merupakan kelompok periodontitis dan kopi robusta.
- 4) Kelompok IV merupakan kelompok periodontitis dankopi arabika.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah alat untuk kultur bakteri terdiri atas tabung reaksi, *autoclave* (Mommert, Jerman), rak tabung, petridis tidak bersekat, *vibrator / vortex* (Labinco, Belanda), *densichek*, pipet mikro (Hummapete, Jerman), dan inkubator (Daihan Labtech, India). Alat untuk pemeliharaan terdiri atas kandang hewan coba, wadah pakan, wadah minum, dan timbangan neraca. Alat untuk induksi periodontitis terdiri atas jarum insulin 26G (Terumo, Jepang), pipet tetes plastic, baker glass merk pyrex, glass objek sail, brand, dan mikroskop. Alat untuk bedah tikus terdiri atas papan *wax*, jarum, pinset anatomis, pinset *chirurgis*, gunting, *scalpel*, *masker*, sarung tangan, dan wadah untuk membersihkan organ. Alat untuk pemrosesan jaringan terdiri atas mesin *cryostate* (Leica, Jerman), *object glass* (Citoplus, China) dan *cover glass*. Alat untuk pengecatan terdiri atas rak pengecatan, timbangan digital (Snug-300, China), kompor listrik (Maspion, Indonesia), kertas saring, mikroskop cahaya (Olympus, Jepang), dan

Optilab (OptiLab Advance, Indonesia). Alat untuk pemberian kopi pada tikus adalah Syringe 5 ml.

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah bahan kultur bakteri agar TSA (*Tryptone Soya Agar*), NaCl fisiologis 0,9%, tikus wistar jantan, *P. gingivalis* (Tipe ATCC 33277), pakan standar (Turbo, Indonesia), air minum (Aqua, Indonesia), kloroform, formalin 10%, larutan PBS (BioWORLD, USA), sukrose 30%, *tissue tex*, *aluminium foil*, *poly l-lysine*, aquades, larutan *picrosirius red* (ScyTek, USA), larutan asam (asam asetat), etanol 100%, *xylane* (Merck, Jerman), *propylane glycol absolute* (Gama Scientific Biolab, Indonesia), *propylane glycol 85%* (gama Scientific Biolab, Indonesia), larutan Sudan IV (Sigma-Aldrich, USA), *Mayer's Hematoxylin* (Merck, Jerman), *glycerin jelly* (Merck, Jerman), *Canada balsam* (Merck, Jerman), minyak imersi (Olympus Corp., Jepang), kapas steril, spirtus, perwarna Giemsa.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Persiapan Penelitian

Persiapan pertama adalah dilakukan pembuatan *etichal clearence* di Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.8.2 Persiapan Hewan coba

Penelitian ini akan dilakukan pada hewan coba tikus dengan kriteria yang telah ditentukan. Sebelum diberi perlakuan tikus ditimbang dan diaklimatisasi selama satu minggu. Selanjutnya hewan coba di kelompokkan menjadi 4 kelompok sesuai dengan kriteria masing – masing.

3.8.3 Persiapan Bahan Perlakuan

1. Pembuatan Suspensi *P.gingivalis*

Pembuatan suspensi dimulai dengan pengambilan koloni bakteri pada media agar sebanyak 1-2 ose dan diletakkan pada campuran BHI-B 1ml, vitamin K, hemin. Media BHI-B yang telah terisi koloni bakteri tersebut diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam dan setelah 24 jam suspensi dihomogenkan menggunakan *vortex*.

Kemudian mengambil 200 µl suspensi bakteri dan masukan ke dalam NaCl 0,45% sebanyak 1 ml, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Larutan diuji kekeruhannya menggunakan alat *densicheck* hingga mencapai konsentrasi 0,5 McFarland (setara dengan 2×10^9 CFU/ml).

2. Pembuatan dan Pemasangan *Wire Ligature*

Wire ligature berdiameter 0,5 mm dipasangkan pada gigi molar kiri rahang bawah. Pembuatan *wire ligature* dilakukan pada model rahang yang didapat dari hewan coba yang telah didekaputasi dan diambil rahangnya. *Wire ligature* dibentuk menyerupai huruf U menggunakan tang koil. Setelah pembuatan *wire ligature* selesai, dilakukan pemasangan pada hewan coba. Pemasangan *wire ligature* menggunakan pinset anatomis dan dilakukan dengan hati-hati agar tidak melukai dan terjadi perdarahan. *Wire ligature* dipasang memeluk mesial dari molar tikus, kemudian *wireligature* ditekan ke arah apikal secara hati—hati agar tepat pada servikal gigi, posisi akhir dari *wire ligature* adalah di atas sulkus gingiva agar tidak menyebabkan iritasi.

3. Pembuatan Seduan Kopi

Pembuatan seduan kopi dilakukan terhadap dua jenis kopi yaitu kopi jenis arabika dan kopi jenis robusta yang di ambil dari perkebunan kopi PTPN XII ijen. Pembuatan seduan kopi dengan cara mencampurkan air panas 100° C sebanyak 200 ml dengan 12 gram kopi yang diaduk secara merata. Pemberian pada hewan coba disesuaikan dengan perhitungan berdasarkan berat badan tikus. Sondase tikus dilakukan setiap hari selama 28 hari sebanyak 0.6 mlyang telah konversikan setara dengan satu cangkir kopi pada manusia.

3.8.4 Pelaksanaan Penelitian

1. Pembiusan Hewan Coba

Hewan coba yang akan diberi perlakuan terlebih dahulu dilakukan pembiusan secara inhalasi dengan klorofom.

2. Pemasangan *Wire ligature*

Wire ligature berbentuk U dipasangkan pada mesial gigi molar kiri bawah berada di bawah lengkung terbesar gigi menggunakan pinset.

3. Injeksi *P. Gingivalis*

Porphyromonas gingivalis diinduksikan untuk menciptakan infeksi kronis pada jaringan periodontal. *P. gingivalis* disuntikkan pada sulkus gingiva gigi molar kiri rahang bawah bagian bukal 0,05 ml *P. gingivalis* ATCC 33277 hidup dengan konsentrasi 0,5 McFarland (setara dengan 2×10^9 CFU/ml). Injeksi *P.gingivalis* diberikan seminggu 3 kali selama 28 hari untuk memicu kondisi periodontitis kronis.

4. Sondase Kopi

Sondase kopi dilakukan pada kelompok III dengan kopi jenis robusta dan kelompok IV dengan jenis kopi arabika. Sondase dilakukan selama 28 hari sebanyak 0.6 ml setiap sondase.

3.8.5 Pengambilan Jantung

Setelah perlakuan selama 28 hari, pada hari ke-29, semua sampel hewan coba dikorbankan untuk diambil organ jantung. Hewan coba dianestesi secara inhalasi menggunakan kloroform sebelum dikorbankan. Pembedahan dilakukan setelah hewan coba tidak sadar, yaitu dengan membedah dada hewan coba untuk pengambilan jantung yang terdapat arteri koroner. Fiksasi jaringan pada formalin 10% yang dicampur dengan larutan PBS dengan perbandingan 1:9 sebelum dilakukan pemrosesan jaringan.

3.8.6 Pemrosesan Jaringan

1) Pematangan Jaringan

Pematangan jaringan pada penelitian ini menggunakan metode Potongan beku (*frozen section*). Prosedur *frozen section* adalah *cryosection* menggunakan alat cryostat yang merupakan mikrotom pada alat pembeku. Dalam metode *frozen section* tidak memerlukan proses dehidrasi, *clearing agent* tanpa media *embedding*. Tahapan *frozen section* adalah sebagai berikut.

1. Jaringan jantung ditriming setebal 1/3 koronal jantung kemudian dimasukkan dalam botol yang berisi sukrose 30% dan disimpan ke dalam kulkas 3 hari.
2. Jaringan jantung diambil dari kulkas, dipel dengan kertas saring kemudian ditetesi dengan *tissue tex* pada cetakan yang telah diberi *aluminium foil*.

3. Selama menunggu persiapan jaringan, disiapkan mikrotom *frozen section* (*cryotom*) dan mesin *frozen section* (*cryostat*). Langkah persiapan *cryostat* adalah sebagai berikut :

1. Pastikan kabel terpasang pada arus listrik
2. Tekan *On*
3. Selanjutnya tekan tombol start
4. Mesin otomatis menyesuaikan pada suhu mencapai -25°C
5. Untuk mencapai -25°C membutuhkan waktu 2 jam
6. Jaringan jantung dimasukkan dalam *freezer* -80°C dan tunggu sampai membeku kurang lebih 10 menit.
7. Spesimen pasang pada *block holder* yang telah ditetesi *tissue tex*, tunggu membeku dan jaringan siap dipotong.
8. *Block holder* dipasang pada tempatnya kemudian ketebalan potongan diset pada $10\ \mu\text{m}$.
9. Potongan ditempelkan pada *object glass* yang telah diolesi *poly l-lysin*.
10. Jaringan diangin-anginkan dan siap diwarnai.
11. Jika hasil potongan tidak segera diwarnai, disimpan dulu dalam kotak dan ditaruh pada suhu -80°C .

2) Pengecatan Jaringan

a. Pengecatan dengan *Picrosirius Red*

Untuk melihat histomorfologi arteri koroner ada tidaknya disintegrasi kolagen dan ketebalan dinding arteri koroner pada penelitian ini menggunakan pengecatan *Picrosirius Red*. Teknik pengecatan yang dilakukan adalah sesuai dengan standar protokol pengecatan *Picrosirius Red*. Metode pengecatan *Picrosirius Red* sebagai berikut:

1. Preparat direndam dalam aquadest selama 15 menit.
2. Preparat diwarnai dengan larutan *Picrosirius Red* pekat selama 60 menit (pastikan jaringan terendam seluruhnya).
3. Preparat dicelupkan sebanyak 2 kali kedalam 2 larutan asam (asamasetat) yang berbeda.

4. Bilas dengan alcoholabsolutedalamwadah.
 5. Preparat direndam sebanyak 2 kali kedalamalcoholabsolut yang berbeda selama masing-masingtigaamenit.
 6. Bersihkan*object glass* di sekitarjaringandengan tissue.
 7. *Mounting* menggunakan *Canadabalsem (entellan)* lalu ditutup dengancover *glass*.
- b. Pengecatan dengan Sudan IV

Untuk melihat disintegrasi endotel pada dinding arteri koroner digunakan pengecatan Sudan IV. Prosedur pengecatan dengan menggunakan larutan Sudan IV, yaitu :

1. Keluarkan preparat jaringan dari lemari es, biarkan dalam suhu ruang selama 30-60 menit.
2. Fiksasi jaringan dengan meneteskan preparat jaringan dengan PBS dan biarkan selama 3 menit, lalu meneteskan dengan PBS + formalin 10% dan biarkan selama 3 menit, lalu meneteskan preparat dengan PBS dan biarkan selama 3 menit, terakhir keringkan selama 30-60 menit.
3. Bilas dengan aquades.
4. Teteskan preparat jaringan 2 kali dengan *propylane glycol* 100%, masing-masing biarkan selama 5 menit.
5. Teteskan larutan Sudan IV secukupnya di atas preparat jaringan dan biarkan selama 7 menit.
6. Teteskan preparat jaringan dengan *propylane glycol* 85% selama 3 menit.
7. Bilas dengan aquades.
8. Lakukan pengecatan *Mayer's Hematoxilin* selama 30 detik.
9. Bilas di air mengalir hingga bersih.
10. Bilas preparat jaringan dengan aquades.
11. *Mounting* menggunakan *gliserin jelly* lalu ditutup dengan *cover glass*.

3.8.7 Tahap Pengamatan

1. Pengamatan Rahang Periodontitis.

Pengamatan periodontitis pada rahang ditandai dengan adanya resorpsi tulang alveolar melalui foto klinis dan foto radiologis. Pada foto klinis tampak puncak alveolar yang lebih ke apikal dari CEJ (*Cemento Enamel Junction*). Pada foto radiologis ditandai dengan adanya radiolusensi area tulang alveolar.

2. Pengukuran Ketebalan Dinding Arteri Koroner (Histometrik)

Pengukuran ketebalan dinding arteri koroner menggunakan alat mikrometer grade dalam mikrometer (μm). Pengukuran dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x dan optilab. Ketebalan dinding arteri koroner diukur dari lapisan intima sampai lapisan media (*Intima-Media thickness*). Daerah yang dilakukan pengukuran adalah daerah yang paling tebal. Selanjutnya dilakukan penghitungan nilai rata-rata ketebalan dinding arteri koroner sehingga didapatkan data kuantitatif.

3. Pengamatan Disintegrasi Endotel

Pengamatan gambaran histomorfologik disintegrasi endotel pada dinding arteri koroner dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dan optilab. Dalam setiap preparat, terdapat 1 arteri sehingga ada 16 arteri sebagai sampel penelitian pada setiap kelompok. Arteri yang terdapat disintegrasi endotel terlihat adanya kerusakan (*injury*) endotel pada lapisan tunika intima dari arteri koroner. Morfologi dinding arteri normal tidak terdapat disintegrasi endotel yang telah dilakukan pengecatan *Sudan IV*. Pada arteri yang diamati, jika ditemui adanya disintegrasi endotel diberi skor 1, sedangkan jika tidak ditemui adanya disintegrasi endotel diberi skor 0 sehingga didapatkan data kualitatif.

4. Pengamatan Disintegrasi Kolagen Intimal

Pengamatan gambaran histomorfologik disintegrasi kolagen intimal pada dinding arteri koroner dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dan optilab. Dalam setiap preparat, terdapat 1 arteri sehingga ada 16 arteri sebagai sampel penelitian pada setiap kelompok. Pengamatan disintegrasi kolagen intimal dilakukan pada tiap-tiap arteri dengan menentukan ada/tidaknya gambaran disintegrasi kolagen intimal pada dinding arteri pada setiap spesimen. Arteri yang terdapat disintegrasi

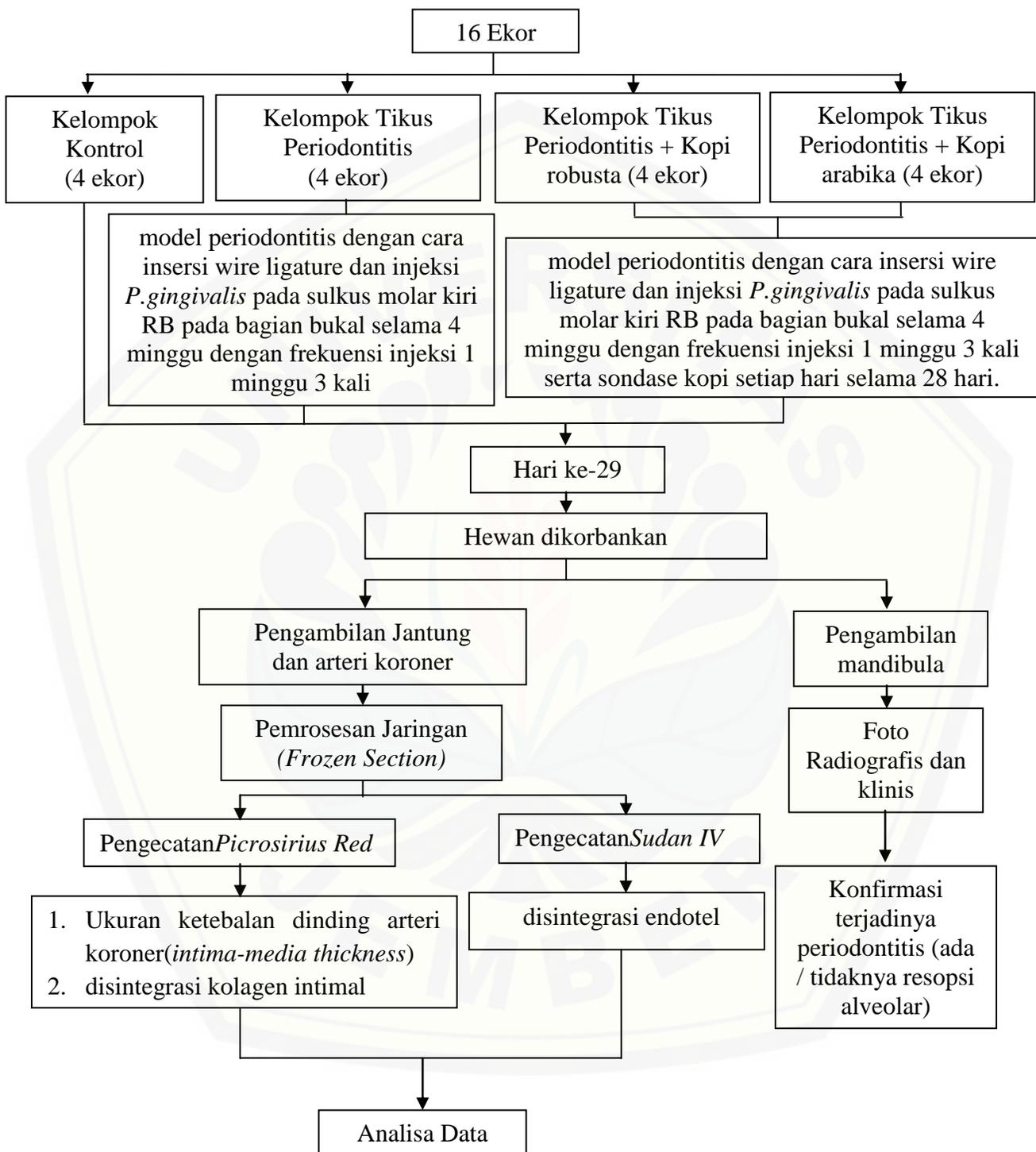
kolagen intimal ditandai oleh penipisan/diskontinuitas kolagen intimal. Pada arteri yang diamati, jika ditemui adanya disintegrasi kolagen intimal diberi skor 1, sedangkan jika tidak ditemui adanya disintegrasi kolagen intimal diberi skor 0 sehingga didapatkan data kualitatif.

3.9 Analisa Data

Data ketebalan dinding arteri koroner diujinormalitas terlebih dahulu untuk mengetahui data berdistribusi normal, menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Kemudian dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui varian data homogen atau tidak menggunakan Uji *Levene*. Setelah diketahui bahwa data terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji parametrik *One Way ANOVA* dengan tingkat kesalahan yang dapat ditoleransi sebesar 5%. Uji *One Way ANOVA* dilakukan karena penelitian ini termasuk penelitian komparatif dengan skala data numerik lebih dari 2 kelompok, dan data tidak berpasangan. Selanjutnya dilakukan uji lanjutan dengan Uji LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

Pengamatan disintegrasi endotel dan disintegrasi kolagen intimal merupakan data non parametrik. Adanya kelainan masing-masing diberi skor 1, sedangkan spesimen yang tidak ditemui adanya kelainan diberi skor 0. Adanya disintegrasi endotel dan disintegrasi kolagen intimal dihitung dan hasil dinyatakan sebagai presentase terbentuknya aterosklerosis pada arteri koroner.

3.10 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Konsumsi menghambat pembentukan lesi aterosklerosis pada model tikus periodontitis yang di tunjukan dengan menghambat penebalan dinding arteri dan menghambat terbentuknya disintegrasi kolagen intimal dan disintegrasi endotel.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan yaitu pada penelitian selanjutnya perlu dilengkapi dengan mengukur tingkat keparahan periodontitis, derajat inflamasi sistemik, derajat bakteremi dan antigen sirkulasi yang terjadi pada model tikus periodontitis. Juga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kandungan tertentu dari kopi yang mempengaruhi penghambatan pembentukan lesi aterosklerosis, serta dosis kopi, lama pemberian konsumsi kopi, dan jenis kopi lain yang digunakan dalam penelitian.

Daftar Pustaka

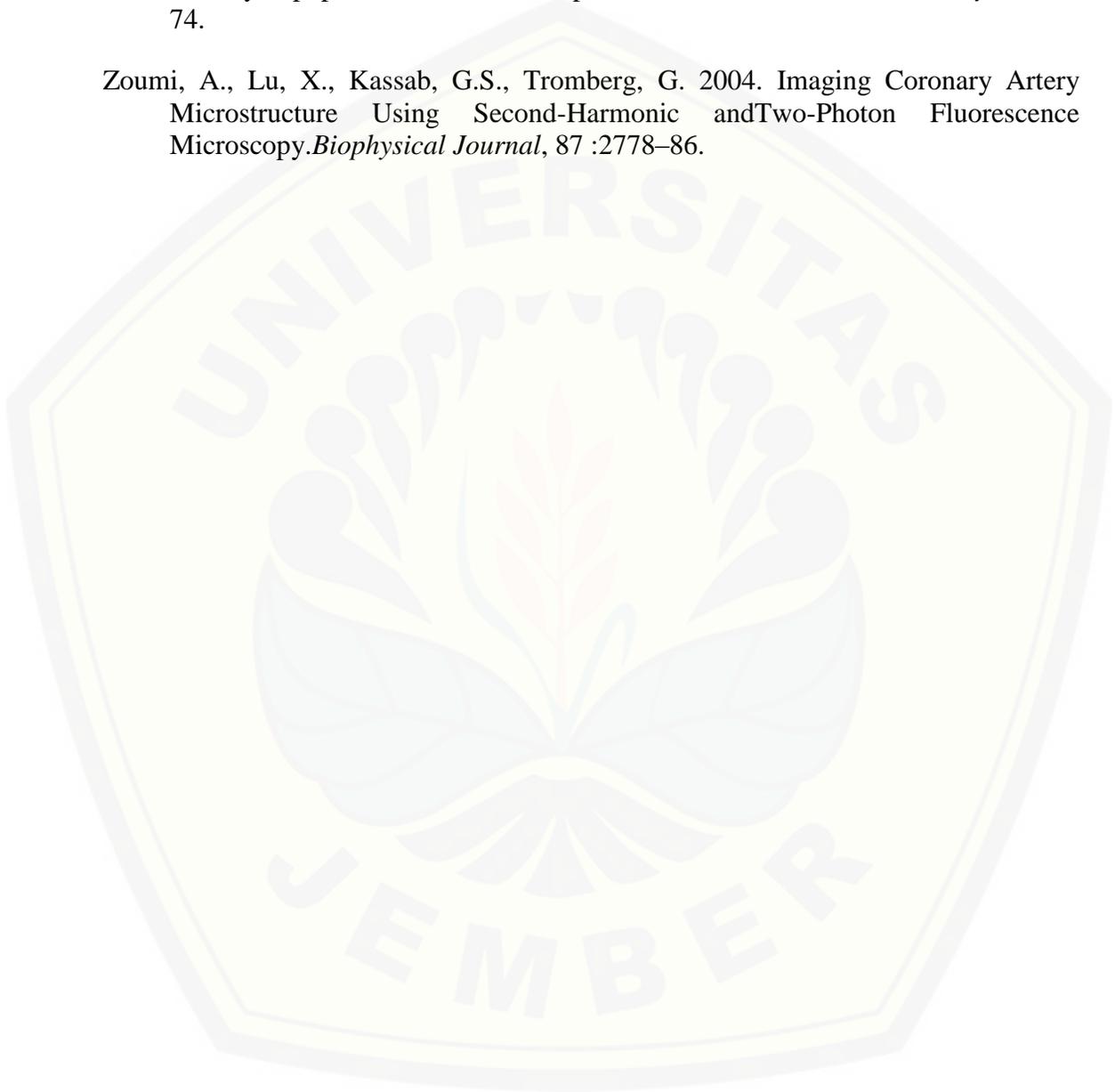
- Andrew, C.N., Sarah, J.G., Ismail, Y., Johnson, J.L., Newby, G.B., Thomas, A.C. 2009. Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foamcell phenotypes. *Thromb Haemost*, 101(6): 1006–1011.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2013. *Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013: Laporan Nasional*. Jakarta: Badan Litbangkes Depkes.
- Bartova, J., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Mysak, J., Prochazkova, J., Duskova J., Janatova, T., Podzimek, S. 2014. Periodontitis as a Risk Factor of Atherosclerosis. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Immunology Research*.
- Beck, J.D., Eke, P., Heiss, G. 2005. Coronary Heart Disease : Periodontal Disease and Coronary Heart Disease, A Reappraisal of the Exposure. *Circulation Publishing*, 112: 19-24.
- Buscemi, S., Galvano, F., Volti, G.L., Grosso, G. 2014. Coffee components and cardiovascular risk: Beneficial and detrimental effects. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*.
- Child, G.V. 2014. Histology of artery. Microanatomy.net. [diunduh pada tanggal 16 januari 2017].
- Chun, Y-H.P., Chun, K-R.J., Olguin, D.A., Wang, H-L. 2005. Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis. *Journal Periodont Res*, 40:87–95.
- Dalager, S., Paaske, W.P., Kristensen, I.B., Laurberg, J.M., Erling, Falk. 2007. Artery-Related Differences in Atherosclerosis Expression Implications for Atherogenesis and Dynamics in Intima Media Thickness. *Stroke journal*, 38:2698-2705.
- Daniel, W. 2005. *Biostatic Foundation for Analysis in The Health Sciences*. Eight Edition. Georgia: Willey.
- Dorland, W.A. 2006. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi 29. Jakarta : EGC.
- Echeverri, D., Montes, F.R., Cabrera, M., Gal'an, A., Prieto, A. 2010. Caffeine's Vascular Mechanisms of Action. *International Journal of Vascular Medicine*.
- Engstrom, K. 2015. Coffee Consumption and Cardiovascular Disease Risk: What Should We Tell Our Patients? *Einstein Journal Biology Medical*, 30:34-36.

- Eroschenko, V.P. 2008. *diFiore's Atlas of Histology with The Function Correlation eleventh edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Philedelphia.
- Farah, A. 2012. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention*. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Fliser, D., Wiecek, A., Suleymanlar, G., Ortiz, A., Massy, Z., Lindholm, B. 2011. The dysfunctional endothelium in CKD and incardiovascular disease: mapping the origin(s) ofcardiovascular problems in CKD and of kidneydisease in cardiovascular conditions for a researchagenda. *Kidney International Supplements*, 1:6–9.
- Fonseca, A.L., Lima, F.W., Couto, R.D. 2014. The action of Metaloproteinases in the Atherosclerotic Diseases. *ABCS Health Science*, 39(3):186-193.
- Hajishengallis, G. 2015. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, 15(1): 30–44.
- Hall, S., Desbrow, B., Anoopkumar-Dukie, S. 2015. A review of the bioactivity of coffee, caffeine and key coffee constituents on inflammatory responses linked to depression. *Food Research International*, 76: 626–636.
- Hiroshi, A. 2006. Metabolism of alkaloids in coffee plants. *Brazil Journal PlantPhysiol*, 18(1).
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., Prochazkova, J., Duskova, J. 2014. Porphyromonas gingivalis: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research, Hindawi Publishing Corporation*.
- Ji, S., Choi, Y.S., Choi, Y. 2015. Bacterial invasion and persistence: critical events in thepathogenesis of periodontitis? *Journal Periodont Res*, 50: 570–585.
- John, R.M., Gray, K., Figg, N., Kumar, S., Bennett, M.R. 2012. The Methyl Xanthine Caffeine Inhibits DNA Damage Signaling and Reactive Species and Reduces Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32:2461-2467.
- Karthikesan, K., Pari, L., Menon, V.P. 2010. Antihyperlipidemic effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. *Chem Biol Interact*, 188:643–650.
- Keche, A.S., Tirpude, B.H., Bobade, H.J. 2012. Correlation of Risk Factors with Coronary Atherosclerosis. *Journal Indian Academic Forensic Medical* 34:2.

- Lee, K., Lee, B.J., Bu, Y. 2015. Protective Effects of Dihydrocaffeic Acid, a Coffee Component Metabolite, on a Focal Cerebral Ischemia Rat Model. *Molecules*, 20:11930-40.
- Liang, N., Kitts, D.D. 2015. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients journal*.
- Libby, P., Ridker, P.M., Hansson, G.K. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Macmillan Publishers Limited*, 473: 317-25.
- Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., Wang, Z. 2011. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *Journal of Food science* 76(6):398-403.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., Hu, Y. 2013. Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. *Hindawi Publishing Corporation*.
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, P., Bartova, J., Janatova, Prochazkova, T.J., Duskova, J. 2014. Porphyromonas gingivalis: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Hindawi Publishing Corporation, Journal of Immunology Research* 14: 8.
- Nafilah R, Prasetya RC, Susilawati IDA. 2015. *Deteksi Lesi Aterosklerosis Koroner pada Model Tikus Periodontitis*. e-Jurnal Pustaka Kesehatan 3(2).
- Newman, M.G., Takei, H.I., Klokkevold, P.R., Carranza, F.A. 2012. *Carranza's Clinical Periodontology 11th ed*. The Curtis Center Independence Square West : Philadelphia.
- Notoatmojo, S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan Cetakan Ketiga*. Jakarta : Rineka Pustaka.
- Ochiai TK, Jia J, Cai Y, Yamaguchi Y, Yamamoto M. 2015. Periodontal Disease-Induced Atherosclerosis and Oxidative Stress. *Antioxidants MDPI journal*, 4:577-590.
- Olsen, I., Shah, H., Gharbia, S.E. 1999. Taxonomy and Biomechanical Characteristics of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. *Periodontology*, 20: 14-52.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis and Inflammatory Disease. *Am Heart J*, 340: 115-126.
- Ross, R. 2004. Atherosclerosis and Inflammatory Disease. *New England: Med*.

- Shan, J., Fu, J., Zhao, Z., Kong, X., Huang, H., Luo, L., Yin, Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *Int. Immunopharmacol*, 9:1042–1048.
- Solange, I., Mussatto, Ercília, M.S., Machado, Martins, S., José, A., Teixeira. 2011. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol*, 4:661–672.
- Spagnoli, L.G., Bonanno, E., Sangiorgi, G., Mauriello, A. 2007. Role of Inflammation in Atherosclerosis. *the journal of nuclear medicine*, 48(11):1800–1815.
- Spyridopoulos, I., Fichtlscherer, S., Popp, R. 2008. Caffeine enhances endothelial repair by an AMPK-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1967–74.
- Suryohudoyo, P. 2002. *Kapita Selektta Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta : CV Sagung Seto.
- Susilawati, I.D.A., Suryono, Ermawati, T. 2013. Kajian Efek Kopi Pada Periodontitis Dan Atherosclerosis. *Penelitian Fundamental DP2M Dikti*.
- Susilawati, I.D.A, Suryono, Ermawati, T. 2014. Protective effect of coffee Against Coronary Atherosclerosis in Periodontitis Rat Model. *Journal of the Hongkong College of Cardiology*.
- Tomofuji, T., Azuma, T., Kusano, H., Sanbe, T., Ekuni, D., Tamaki, N., Yamamoto, T., Watanabe, T. 2006. Oxidative damage of periodontal tissue in the rat periodontitis model: Effects of a high-cholesterol diet. *FEBS Lett*, 580:3601–3604.
- Umemura, T., Ueda, K., Nishioka, K. 2006. Effects of acute administration of caffeine on vascular function. *American Journal of Cardiology*, 98(11):1538–41.
- Universitas Jember. 2012. *Pedoman Penulisan Karya Ilmiah*. Jember: Badan Penerbit Universitas Jember.
- Vogiati, G., Tousoulis, D., Stefanadis, C. 2009. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic Journal Cardiol* 50(5):402-409.
- World Health Organization (WHO). 2008. *Prevention of Cardiovascular Disease*. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

- Yashin, A., Yashin, Y., Wang, J.Y., Nemzer, B. 2013. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Antioxidants Journal*, 2;230-24.
- Yukawa, G.S., Mune, M., Otani, H., Tone, Y., Liang, X.M., Iwahashi, H., Sakamoto, W. 2004. Effects of Coffee Consumption on Oxidative Susceptibility of Low-Density Lipoproteins and Serum Lipid Levels in Humans. *Biochemistry*, 69:70-74.
- Zoumi, A., Lu, X., Kassab, G.S., Tromberg, G. 2004. Imaging Coronary Artery Microstructure Using Second-Harmonic and Two-Photon Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal*, 87 :2778–86.



LAMPIRAN A. Sertifikat *Ethical Clearance* Penelitian

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**
ETHICAL APPROVAL

Nomor : 100/H25.1.11/KE/2016

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

ANALISIS EFEK KONSUMSI SEDUHAN KOPI TERHADAP KADAR ADRENALIN, INFLAMASI SISTEMIK, LAJU ENDAP DARAH, AGREGASI PLATELET, DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI LESI ATEROSKLEROSIS PADA ARTERI KORONER, RENALIS, FEMORALIS TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*) PERIODONTITIS

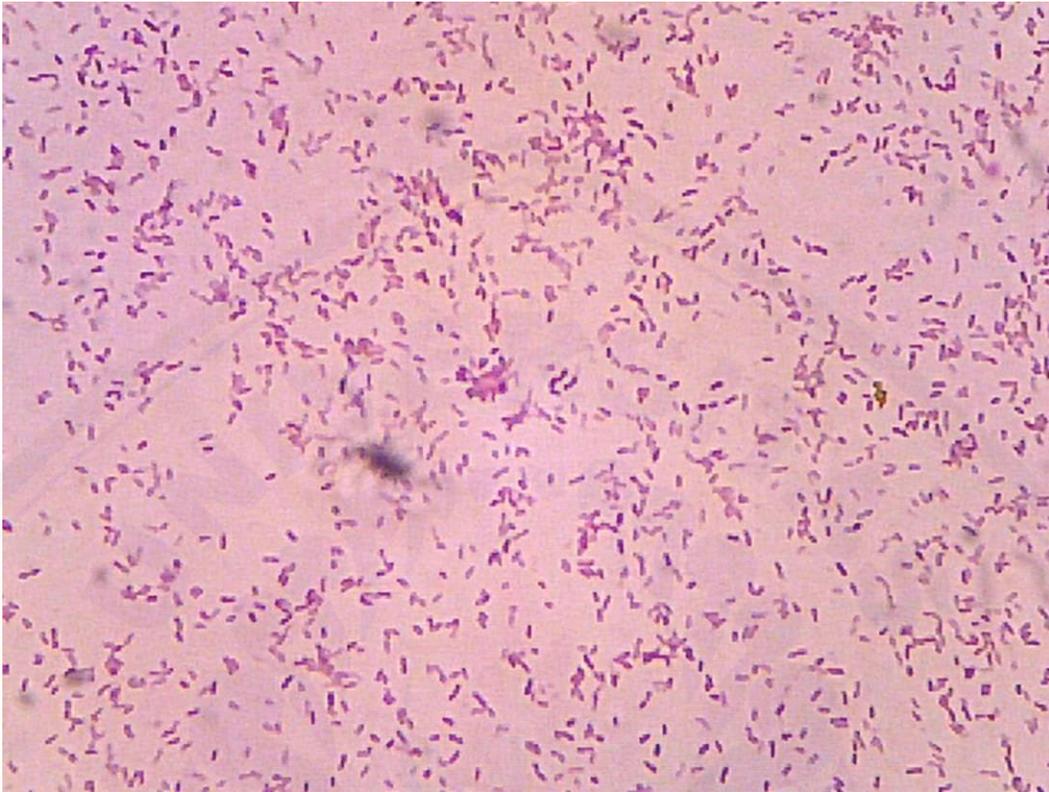
Nama Peneliti Utama : Dr. Drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 21 Des 2016

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Lampiran B. Identifikasi bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Gambar A. Hasil uji identifikasi *P. gingivalis* menunjukkan bakteri gram negatif dengan pewarnaan gram. Keterangan : bakteri bacillus gram negatif dengan pengamatan mikroskop perbesaran 1000x.

LAMPIRAN C. Surat Identifikasi Bakteri



LABORATORIUM MIKROBIOLOGI
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER

SURAT KETERANGAN
No. 0112 / MIKRO/ S.KET/ 2016

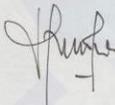
Sehubungan dengan keperluan identifikasi mikroorganisme, maka kami menerangkan bahwa mahasiswa berikut:

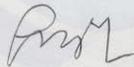
Nama : Christian Agung Prasetya
NIM : 131610101080
Fakultas : Kedokteran Gigi
Keperluan : Identifikasi bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Telah melakukan uji identifikasi terhadap isolat bakteri *Porphyromonas gingivalis* dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan sel bakteri basillus *Gram negatif* dan tidak terkontaminasi.

Jember, 23 Desember 2016

Mengetahui,
Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi Penanggung Jawab Lab.Mikrobiologi

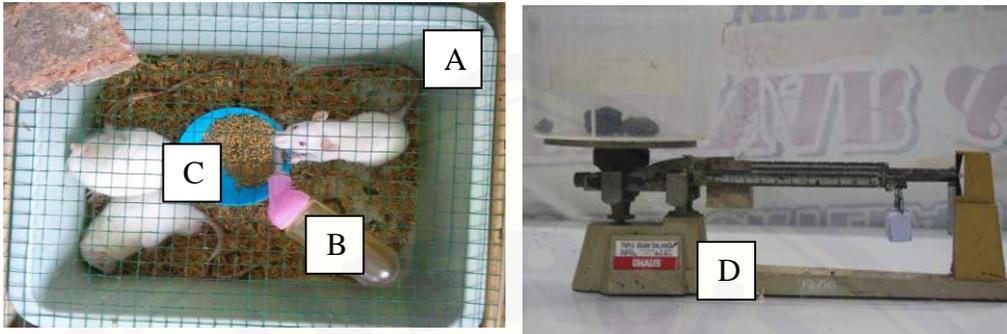

(drg. Suhartini, M.Biotech)
NIP. 197909262006042002


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

LAMPIRAN D. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian

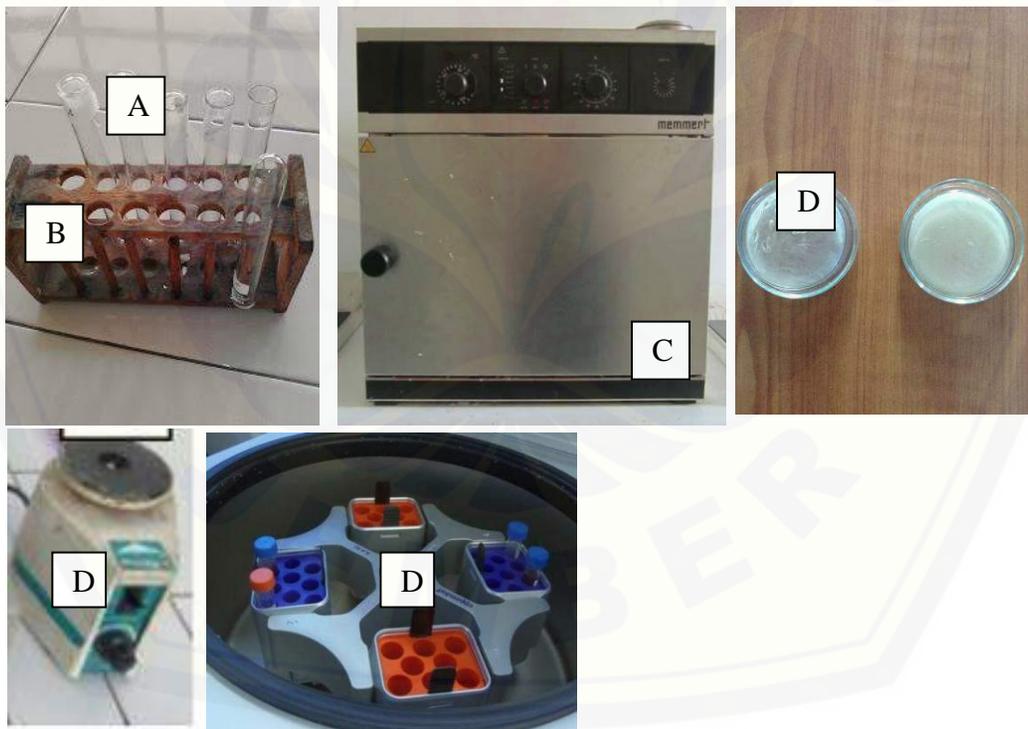
a. Alat pemeliharaan hewan coba



Keterangan :

- A. kandang
- B. Tempat minum
- C. Tempat makan
- D. Neraca

b. Alat untuk kultur bakteri *Porphyromonas gingivalis*

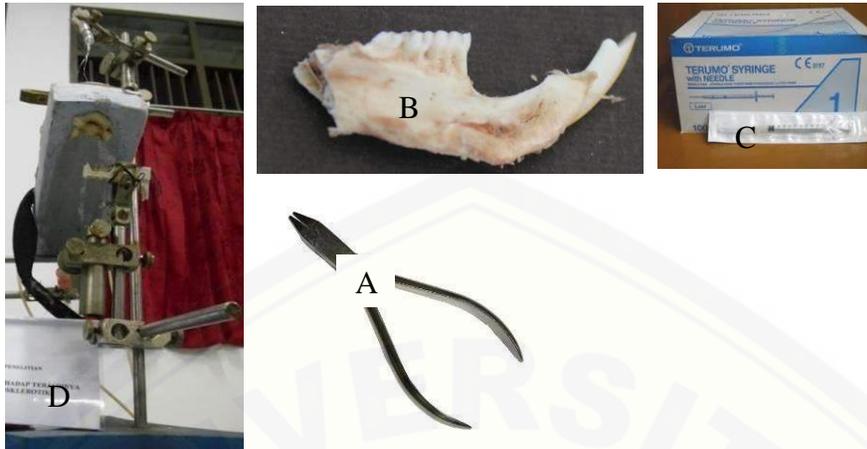


Keterangan :

- A. Tabung reaksi
- B. Rak tabung reaksi
- C. Autoclave

- D. Petridisk tidak bersekat
- E. Vibrator
- F. Centrifuge

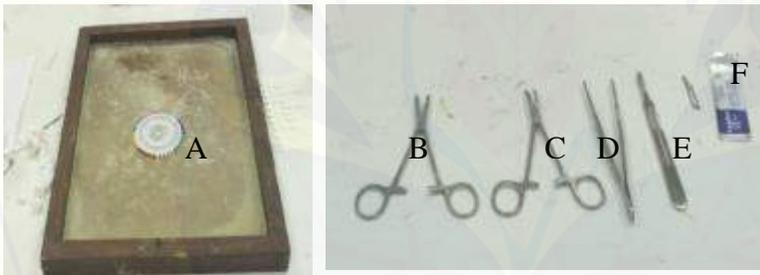
c. Alat untuk induksi periodontitis



Keterangan :

- A. Tang
- B. Model rahang
- C. Jarum tuberkulin
- D. *Dental rat*

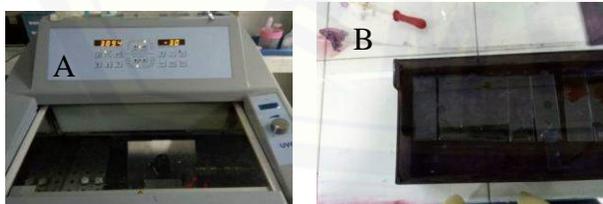
d. Alat untuk bedah tikus



Keterangan :

- A. Papan Fiksasi
- B. Jarum Pentul
- C. Gunting Bedah
- D. Pinset Anatomi
- E. *Scalpel*
- F. *Blade Scalpel*

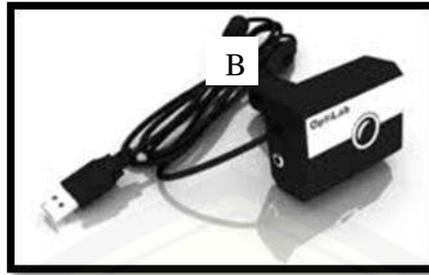
e. Alat untuk prosesi jaringan dan pengecatan



Keterangan :

- A. *Cryostat*
- B. Rak pengecatan

f. Alat untuk pengamatan

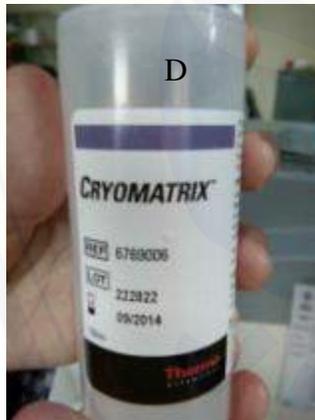
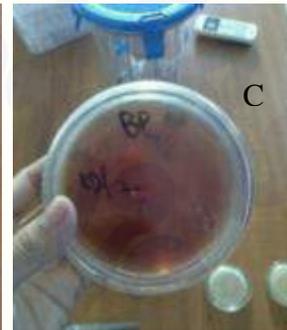
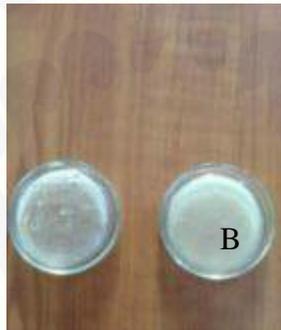


Keterangan :

A. Mikroskop

B. Optilab

2. Bahan Penelitian



Keterangan :

A. Tikus wistar (*Rattus norvegicus*)

B. Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

C. Media Blood agar

D. Cryomatrix

E. Xylol

F. Propylen glicol

G. Alkohol 90%

H. Alkohol 97%

I. Gliserin gel

J. Sudan IV stain

K. *Picrosirious rad stain*

LAMPIRAN E. Prosedur Penelitian



Adaptasi hewan coba



Pemasangan *wire ligature* pada mesial gigi molar satu rahang bawah dan Injeksi bakteri *Porphyromonas gingivalis*



pembuatan seduan kopi dan sondase



Inhalasi klorofom



Tikus dikorbankan dan Pengambilan jantung



Fiksasi dan penyimpanan jaringan

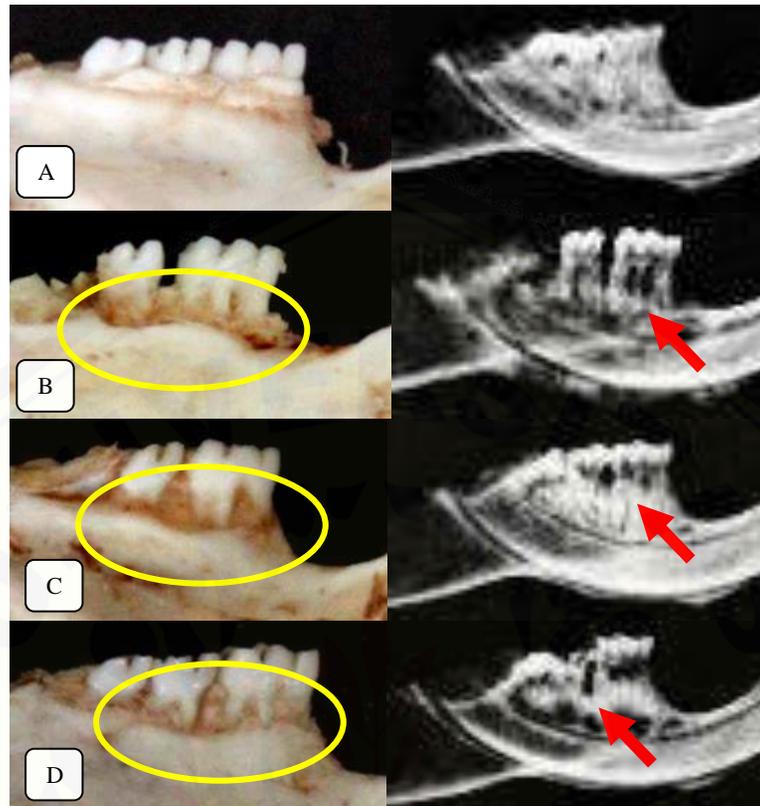


Frozen section



Pewarnaan dan pengamatan

Lampiran F. Foto Klinis dan Radiografis Mandibula Kiri Tikus

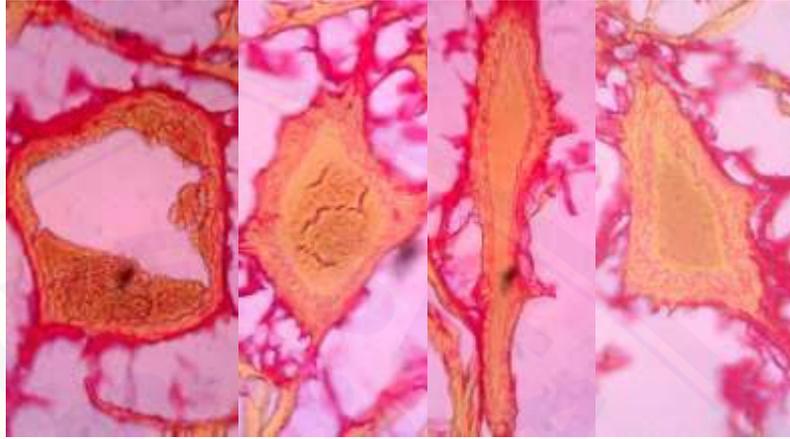


Gambar 4.1 Foto klinis dan radiografis mandibula kiri tikus. (A) kelompok kontrol menunjukkan tulang alveolar dalam keadaan normal dan tidak mengalami resorpsi, (B) kelompok periodontitis menunjukkan adanya resorpsi tulang alveolar yang ditandai posisi *alveolar crest* lebih ke apikal dari CEJ (area dilingkari) dan terlihat adanya daerah radiolusensi pada tulang alveolar pada foto radiografis (tanda panah), (C) kelompok periodontitis dan kopi robusta menunjukkan adanya resorpsi tulang alveolar (area dilingkari) dan terlihat adanya daerah radiolusensi pada tulang alveolar pada foto radiografis (tanda panah), dan (D) kelompok periodontitis dan kopi arabika menunjukkan adanya resorpsi tulang alveolar (area dilingkari) dan terlihat adanya daerah radiolusensi pada tulang alveolar pada foto radiografis (tanda panah).

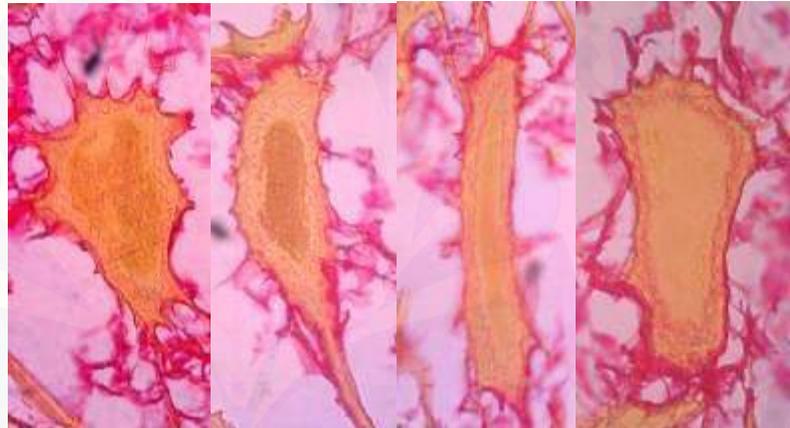
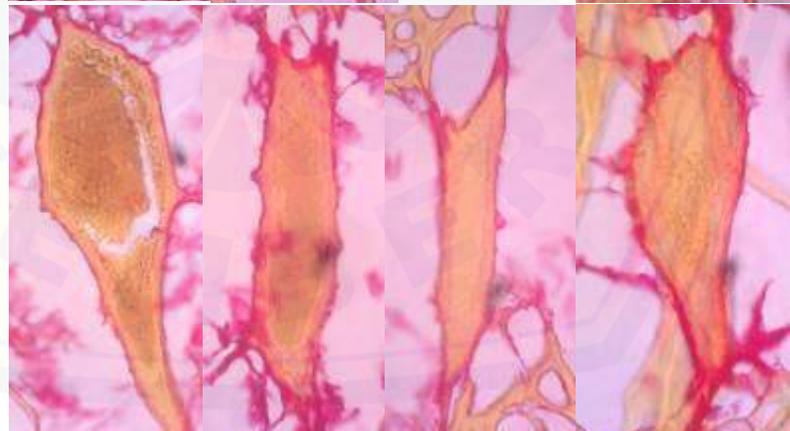
Lampiran G.Data hasil penelitian

a. Gambaran histologis arteri koroner tikus dengan pewarnaan *Picrosirius Red* (400x)

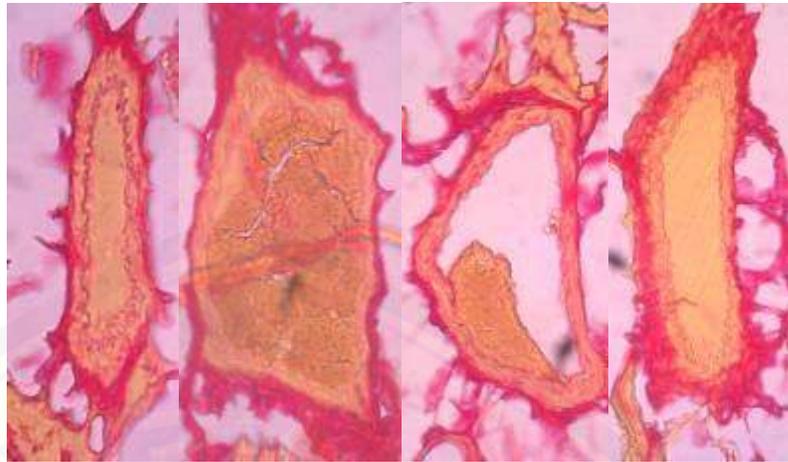
Kontrol



Periodontitis

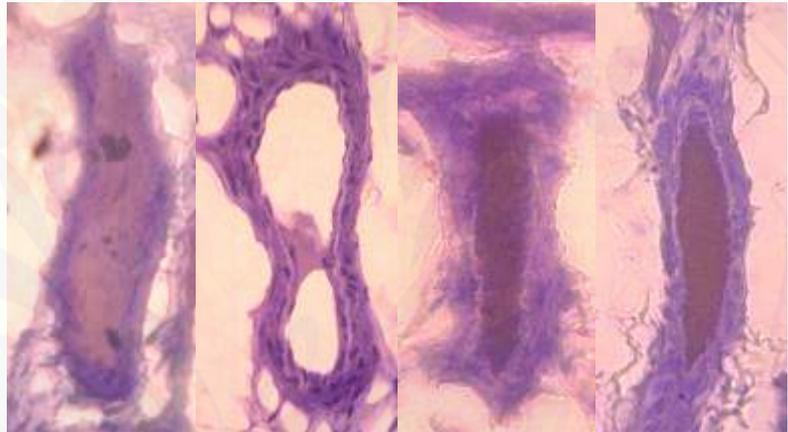
Periodontitis +
kopi robusta

Periodontitis +
kopi arabika

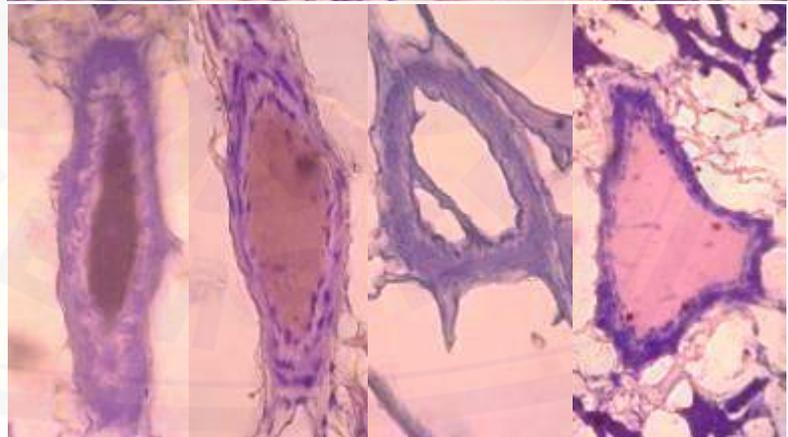


b. Gambaran histologis arteri koroner tikus dengan pewarnaan Sudan IV (100x)

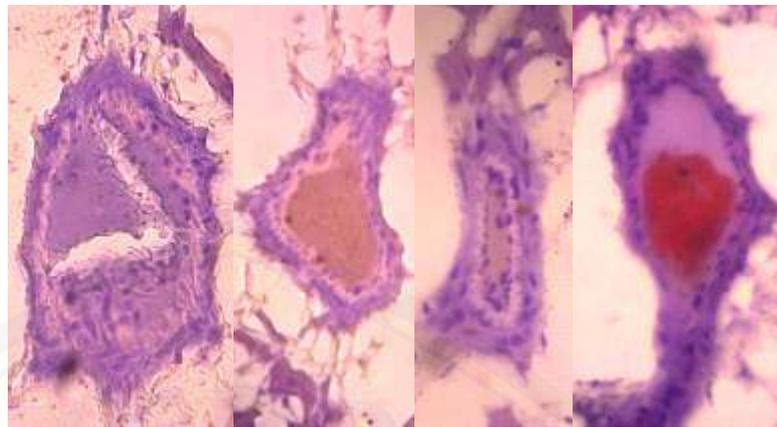
kontrol



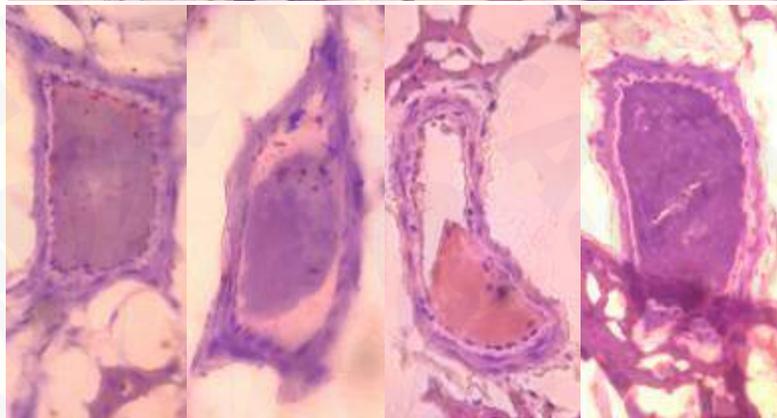
Periodontitis



Periodontitis +
kopi robusta



Periodontitis +
kopi arabika



c. Tabel Hasil Pengukuran IMT dinding arteri koroner (Pengecatan *Picrosirius Red* perbesaran 400x)

Kelompok	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-rata	SD
KJ 1	7.84	6.79	6.42	7.02	0.73
KJ 2	8.45	7.51	7.75	7.90	0.48
KJ 3	11.39	11.41	11.05	11.28	0.2
KJ 4	11.00	11.31	11.86	11.39	0.43
PJ 1	17.87	17.85	17.54	17.75	0.18
PJ 2	16.46	15.96	15.82	16.08	0.33
PJ 3	16.18	17.21	17.72	17.03	0.78
PJ 4	18.27	18.92	18.97	18.72	0.39
RJ 1	13.89	12.58	11.36	12.61	1,26
RJ 2	11.03	11.12	11.32	11.16	0,14
RJ 3	12.18	12.74	12.39	12.43	0,28
RJ 4	11.38	12.01	11.13	11.51	0,45
AJ 1	13.44	13.69	13.38	13.50	0.16
AJ 2	14.55	14.79	14.10	14.48	0.35
AJ 3	12.34	11.69	11.79	12.03	0.35
AJ 4	12.53	12.53	12.63	12.56	0.05

d. Tabel Pengamatan Disintegrasi Kolagen Intimal (Pengecatan *Picrosirius Red* perbesaran 1000x)

Kelompok	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Hasil
KJ 1	0	0	0	0
KJ 2	0	0	0	0
KJ 3	1	1	1	1
KJ 4	0	0	0	0
PJ 1	1	1	1	1
PJ 2	1	1	1	1
PJ 3	1	1	1	1
PJ 4	1	1	1	1
RJ 1	1	1	1	1
RJ 2	1	1	1	1
RJ 3	0	0	0	0
RJ 4	0	0	0	0
AJ 1	0	0	0	0
AJ 2	1	0	1	1
AJ 3	0	0	0	0
AJ 4	1	1	1	1

Jumlah:

1. Kontrol : 1
2. Periodontitis : 4
3. Periodontitis dan kopi robusta : 2
4. Periodontitis dan kopi arabika : 2

Keterangan:

0 = tidak ditemukan disintegrasi kolagen intimal

1 = ditemukan disintegrasi kolagen intimal

e. Tabel Pengamatan Disintegrasi Endotel (Pengecatan *Sudan IV Hematoxilin* perbesaran 1000x)

Kelompok	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Hasil
KJ 1	0	0	0	0
KJ 2	0	0	0	0
KJ 3	0	0	0	0
KJ 4	1	1	1	1
PJ 1	1	1	1	1
PJ 2	1	1	1	1
PJ 3	1	1	1	1
PJ 4	1	1	1	1
RJ 1	1	1	1	1
RJ 2	1	1	1	1
RJ 3	0	0	0	0
RJ 4	1	1	1	1
AJ 1	0	0	0	0
AJ 2	1	1	1	1
AJ 3	1	1	1	1
AJ 4	1	1	1	1

Jumlah:

1. Kontrol : 1
2. Periodontitis : 4
3. Periodontitis dan kopi robusta : 3
4. Periodontitis dan kopi arabika : 3

Keterangan:

0 = tidak ditemukan disintegrasi kolagen intimal

1 = ditemukan disintegrasi kolagen intimal

Pengamat 1



Christian Agung Prasetya
131610101080

Pengamat 2



Usnida Mubarokah
131610101096

Pengamat 3



Cholida Rahmatia
131610101058

Lampiran H. Hasil Uji Statistik

a. Hasil Uji Statistik Parameter TIM Arteri Karotis

Tests of Normality

kode		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
perlakuan	kontrol	.825	4	.155
	periodontitis	.999	4	.998
	periodontitisrobusta	.892	4	.392
	periodontitisarabika	.969	4	.837

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji homogenitas *Levene*

Test of Homogeneity of Variances

perlakuan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.600	3	12	.003

c. Uji beda *One Way ANOVA*

ANOVA

perlakuan	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	133.839	3	44.613	22.188	.000
Within Groups	24.128	12	2.011		
Total	157.968	15			

d. Uji lanjut *Least Significant Difference***Multiple Comparisons**

perlakuan

LSD

(I) kode	(J) kode	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	periodontitis	-7.99750*	1.00267	.000	-10.1821	-5.8129
	periodontitisrobusta	-2.53000*	1.00267	.027	-4.7146	-.3454
	periodontitisarabika	-3.74500*	1.00267	.003	-5.9296	-1.5604
Periodontitis	kontrol	7.99750*	1.00267	.000	5.8129	10.1821
	periodontitisrobusta	5.46750*	1.00267	.000	3.2829	7.6521
	periodontitisarabika	4.25250*	1.00267	.001	2.0679	6.4371
periodontitisrobusta	kontrol	2.53000*	1.00267	.027	.3454	4.7146
	periodontitis	-5.46750*	1.00267	.000	-7.6521	-3.2829
	periodontitisarabika	-1.21500	1.00267	.249	-3.3996	.9696
periodontitisarabika	kontrol	3.74500*	1.00267	.003	1.5604	5.9296
	periodontitis	-4.25250*	1.00267	.001	-6.4371	-2.0679
	periodontitisrobusta	1.21500	1.00267	.249	-.9696	3.3996

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

LAMPIRAN I. Surat Ijin Penelitian


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

Nomor : 295/UN25.8.TL/2016
 Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth.
 Ka. Bag. BIOMEDIK FKG 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 di bawah ini :

1. Nama	: Christian Agung Prasetya
2. NIM	: 131610101080
3. Tahun Akademik	: 2016/2017
4. Fakultas	: Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat	: Perum. Mastrip K 4 Jember
6. Judul Penelitian	: Analisis Efek Konsumsi Seduhan Kopi Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Koroner Pada Model Tikus Periodontitis
7. Lokasi Penelitian	: Lab. Histologi FKG Universitas Jember
8. Data/Alat yg dipinjam	: Alat untuk pewarnaan dan pengamatan jaringan
9. Waktu	: Oktober 2016 s/d Selesai
10. Tujuan Penelitian	: Untuk Mengetahui Analisis Efek Konsumsi Seduhan Kopi Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Koroner Pada Model Tikus Periodontitis
11. Dosen Pembimbing	: 1. Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes 2. drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 28 SEP 2016
 an. Dekan
 Pembantu Dekan I


 Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
 NIM 1316109031986022001



PEMERINTAH KABUPATEN JEMBER
RUMAH SAKIT DAERAH dr. SOEBANDI JEMBER
 Jl. dr. Soebandi No. 124 Telp. (0331) 487441 fax. (0331) 487564
 J E M B E R 68111



Nomor :
 Perihal : Keterangan Penelitian

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan Skripsi maka, dengan hormat kami menerangkan bahwa mahasiswa dibawah ini :

1. Nama : Christian Agung Prasetya
2. NIM : 131610101080
3. Tahun Akademik : 2016/2017
4. Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat : Perum. Mastrip K 4 Jember
6. Judul Penelitian : Analisis Efek Konsumsi Seduhan Kopi Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Koroner Pada Model Tikus Periodontitis
7. Lokasi Penelitian : Laboratorium Patologi Anatomi RSUD dr. Soebandi Jember
8. Waktu : November 2016
9. Tujuan : Untuk menganalisa Efek Konsumsi Seduhan Kopi Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Koroner Pada Model Tikus Periodontitis
10. Dosen Pembimbing : 1. Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
 2. drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed

Telah melakukan proses *frozen section* menggunakan organ tikus wistar (*Rattus norvegicus*).

Jember, 15 November 2016
 Ka. Inst. Lab. Patologi Anatomi


 dr. Jane Kosasih, SpPA
 NIP 19800520 201412 2 001



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

Nomor : 4167 /UN25.8.TL/2016
Perihal : Ijin Penelitian

01 DEC 2016

Kepada Yth
Kepala Bagian Laboratorium Biomedik
Fakultas Kedokteran Gigi 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 | : Christian Agung Prasetya |
| 2 | NIM | : 131610101080 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2016/2017 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Perum Bukit Permai J17 |
| 6 | Judul Penelitian | : Identifikasi Efek Konsumsi Kopi Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Koroner Pada Model Tikus Periodontitis |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboratorium Farmakologi FKG Universitas Jember |
| 8 | Data/alat yang dipinjam | : Kandang Tikus |
| 9 | Waktu | : Agustus – November 2016 |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Untuk Mengetahui Identifikasi Efek Konsumsi Kopi Terhadap Pembentukan Lesi Aterosklerosis Koroner Pada Model Tikus Periodontitis |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. Dr.drg. IDA Susilawati, M.Kes
: 2. drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an Dekan
Rekan Dekan I,


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