



**PENGARUH KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP  
EKSPRESI TNF  $\alpha$  PADA SEL ENDOTEL ARTERI  
KAROTIS TIKUS WISTAR YANG DI INDUKSI  
DIET TINGGI LEMAK**

**SKRIPSI**

Oleh

**Kanwangwang Dwi Nada Anggara  
NIM 141610101036**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**



**PENGARUH KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP  
EKSPRESI TNF  $\alpha$  PADA SEL ENDOTEL ARTERI  
KAROTIS TIKUS WISTAR YANG DI INDUKSI  
DIET TINGGI LEMAK**

**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 :

**Kanwangwang Dwi Nada Anggara  
NIM 141610101036**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT atas limpahan rahmat, hidayah, kemudahan dan berkah yang tiada habisnya;
2. Nabi Muhammad SAW, panutan dunia dan akhirat;
3. Ayahanda Jumari S.Pd., M.Pd, dan Ibunda dra Sri Indiati;
4. Kakakku Kanwangwang Wahyu Danar Tafakkur S.Or;
5. Adikku Duhita Tria Maulidia
6. Guru-guruku dari TK sampai dengan perguruan tinggi;
7. Almamater Fakultas kedokteran gigi Universitas Jember.

**MOTTO**

Selalu menjadi diri sendiri jauh lebih baik daripada menjadi orang lain meskipun mereka tampak lebih baik dari Anda.

Dan jika kamu menuruti kebanyakan orang-orang yang di muka bumi ini, niscaya mereka akan menyesatkanmu dari jalan Allah.

(Q.S. Al An'am : 116)<sup>\*)</sup>

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya. Ia mendapat pahala (dari kebajikan) yang diusahakannya dan ia mendapat siksa (dari kejahatan) yang dikerjakannya.

(Q.S. Albaqarah: 286)<sup>\*)</sup>

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2013. *AL-Qur'an dan Terjemahannya*.

Bandung: Diponegoro.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Kanwangwang Dwi Nada Anggara

Nim : 141610101036

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul " Pengaruh Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  Pada Sel Endotel Arteri Karotis Tikus Wistar Yang Di Induksi Diet Tinggi Lemak " adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun.

Jember, 22 Maret 2018

Yang menyatakan,

Kanwangwang Dwi Nada A

NIM 141610101036

**SKRIPSI**

**PENGARU KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*) TERHADAP EKSPRESI  
TNF- $\alpha$  PADA SEL ENDOTEL ARTERI KAROTIS TIKUS WISTAR YANG  
DI INDUKSI DIET TINGGI LEMAK**

Oleh :

**Kanwangwang Dwi Nada Anggara**

**NIM 141610101036**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Drg IDA Ratna Dewanti, M.Si

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Nadie Fatimatuzzahro, MD.Sc

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Pengaruh Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  Pada Sel Endotel Arteri Karotis Tikus Wistar Yang Di Induksi Diet Tinggi Lemak” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi pada;

Hari, tanggal : 22 Maret 2018

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

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

NIP. 197903252005012001

drg. Hengky Bowo Ardhiyanto, MD.Sc

NIP.197905052005011005

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

Prof. Dr. Drg IDA Ratna Dewanti, M.Si

NIP. 196705021997022001

drg. Nadie Fatimatuzzahro, MD.Sc

NIP. 198204242008012022

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember

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

NIP. 196901121996011001

## RINGKASAN

**Pengaruh kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada sel endotel arteri karotis tikus wistar yang di induksi diet tinggi lemak;** Kanwangwang Dwi Nada Anggara, 141610101036; 2018; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Hiperlipidemia adalah salah satu penyebab terjadinya aterosklerosis. Hiperlipid merupakan peningkatan kolesterol diatas normal, terutama mencerminkan peningkatan kolesterol *Low Density Lipoprotein* (LDL). Kenaikan jumlah LDL yang diatas normal dapat memicu terjadinya proses inflamasi pada arteri dan terjadi disfungsi endotel. LDL yang berlebihan akan teroksidasi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang merupakan pencetus reaksi inflamasi. LDL yang teroksidasi (LDL-ox) akan difagositosis oleh makrofag melalui *LDL scavenger receptor* sehingga menyebabkan makrofag penuh dengan lemak. Hal tersebut disebut dengan sel busa atau *foam cell*. *Foam cell* ini dapat meningkatkan produksi sitokin proinflamasi salah satunya TNF- $\alpha$ . Upaya pencegahan dan pengobatan untuk mengurangi produksi sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) dapat menggunakan obat yang mengandung antiinflamasi dan antioksidan. Salah satu obat yang mengandung antiinflamasi dan antioksidan adalah berasal dari tanaman herbal. Pemberian kopi yang merupakan tanaman herbal mempunyai kandungan antiinflamasi dan antioksidan diduga efektif menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$ .

Penelitian eksperimental laboratoris pada tikus wistar ini menggunakan rancangan *the post test only control group design*. Sampel berjumlah 12 ekor, berat 180-200 gram dan keadaan sehat. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok, kelompok 1 merupakan kelompok kontrol yang diinduksi diet standar, kelompok 2 merupakan kelompok hiperlipid yang diinduksi diet tinggi lemak menggunakan kuning telur yang dicampur dengan minyak babi sebanyak 5 ml/hari, kelompok 3 merupakan kelompok kopi yang diinduksi diet tinggi lemak+kopi, kopi yang diberikan sebanyak

3,6 ml/hari. Perlakuan dilakukan selama 28 hari kemudian tikus dieutanasia untuk diambil arteri karotisnya.

Pemrosesan jaringan dilakukan dengan metode potongan beku (*Frozen section*). Jaringan dipotong secara melintang pada daerah arteri karotis komunis sebelum percabangan dan diwarnai dengan metode imunohistokimia (IHC). Pengamatan gambaran histologi dilakukan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Pada gambaran histologi ekspresi TNF- $\alpha$  ditunjukkan dengan adanya intensitas warna coklat pada sitoplasma sel endotel di tunika intima. Penghitungan intensitas warna coklat yang menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  dilakukan menggunakan bantuan *software ImageJ* dengan melihat angka *grayscale*. Nilai *grayscale* rendah menunjukkan warna gelap yang diartikan mempunyai ekspresi TNF- $\alpha$  kuat, sedangkan nilai *grayscale* tinggi menunjukkan warna terang yang diartikan mempunyai ekspresi TNF- $\alpha$  lemah. Data yang didapatkan peneliti selanjutnya dianalisis secara statistik.

Hasil uji statistik didapatkan perbedaan yang bermakna pada tiap kelompok. Kelompok yang diberi perlakuan diet tinggi lemak menunjukkan peningkatan ekspresi TNF- $\alpha$  yang diduga karena adanya proses inflamasi oleh hiper LDL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian kopi robusta pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$ . Hal ini membuktikan karena adanya kandungan dari kopi robusta yang berfungsi sebagai antiinflamasi dan antioksidan dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$ .

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT karena hanya dengan ridho dan karunianya semata penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Ekspresi TNF- $\alpha$  Pada Sel Endotel Arteri Karotis Tikus Wistar Yang Di Induksi Diet Tinggi Lemak” sebagai persyaratan menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini penulis menyadari bahwa penulisan ini tidak mungkin terlaksana tanpa adanya bantuan baik moral maupun spiritual dari berbagai pihak. Untuk itu penulis menyampaikan terimakasih yang sedalamnya terutama kepada :

1. Prof. Dr. Drg IDA Ratna Dewanti, M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Nadie Fatimatuzzahro, MD.Sc selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah membagikan ilmu, waktu dan pengalamannya dalam proses penyelesaian skripsi penulis;
2. drg. Dessy Rachmawati, M.Kes, Ph.D selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Hengky Bowo Ardhiyanto, MD.Sc selaku Dosen Penguji Anggota yang telah bersedia meluangkan waktu untuk membaca, memberikan kritik dan memberikan saran pada skripsi penulis;
3. drg. Swasthi Prasetyarini, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
4. Mama Sri Indiati dan Ayah Jumari yang tercinta, terimakasih atas segala kasih sayang, dukungan mori dan materil, nasihat, serta untaian doa yang selalu mengiringi langkahku untuk mencapai keberhasilan;
5. Kakak Kanwangwang Wahyu Danar Tafakkur dan adik Dhuhita Tria Maulidia yang senantiasa memberiku kasih sayang dan semangat, serta keluarga besarku di Jombang yang telah memberikan segala doa dan dukungannya;
6. Staff Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
7. Staff Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;

8. Staff Akademik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
9. Terimakasih untuk yang tercinta Ria Dhini Musyarofah yang menemaniku selama berkuliah di FKG Universitas Jember;
10. Teman seperjuangan dalam penelitian Yunita Fatma Citradewi, Fadinda Aisa Wiranadiy dan Rudy Ramadhana Putra;
11. Teman-teman Ciaobel, Aldiansyah, Rudy, Nur Qum, Erfika Arifanti, Farahone, Lady Ayu, Meirsa Sawitri, Umil Syifa dan Silvi Tania yang telah menjadi keluarga di Jember;
12. Teman-teman kos Nur Qum, Darmawan, Majid, Putu, Idris, Ravi dan Reza yang mengevaluasi dan menemani mengerjakan skripsi;
13. Teman –teman angkatan 2014 yang selalu kompak;
14. Saya ucapkan terimakasih kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang terkait dengan hasil penelitian dari penelitian skripsi ini.

Jember, 22 Maret 2018

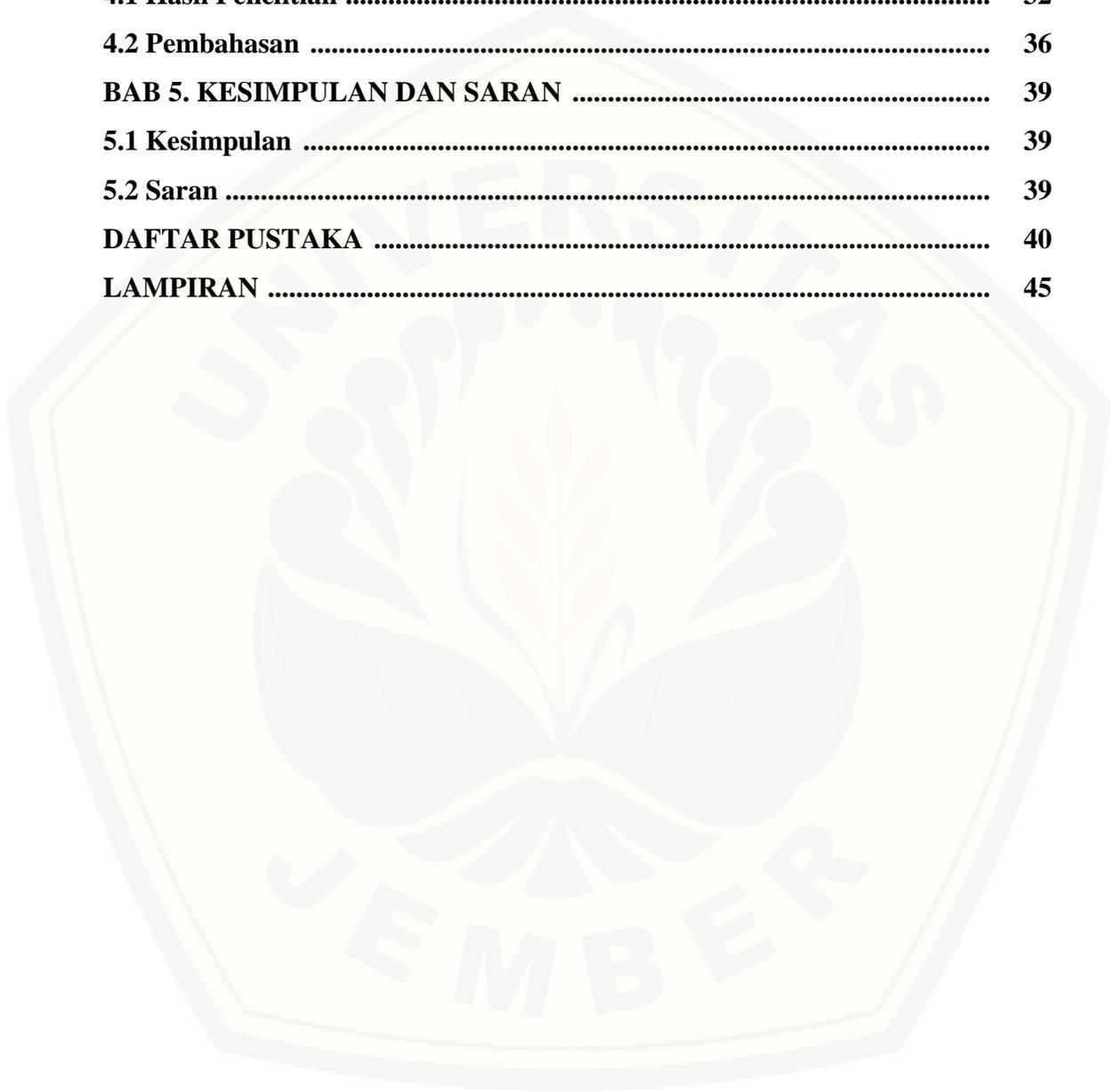
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
MOTTO .....	iv
PERNYATAAN .....	v
PENGESAHAN .....	vii
RINGKASAN .....	viii
PRAKATA .....	x
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Kopi Robusta .....	5
2.2 Lipid .....	8
2.3 Hiperlipidemia.....	12
2.4 Arteri Karotis .....	13
2.5 Aterosklerosis .....	14
2.6 Inflamasi .....	17
2.7 Hubungan hiperlipidemia dengan inflamasi .....	18
2.8 Tumor Nekrosis Faktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	19
2.9 Kerangka Konsep .....	20

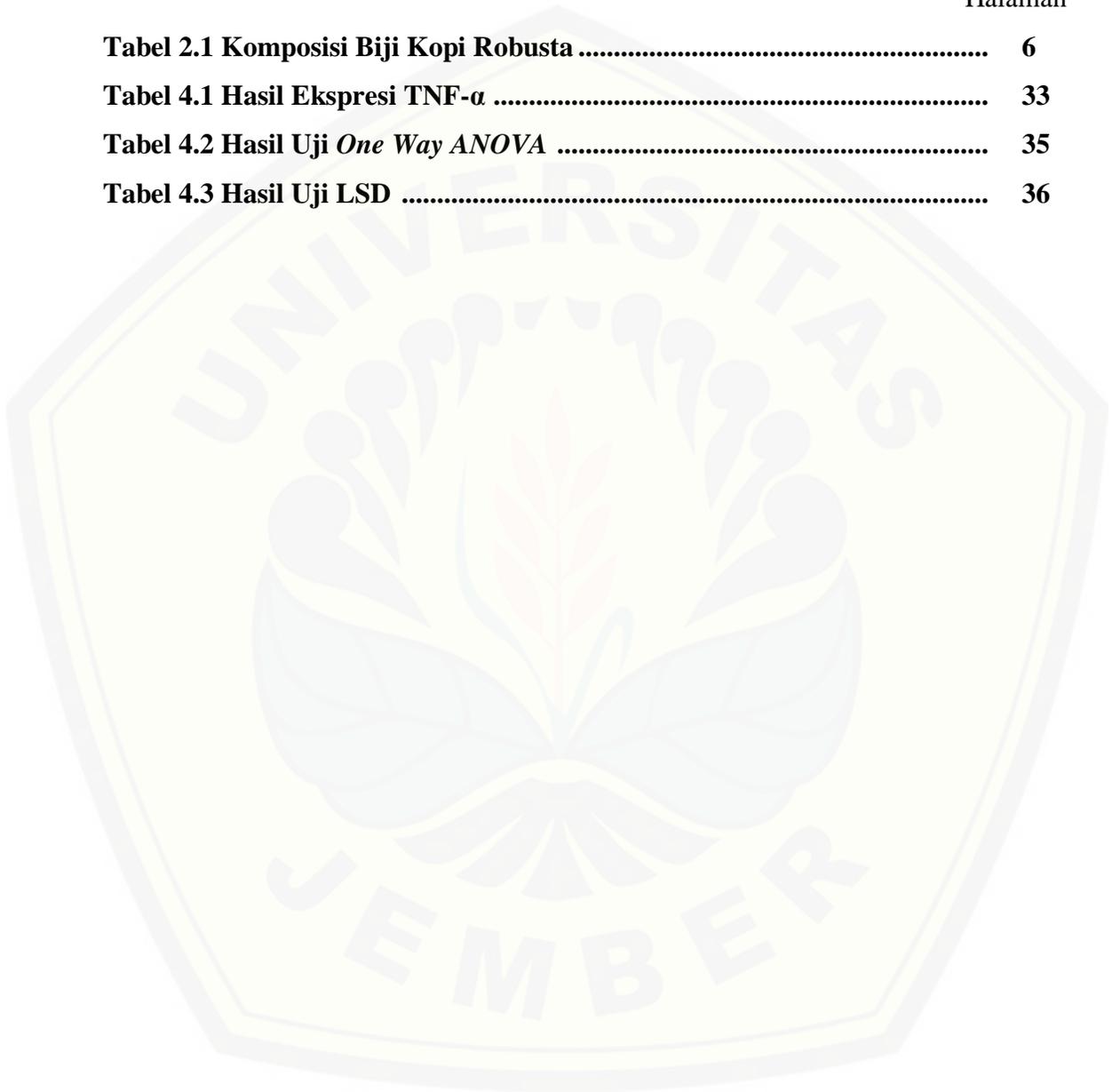
2.10 Hipotesis .....	21
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Waktu dan Tempat Penelitian .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Variabel Penelitian .....</b>	<b>22</b>
3.3.1 Variabel Bebas .....	22
3.3.2 Variabel Terikat .....	23
3.3.3 Variabel Terkendali .....	23
<b>3.4 Definisi Operasional .....</b>	<b>23</b>
3.4.1 Diet Tinggi Lemak .....	23
3.4.2 Seduhan Kopi .....	24
3.4.3 TNF – $\alpha$ .....	24
<b>3.5 Sampel Penelitian .....</b>	<b>24</b>
3.5.1 Sampel Penelitian .....	24
3.5.2 Besar Sampel .....	24
3.5.3 Kriteria Sampel .....	25
<b>3.6 Alat dan Bahan Penelitian .....</b>	<b>25</b>
3.6.1 Alat Penelitian.....	25
3.6.2 Bahan Penelitian .....	26
<b>3.7 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>27</b>
3.7.1 Ethical Clearance .....	27
3.7.2 Ringkasan PRosedur Penelitian .....	27
3.7.3 Tahap Persiapan dan Pembagian Kelompok Hewan Coba .....	27
3.7.4 Pembuatan Larutan Perlakuan .....	27
3.7.5 Pemeriksaan Kadar LDL.....	28
3.7.6 Pengambilan Arteri Karotis .....	28
3.7.7 Pemrosesan Jaringan (Arteri Karotis) .....	28
<b>3.8 Pengamatan .....</b>	<b>30</b>
<b>3.9 Analisis Data .....</b>	<b>30</b>

<b>3.10 Alur Penelitian .....</b>	<b>31</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Hasil Penelitian .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Pembahasan .....</b>	<b>36</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>39</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>39</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>40</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>45</b>



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
<b>Tabel 2.1 Komposisi Biji Kopi Robusta .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabel 4.1 Hasil Ekspresi TNF-<math>\alpha</math> .....</b>	<b>33</b>
<b>Tabel 4.2 Hasil Uji <i>One Way ANOVA</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabel 4.3 Hasil Uji LSD .....</b>	<b>36</b>

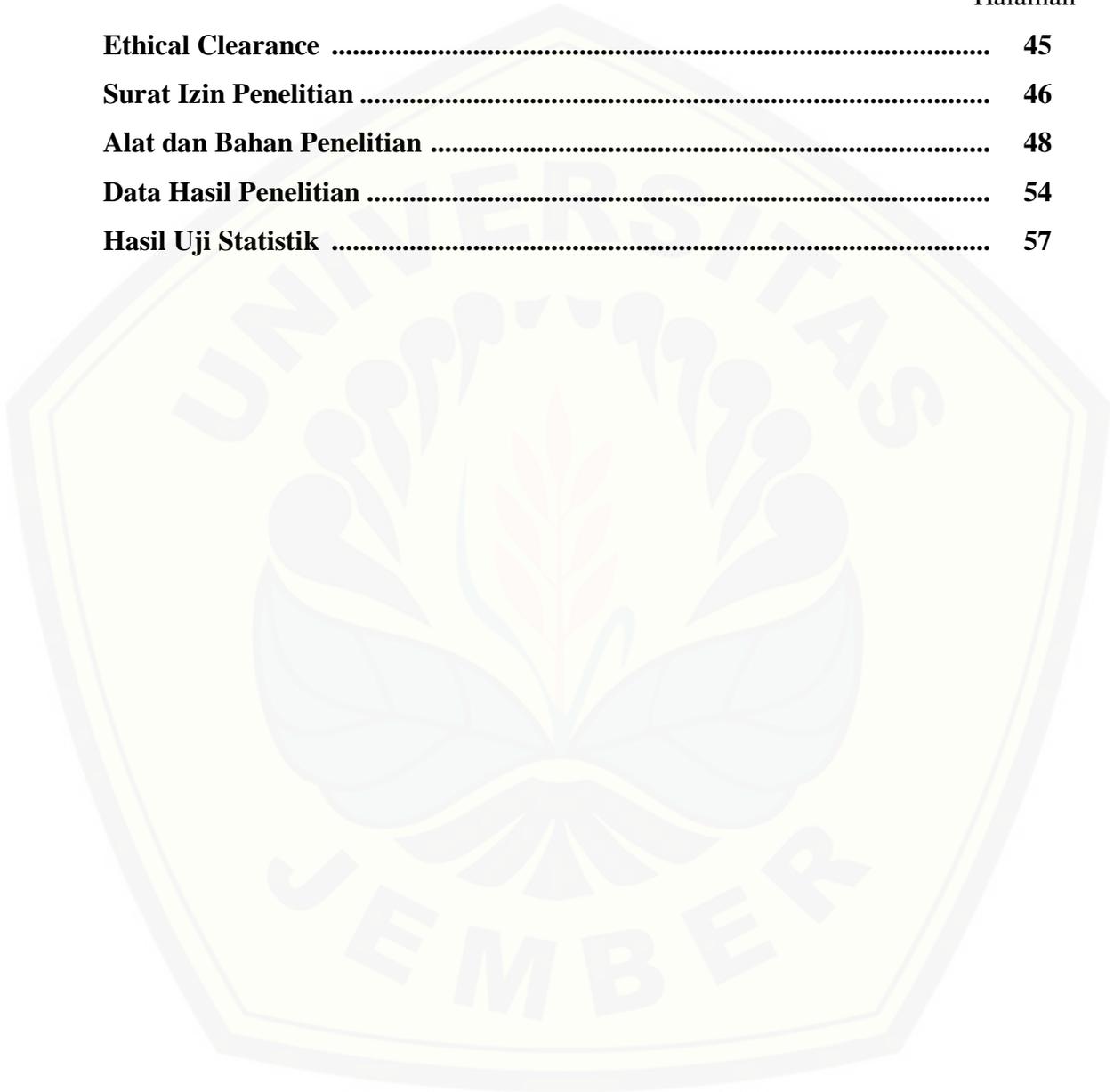


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Buah Kopi Robusta .....	5
Gambar 2.2 Metabolisme Lipoprotein .....	11
Gambar 2.3 Cabang-cabang Mayor Arteri Karotis .....	13
Gambar 3.1 Ilustrasi Daerah Pemotongan Sampel .....	29
Gambar 4.1 Diagram Rata-rata Ekspresi TNF- $\alpha$ .....	33
Gambar 4.2 Gambaran Histologi Arteri Karotis .....	34

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
<b>Ethical Clearance .....</b>	<b>45</b>
<b>Surat Izin Penelitian .....</b>	<b>46</b>
<b>Alat dan Bahan Penelitian .....</b>	<b>48</b>
<b>Data Hasil Penelitian .....</b>	<b>54</b>
<b>Hasil Uji Statistik .....</b>	<b>57</b>





## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hiperlipidemia atau hiperkolesterolemia adalah salah satu penyebab terjadinya aterosklerosis (World Health Organization, 2013). Hiperlipidemia merupakan peningkatan kolesterol dan trigliserida serum di atas batas normal. Peningkatan kolesterol serum yang terjadi terutama mencerminkan peningkatan kolesterol *Low Density Lipoprotein* (LDL). LDL merupakan lipoprotein yang memiliki kandungan kolesterol tertinggi dibandingkan lainnya (Price dan Wilson, 2006). Hiperlipidemia menyebabkan proses penebalan lapisan dinding pembuluh darah yang akibatnya menghambat aliran darah, mengurangi elastisitas pembuluh darah serta merangsang pembekuan darah. Beberapa penelitian terdahulu membuktikan adanya hubungan antara kadar lipid serum yang tinggi dengan angka kejadian penyakit aterosklerosis (Golberg, 2008).

Aterosklerosis adalah penyakit kronis, progresif, serta multifaktorial pada arteri berukuran medium yang ditandai oleh adanya lesi pada tunika intima yang disebut ateroma atau plak aterosklerotik yang menonjol ke arah lumen pembuluh darah (Singh *et al.*, 2012). Aterosklerosis bukan suatu proses *degenerative* tetapi merupakan proses inflamasi kronik. Ateroma ini akan mengganggu absorpsi nutrisi oleh sel-sel endotel yang menyusun lapisan dinding dalam pembuluh darah dan menyumbat aliran darah (LaMorte, 2013).

Langkah pertama dalam terbentuknya aterosklerosis adanya jejas pada sel-sel endotel (karena akumulasi lipid pada pembuluh darah) yang melapisi lumen arteri. Jejas pada sel-sel endotel akan mencetuskan reaksi inflamasi dan imun, sehingga terjadi pelepasan peptida-peptida vasoaktif dan penimbunan makrofag dan trombosit di luar dan di dalam arteri (Smeltzer dan Bare, 2008). Monosit melekat pada sel endotel, masuk ke tunika intima berubah menjadi makrofag. Makrofag mengekspresikan reseptor untuk *Low Density Lipoprotein* (LDL) dan dapat

memfagosit LDL yang teroksidasi melalui LDL *scavenger receptor* sehingga makrofag penuh dengan lemak. Hal ini disebut sel busa atau *foam cell*. Terbentuknya foam cell ini dapat meningkatkan sitokin proinflamasi salah satunya TNF- $\alpha$ . Peningkatan TNF- $\alpha$  akan meningkatkan ekspresi molekul-molekul adhesi dan perekrutan monosit dalam pembentukan aterosklerosis (Kontush dan Chapman, 2006; Schneider *et al.*, 2007).

Beberapa penelitian dua dekade terakhir menunjukkan adanya peran inflamasi kronis pada dinding aorta karena penumpukan lemak. Hiperlipidemia pemicu aterosklerosis merupakan kelainan akibat multifaktorial juga berhubungan dengan sitokin proinflamasi, IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), IL-1 $\beta$  (Interleukin I  $\beta$ ), IL-6 (Interleukin-6) dan TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ). Peneliti lain membuktikan bahwa konsumsi makanan aterogenik dapat meningkatkan terbentuknya sitokin proinflamasi IL-6 dan TNF- $\alpha$ , namun tidak memberikan perubahan signifikan terhadap peningkatan IL-1 $\beta$  (Ita, 2011). TNF- $\alpha$  merupakan salah satu sitokin pro inflamasi yang poten. TNF- $\alpha$  diproduksi berlebih di jaringan adiposit pada model tikus obesitas dan memegang peran penting dalam proses pembentukan aterosklerosis. Bastard *et al.*, (2006) mengatakan bahwa TNF- $\alpha$  dapat digunakan sebagai target untuk pencegahan aterosklerosis.

Sebagian besar dari masyarakat mempunyai kebiasaan dalam mengobati penyakit aterosklerosis (menurunkan kolesterol) dengan menggunakan obat-obatan yang beredar di pasaran yaitu statin. Statin mempunyai efek samping seperti nyeri otot atau lemas, gangguan saluran cerna, ruam dan insomnia, maka hal masih berbahaya bagi penderita aterosklerosis (Diana Lyrawati, 2008). Upaya pencegahan dan pengobatan aterosklerosis dapat menggunakan antioksidan. Salah satu sumber antioksidan yang murah, mudah didapat dan dengan efek samping minimal adalah berasal dari tanaman herbal. Salah satu tanaman tersebut adalah kopi yang kaya antioksidan. Jember merupakan kota perkebunan kopi dan juga penghasil kopi terbanyak di Indonesia. Kopi yang dihasilkan di kota Jember paling banyak jenis kopi robusta (*Coffea canephora*). Selain mudah ditemukan di Kabupaten Jember kopi

robusta juga mempunyai kandungan antioksidan yang tinggi dibandingkan jenis kopi lainnya. Antioksidan dapat membantu meningkatkan kekebalan tubuh terhadap penyakit dengan cara meningkatkan kemampuan sel leukosit (Winarsi, 2007).

Di sisi lain kopi sering dikaitkan dengan sejumlah faktor risiko penyakit jantung, termasuk meningkatkan tekanan darah dan kadar kolesterol darah. Meskipun dikatakan sebagai penyebab berbagai penyakit khususnya hipertensi, namun berbagai hasil studi epidemiologi mengenai efek konsumsi kopi terhadap tekanan darah tidak konsisten, beberapa menunjukkan hubungan yang positif, ada yang mengatakan tidak ada hubungannya, bahkan beberapa menunjukkan ada hubungan terbalik (Mattioli *et al.*, 2011). Hal ini dapat diduga karena kandungan polifenol terutama asam klorogenat pada kopi yang digunakan sebagai antioksidan yang dapat menurunkan toksik radikal bebas dalam tubuh (Hardinsyah 2009).

Kandungan kopi yang termasuk antioksidan antara lain asam klorogenat, kafein dan fenol. Pada pengaturan dosis tertentu, asam klorogenat terbukti mengurangi risiko terhadap tingginya kadar kolesterol darah (Thomas, 2007). Penelitian yang dilakukan pada hewan, asam klorogenat berperan untuk mengurangi kerentanan terhadap oksidasi LDL (Meng *et al.*, 2013). Asam klorogenat juga mempunyai aktivitas sebagai anti hipertensi karena metabolit dari asam klorogenat mengurangi terjadinya stress oksidatif yang berefek pada penurunan tekanan darah melalui peningkatan fungsi endotel dan peningkatan bioavailabilitas nitrit oksida di pembuluh darah arteri (Zhao *et al.*, 2011). Antioksidan yang terkandung dalam kopi robusta dapat membantu tubuh dalam menangkal efek pengerusakan senyawa radikal bebas dan dapat menghambat terbentuknya *foam cell* yang bisa mengurangi sitokin proinflamasi antara lain TNF- $\alpha$  (Hartanto, 2009).

Pengaruh kopi robusta (*coffea canephora*), hiperlipidemia dan TNF- $\alpha$  hingga saat ini belum ada penelitian eksperimental dengan menggunakan hewan coba. Oleh karena itu peneliti ingin melakukan penelitian eksperimental menggunakan hewan coba untuk mengetahui pengaruh kopi robusta terhadap ekspresi TNF- $\alpha$  pada arteri karotis tikus yang di induksi diet tinggi lemak.

## 1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan :

1. Obat penurun kolesterol dipasaran menimbulkan banyak efek samping.
2. Belum ditemukan obat dengan efek samping minimal, murah dan mudah didapat.
3. Peran biji kopi robusta terhadap mekanisme terjadinya aterosklerosis khususnya sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) belum diketahui dengan pasti.

Oleh karena itu didapatkan rumusan masalah yaitu bagaimana pengaruh kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap ekspresi mediator inflamasi (TNF- $\alpha$ ) pada tikus yang di induksi diet tinggi lemak?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap ekspresi mediator inflamasi (TNF- $\alpha$ ) pada tikus yang di induksi diet tinggi lemak.

## 1.4 Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat diantaranya:

1. Meningkatkan pengetahuan mengenai pengaruh pemberian kopi robusta (*Coffea canephora*) terhadap ekspresi mediator inflamasi (TNF- $\alpha$ ).
2. Menjadi dasar pengembangan teknologi mengenai tindakan preventif dan kuratif untuk menurunkan jumlah penderita aterosklerosis dengan memanfaatkan kandungan kopi robusta (*Coffea canephora*).
3. Sebagai acuan lebih lanjut mengenai potensi kopi rosbuta terhadap hubungan ateroskerosis karotis yang dipicu diet tinggi lemak bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi kedepannya.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kopi Robusta

#### 2.1.1 Definisi Kopi Robusta

Kopi robusta (*Coffea canephora*) adalah tanaman budidaya berbentuk pohon yang termasuk dalam famili *Rubiaceae* dan genus *Coffea* (Gambar 2.1). Daunnya berbentuk bulat telur dengan ujung agak meruncing. Daun tumbuh berhadapan dengan batang, cabang, dan ranting-rantingnya. Permukaan atas daun mengkilat, tepi rata, pangkal tumpul, panjang 5-15 cm, lebar 4,0-6,5 cm, pertulangan menyirip, tangkai panjang 0,5-1,0 cm, dan berwarna hijau (Najiyati dan Danarti, 2012). Sistematika tanaman kopi robusta menurut Rahardjo (2012) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*  
Sub kingdom : *Tracheobionita*  
Divisi : *Magnoliophyta*  
Kelas : *Magnoliopsida*  
Sub Kelas : *Astridae*  
Ordo : *Rubiaceace*  
Genus : *Coffea*  
Spesies : *Coffea robusta*



Gambar 2.1. Buah kopi robusta (*Coffea canephora*) (Lampung Post: 2013)

### 2.1.2 Kandungan Kopi Robusta

Kopi robusta memiliki banyak kandungan kimia pada bijinya seperti karbohidrat, senyawa nitrogen (protein, asam amino bebas, kafein, trigonelline), lemak (minyak kopi, diterpen), mineral, asam dan ester (asam klorogenat, asam kuinat). Senyawa-senyawa yang terkandung dalam biji kopi robusta ini memiliki manfaat tertentu seperti asam klorogenat, kafein, trigonelline, serat terlarut dan terpenoid yang memiliki peran penting untuk menghasilkan aroma pada minuman kopi (Tabel 2.1) (Farah, 2012).

Tabel 2.1 Kandungan kimia yang terdapat pada biji kopi Arabika dan Robusta (Farah, 2012)

Komponen	Konsentrasi (g/100g)		Konsentrasi (g/100g)	
	Green Coffea arabica	Roasted Coffea Arabica	Green Coffea canephora	Roasted Coffea canephora
Sukrosa	6.0–9.0	4.2	0.9-4.0	1.6
Gula Pereduksi	0.1	0.3	0.4	0.3
Polisakarida	34-44	31-33	48-55	37
Lignin	3.0	3.0	3.0	3.0
Pectin	2.0	2.0	2.0	2.0
Protein	10.0-11.0	7.5-10	10.0-11.0	7.5
Asam Amino Bebas	0.5	Tidak terdeteksi	0.8-1.0	Tidak terdeteksi
Kafein	0.9-1.3	1.1-1.3	1.5-2.5	2.4-2.5
Trigonellin	0.6-2.0	0.2-1.2	0.6-0.7	0.3-0.7
Asam Nikotinic	-	0.016-0.026	-	0.014-0.025
Minyak Kopi (Trigliserida, sterol/tocopherol)	15.0-17.0	17.0	7.0-10.0	11.0
Diterpen	0.5-1.2	0.9	0.2-0.8	0.2
Mineral	3.0-4.2	4.5	4.4-4.5	47
Asam Klorogenat	4.1-7.9	1.9-2.5	6.1-11.3	3.3-3.8
Asam Alifatik	1.0	1.6	1.0	1.6
Asam Quinic	0.4	0.8	0.4	1.0
Melanoidins	-	25	-	25

### 2.1.3 Manfaat Kopi Robusta

Kopi merupakan salah satu tanaman yang memiliki banyak manfaat. Bagian dari kopi yang paling banyak dimanfaatkan adalah bijinya. Biji kopi robusta mengandung senyawa antioksidan dan antiinflamasi yang berperan terhadap manfaat kesehatan, termasuk perlindungan dari berbagai penyakit, seperti penyakit jaringan lunak yang terjadi karena adanya invasi bakteri, virus, antigen, dan lain-lain. Senyawa antioksidan tersebut antara lain adalah kafein, fenol dan asam klorogenat (Winarsi 2007).

Kafein merupakan senyawa alkaloid yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Menurut Handayani (2014) kafein sebagai antioksidan dapat berperan sebagai peredam radikal bebas. Adanya antioksidan dapat membantu tubuh dalam menangkal efek pengrusakan oleh senyawa radikal bebas, seperti penurunan sistem imun. Senyawa kafein mampu melindungi sel imun dari kerusakan jangka panjang. Kafein memiliki peran dalam pengembangan pertahanan tubuh melawan agen infeksi dengan meningkatkan aktivitas sel imun dan memperkuat aktivitas lisozim (Aryafatta, 2008).

Senyawa fenolik dalam kopi mempunyai efek perlindungan terhadap pengaruh oksigen radikal bebas sebagai antioksidan, sehingga dapat mengurangi terjadinya kerusakan sel (*radical scavenger*) dengan menghambat peroksidasi lipid. Senyawa fenolik, yaitu senyawa yang mengandung *phenolic acid*, yang terdiri dari: *chlorogenic acid*, *3-caffeoylquinic acid*, dan *hydrooxycinnamates*, telah diketahui mempunyai khasiat anti inflamasi, yaitu mengurangi efek histamin, bradikinin, dan lekotrien, dan yang pada akhirnya dapat mengurangi efek peningkatan permeabilitas kapiler selama fase inflamasi sehingga dapat mencegah keluarnya makromolekul dari mikrosirkulasi (Yuwono HS, 2012).

Asam klorogenat yaitu ester dari asam kafeat merupakan komponen terbanyak dalam kopi. Asam klorogenat mampu melawan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dengan cara mempertahankan struktur normal sel dan fungsinya. Asam klorogenat bekerja dengan cara masuk ke dalam agen asing dan merusak struktur

dinding agen asing tersebut. Mengonsumsi kopi sebagai antioksidan dan antiinflamasi dalam jumlah memadai yaitu dapat menurunkan kejadian penyakit aterosklerosis. Konsumsi makanan yang mengandung antioksidan juga dapat meningkatkan status imunologis dan menghambat timbulnya penyakit aterosklerosis (Winarsi, 2007).

*International Food Information Council Foundation* (IFIC) menyatakan bahwa batas aman konsumsi kafein yang masuk ke dalam tubuh perharinya adalah 100-150 mg atau 1,73 mg/kgBB, sedangkan untuk anak-anak dibawah 14-22 mg (IFIC, 2007). Kandungan kafein dalam kopi memiliki efek yang beragam pada setiap manusia. Beberapa orang akan mengalami efeknya secara langsung, sedangkan orang lain tidak merasakannya sama sekali. Hal ini terkait dengan sifat genetika yang dimiliki masing-masing individu terkait dengan kemampuan metabolisme tubuh dalam mencerna kafein (Weinberg & Bonnie 2010). Menurut *Food and Drug Administration* (FDA) (2007), overdosis karena kafein jarang terjadi, namun tanda keracunan kafein telah terlihat pada anak-anak seperti tremor (gemetar diluar kesadaran), mual, muntah, denyut jantung yang tidak teratur, panik, dan kebingungan.

## **2.2 Lipid**

### **2.2.1 Definisi Lipid**

Lipid atau lemak adalah molekul dengan gugus fungsional karboksil (-COOH) atau gugus ester (-COOR), yang tidak dapat larut dalam air, tapi larut dalam larutan non polar, seperti eter, chloroform, aseton, benzen, karbon tetraklorida. Lipid merupakan suatu komponen penting, yang berfungsi sebagai sumber cadangan energi dan sebagai bahan penyekat dalam jaringan subkutan dan di sekitar organ-organ tertentu. Dalam keadaan normal fosfolipid bersama-sama dengan kolesterol terdapat di membran sel untuk mempertahankan keadaan hidrofobik dari sel agar fungsi dan struktur sel tetap normal (Murray, 2009).

## 2.2.2 Jenis-jenis Lipid

### a. Trigliserida

Trigliserida merupakan simpanan lipid yang utama pada manusia dan juga merupakan sekitar 95% jaringan lemak tubuh. Dalam plasma, trigliserida terdapat dalam berbagai konsentrasi di berbagai fraksi lipoprotein. Secara umum dapat dikatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi trigliserida maka semakin rendah kepadatan (densitas) dari lipoprotein. Pembawa utama trigliserida dalam plasma adalah kilomikron dan *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) (Yuan *et al.*, 2007).

### b. Kolesterol

Kolesterol adalah lemak yang terdapat dalam aliran darah atau berada dalam sel tubuh, yang sebenarnya dibutuhkan untuk pembentukan dinding sel dan sebagai bahan baku beberapa hormon, namun apabila kadar kolesterol dalam darah berlebihan, akan mengakibatkan penyakit jantung koroner dan stroke. Dalam tubuh manusia kolesterol terdapat dalam bentuk bebas (tidak teresterifikasi) dan dalam bentuk kolesterol ester (teresterifikasi). Keadaan normal sekitar dua pertiga kolesterol total plasma terdapat dalam bentuk ester. Sekitar 60-75% kolesterol di angkut oleh LDL dan dalam jumlah lebih sedikit tetapi sangat bermakna (15-25%) diangkut oleh *High Density Lipoproteins* (HDL) (Guyton dan Hall, 2007).

### c. Fosfolipid

Komplek lipid ini berasal dari asam fosfotidal. Di dalam plasma fosfolipid yang utama adalah sfingomielin, fosfatidil kolin atau lesitin, fosfatidil etanolamin dan fosfatidil serin. Berbagai konsentrasi fosfolipid terdapat dalam berbagai fraksi lipoprotein yang terbanyak, terdapat dalam HDL sekitar 30% dan pada LDL sekitar 20-25% (Murray *et al.*, 2009).

### d. Asam lemak tak teresterifikasi (NEFA/*Non Esterified Fatty Acid*)

NEFA merupakan bagian kecil asam lemak plasma yang tak teresterifikasi oleh gliserol sehingga sering disebut juga sebagai asam lemak bebas (FFA/*Free Fatty Acid*), lemak bebas di dalam tubuh diangkut dalam kompleks albumin (Anwar, 2011).

### 2.2.3 Metabolisme Lipoprotein

Lipid plasma berasal dari makanan (eksogen) atau disintesis dalam tubuh (endogen). Lipid sukar larut dalam air, pengangkutannya dalam tubuh berbentuk kompleks dengan protein yang disebut lipoprotein. Lipoprotein tersusun atas inti yang sukar larut (non polar) yang terdiri atas ester kolesterol dan trigliserida serta bagian yang mudah larut (polar) yang terdiri dari protein, fosfolipid dan kolesterol bebas. Lipid yang beredar di dalam tubuh diperoleh dari dua sumber yaitu dari makanan dan hasil produksi organ hati, yang bisa disimpan di dalam sel-sel lemak sebagai cadangan energi (Botham dan Mayes, 2012).

Sistem jalur pengangkutan lipoprotein dapat dibagi menjadi 2 (dua) jalur yaitu:

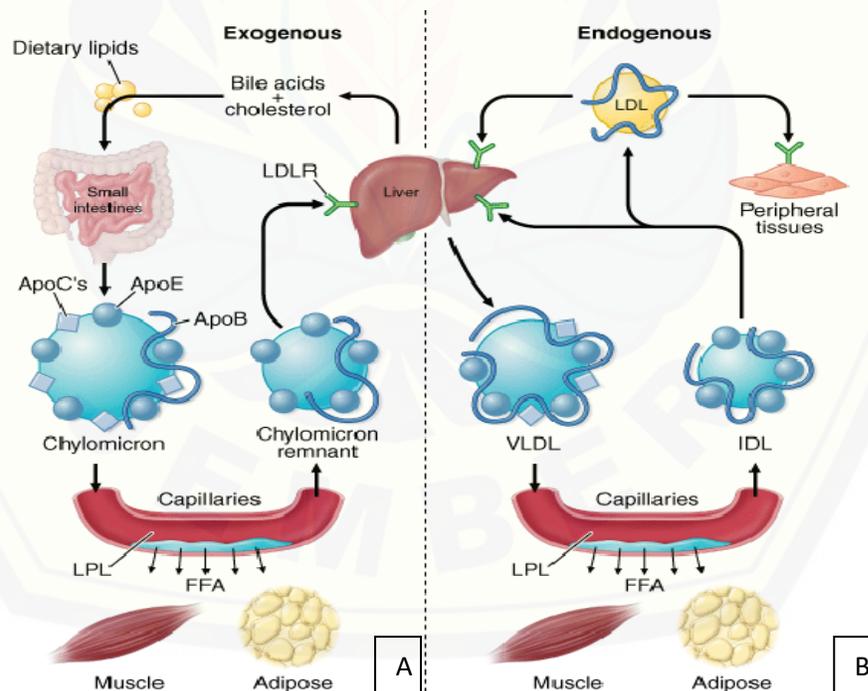
#### a. Sistem Eksogen

Makanan berlemak yang kita makan terdiri atas trigliserid dan kolesterol. Selain kolesterol yang berasal dari makanan, dalam usus juga terdapat kolesterol dari hati yang diekskresi bersama empedu ke usus halus. Lemak yang berasal dari usus halus disebut lemak eksogen. Asam lemak dan monogliserida akan dibentuk menjadi trigliserida di dalam sel ini lalu berkumpul berbentuk gelembung yang disebut kilomikron. Selanjutnya kilomikron ditransportasikan melalui pembuluh limfe dan bermuara pada vena kava, sehingga bersatu dengan sirkulasi darah. Kilomikron ini kemudian ditransportasikan menuju hati dan jaringan adipose (Guyton, 2007).

Kilomikron ini masuk ke saluran limfe dan akhirnya melalui duktus torasikus akan masuk ke dalam aliran darah. Trigliserida dalam kilomikron akan mengalami hidrolisis oleh enzim *lipoprotein lipase* yang berasal dari endotel menjadi asam lemak bebas (*free fatty acid*). Asam lemak bebas dapat disimpan sebagai trigliserida kembali di jaringan lemak (adiposa) tetapi bila terdapat dalam jumlah yang banyak sebagian akan diambil oleh hati menjadi bahan untuk pembentukan trigliserida hati. Kilomikron yang sudah kehilangan sebagian besar trigliserida akan menjadi kilomikron *remnant* yang mengandung kolesterol ester dan akan dibawa ke hati (Gambar 2.2) (Sudoyo, 2009).

### b. Sistem Endogen

Lipid yang berasal dari hepar ke jaringan tubuh melalui sirkulasi darah. Lipid ini bersama dengan lipoprotein dirakit menjadi partikel *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) di dalam hati dan disekresi ke sirkulasi darah. Sesampainya di pembuluh kapiler berbagai VLDL jaringan tubuh berinteraksi dengan enzim lipoprotein lipase yang menghidrolisis sebagian besar trigliserida dalam intinya dan dikonversi menjadi partikel *Intermediet Density Lipoprotein* (IDL). Sebagian besar partikel IDL yang terbentuk akan mengalami hidrolisis lebih lanjut membentuk *Low Density Lipoprotein* (LDL). LDL merupakan lipoprotein yang kaya akan kolesterol dan berperan dalam pengangkutan kolesterol ke jaringan perifer (lemak jahat). Sebagian besar LDL diambil oleh hepar sebagian lagi dilepas ke jaringan tubuh lainnya melalui mekanisme endositosis dengan perantara reseptor LDL (Gambar 2.2) (Botham dan Mayes, 2012).



Gambar 2.2. A. Metabolisme lipoprotein jalur eksogen, B. Metabolisme lipoprotein jalur endogen (Fauci *et al.* 2008).

### 2.3 Hiperlipidemia

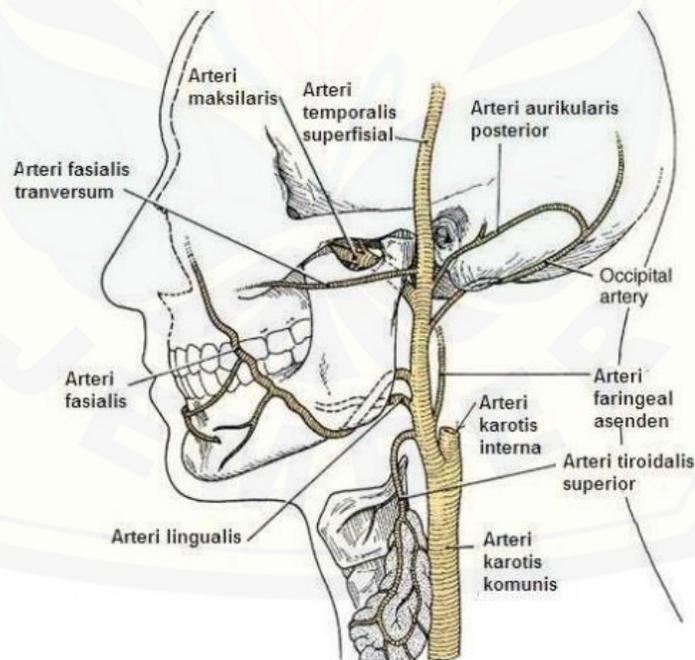
Hiperlipidemia merupakan suatu keadaan dimana terjadi peningkatan kadar kolesterol dengan atau tanpa peningkatan kadar trigliserida dalam darah. Hiperlipidemia atau hiperkolesterolemia termasuk salah satu abnormalitas fraksi lipid dalam darah atau lebih dikenal dengan dislipidemia. Pada dislipidemia terdapat kenaikan kadar LDL dan penurunan kadar *High Density Lipoproteins* (HDL), sedangkan pada hiperlipidemia hanya terdapat kenaikan LDL dapat tanpa penurunan kadar HDL. Pada pasien hiperlipidemia, kadar kolesterol LDL yang ikut beredar dalam darah sangat tinggi. Bila terjadi defek pada dinding pembuluh darah terutama pembuluh arteri maka LDL akan mudah menempel dan mengendap membentuk gumpalan lipid. Gumpalan inilah yang akan menyebabkan terjadinya penyakit aterosklerosis (Darniwa *et al.*, 2014).

LDL berfungsi membawa kolesterol ke jaringan perifer untuk dipecah menjadi energi atau disimpan. Reseptor LDL di dalam hepar mengeluarkan LDL dari sirkulasi sehingga peran reseptor ini penting dalam pengaturan kadar kolesterol dalam darah. Pada pembuluh darah, LDL dapat menembus dinding arteri. Kolesterol yang terkandung di dalamnya akan teroksidasi dan berikatan dengan TG, fibrin, dan platelet membentuk plak ateroma yang merupakan awal dari proses atherosklerosis. Selain itu, lipoprotein lain yaitu HDL, memiliki fungsi untuk mengangkut kolesterol yang menempel di dinding arteri. Kadar kolesterol HDL yang tinggi (>60 mg/dl atau 1,6 mmol/l) menjadi faktor protektif untuk insidensi aterosklerosis (Darniwa *et al.*, 2014).

Menurut menurut *American Association of Clinical Endocrinology* (2015) penyebab dislipidemia dapat secara genetik primer maupun akibat gaya hidup seperti diet tinggi lemak dan kurangnya aktivitas fisik. Pemicu lainnya adalah usia, jenis kelamin, riwayat keluarga dengan hiperlipidemia, obesitas, menu makanan yang mengandung asam lemak jenuh, merokok, alkohol, kurang olahraga, diabetes yang tidak terkontrol dengan baik, gagal ginjal, obat - obatan tertentu yang mengganggu metabolisme lemak, kelenjar tiroid yang kurang aktif.

## 2.4 Arteri Karotis

Otak dialiri oleh arteri karotis dan arteri vertebralis yang dimulai arteri ekstrakranial yaitu aorta atau pembuluh darah besar yang berjalan melalui leher dan dasar tengkorak untuk mencapai rongga intrakranial. Sistem karotis dikenal sebagai sirkulasi anterior dan vertebrobasiler dikenal sebagai sirkulasi posterior. Arteri karotis kominis kiri dipercabangkan langsung dari arkus aorta sebelah kiri, sedangkan arteri karotis kominis dipercabangkan dari arteri innominata (brachiocephalica). Di leher setinggi kartilago thyroid arteri karotis kominis bercabang menjadi arteri karotis interna dan arteri karotis eksterna dengan arteri karotis interna lebih posterior dibanding dengan arteri karotis eksterna. Percabangan dari kedua arteri ini sering disebut *bifurcatio* (Gofir, 2009) (Gambar 2.3). Daerah *bifurcatio* inilah yang sering terjadi penyumbatan aliran darah karena keadaan tinggi lemak dalam darah sehingga menyebabkan aterosklerosis.



Gambar 2.3 Cabang - cabang Mayor Arteri Karotis (Goetz, 2007)

## 2.5 Aterosklerosis

### 2.5.1 Definisi Aterosklerosis

Aterosklerosis atau pengerasan arteri adalah kondisi dimana plak terbentuk di dalam arteri. Plak terdiri atas kolesterol, substansi lemak, produk-produk dari sel, kalsium dan fibrin (American Heart Association, 2011). Aterosklerosis merupakan kondisi inflamasi dengan sel-sel imunokompeten pada lesi yang memproduksi sitokin pro-inflamasi. Sel-sel mati dan LDL teroksidasi banyak ditemukan dalam lesi aterosklerosis. Aterosklerosis banyak terdapat pada tunika intima arteri medium dan besar, khususnya pada daerah percabangan (bifurkasi) (Johan, 2013).

### 2.5.2 Patogenesis

Berbagai teori telah dilontarkan untuk menerangkan patogenesis aterosklerosis. Aterosklerosis bukan merupakan suatu proses degeneratif, tetapi merupakan proses inflamasi kronik yang diikuti oleh suatu proses reparasi di dinding arteri. Hal inilah yang mendasari hipotesis *response to injury*. Hipotesis ini menyatakan bahwa lesi aterosklerosis terjadi sebagai respon platelet karena kerusakan endotel oleh hiperkolesterolemia (Ross R, 2007).

#### a. Tahap I – lapisan berlemak (*fatty streak*)

*Fatty streak* merupakan lesi yang pertama kali dapat terlihat dengan mata telanjang, berupa bercak dan bintik serta garis lemak berwarna kuning pada intima. Secara mikroskopis ditemukan adanya kumpulan lapisan sel busa, miosit berisi butiran lemak, sel limfosit T dan sel mast pada tunika intima. *Fatty streak* berkembang pada lokasi dimana biasanya terjadi sel endotel yang luka, sehingga menyebabkan molekul–molekul besar seperti LDL dapat masuk ke dalam jaringan subendotelium. LDL adalah lemak aterogenik yang paling utama. Apabila LDL sudah masuk ke dalam subendotelium, maka akan terjebak dan akan menetap di dalam jaringan subendotelium. Hal seperti ini disebabkan karena terikatnya LDL dengan glikoaminoglikan. LDL yang terjebak semakin lama akan bermodifikasi karena adanya suatu radikal oksigen yang bebas di sel endotelial, yang merupakan inhibisi

dari aterosklerosis. LDL yang bermodifikasi ini akan mengalami 3 proses yang penting yaitu mereka akan dimakan oleh monosit menjadi makrofag, makrofag ini akan tetap di dalam jaringan subendotelium, dan modifikasi LDL ini akan membantu sel mengambil lipid dalam jumlah yang besar (Ross R, 2007).

b. Tahap II – *Fibrous plaque*

Tahapan selanjutnya dari perkembangan lesi aterosklerotik adalah konversi dari *fatty streak* ke lesi fibrotik yang ditandai dengan adanya tutup fibrotik (*fibrotic cap*). *Fibrotic cap* ini berwarna agak keputih-putihan, berkalsifikasi dan dapat menonjol ke dalam lumen sehingga dapat menyebabkan sumbatan parsial dari arteri. *Fibrous cap* ini merupakan suatu lesi patognomonik pertama aterosklerosis. Pada tahapan ini sering dijumpai mulai umur 25 tahun di aorta dan arteri koronaria di negara-negara dimana insidens yang tinggi dari aterosklerosis (Tugasworo D, 2010).

Salah satu terjadinya penyebab perubahan dari *fatty streak* ke lesi fibrotik adalah adanya lesi fokal yaitu hilangnya jaringan endotelial yang melapisi *fatty streak*. Hilangnya lapisan sel ini disebabkan oleh karena adanya suatu peregangan oleh sel-sel yang mengalami disfungsi pada deformasi dinding arteri atau dikarenakan oleh suatu toksin (radikal bebas akibat hasil dari oksidasi lipid) oleh sel busa. Pada lokasi sel yang hilang ini, platelet akan melekat dan terjadi pengeluaran faktor – faktor yang akan menyebabkan perkembangan lesi. Heparinase merupakan salah satu enzim yang memecah heparin sulfat (sebuah polisakarida pada matriks ekstraseluler) yang menghambat migrasi dan proliferasi dari sel otot polos. Kombinasi dari penurunan kadar heparin dan kurangnya *Prostaglandin I2* (PGI<sub>2</sub>) dan *Endothelium derived relaxing factor-Nitric oxide* (EDRF-NO), karena sel endotelial yang luka menyebabkan sel otot polos berubah dari sel yang berkontraksi menjadi sel yang tidak berkontraksi sehingga yang terjadi adalah pengeluaran sekresi enzim – enzim pada matriks ekstraseluler, yang menyebabkan mereka bermigrasi ke dalam intima dan berproliferasi (Baraas F, 2006).

### c. Tahap III – Lesi Komplikata

Tahap ketiga ini terdapat dalam jumlah banyak dengan adanya peningkatan umur. Bagian dari inti plak yang mengalami komplikasi akan menyebabkan ukuran menjadi bertambah besar yang kemudian pecah dan dapat mengalami perkapuran. Ulserasi dan perdarahan menyebabkan trombosis, pembentukan aneurisma, dan diseksi dari dinding pembuluh darah yang akan menyebabkan timbulnya gejala penyakit. Sejalan dengan pecahnya plak maka proses yang terjadi lainnya adalah thrombosis, adhesi platelet, agregasi platelet, dan koagulasi akan terjadi. Koagulasi dimulai oleh karena bercampurnya darah dengan kolagen di dalam plak dan faktor jaringan (jaringan tromboplastin) yang diproduksi oleh sel endotelial dan makrofag di dalam sel lesi fibrotik. Faktor jaringan akan membuat faktor VII mengaktifkan faktor X, yang akan mengkatalisasi konversi dari protrombin menjadi thrombin, yang pada akhirnya akan mengalami suatu polimerisasi untuk menstabilkan trombus. Trombin akan menstimulasi terjadinya proliferasi selular pada lesi dengan mengeluarkan deposisi platelet tambahan dan pengeluaran *Platelet derived growth factor* (PDGF) dan menstimulasi sel-sel lain untuk mengeluarkan PDGF. Trombosis dapat terjadi karena adanya lipoprotein (a) yang menghambat trombolisis dengan menghambat konversi dari plasminogen menjadi plasmin (Tugasworo D, 2010).

Tergantung pada keseimbangan antara trombotik dan proses trombolitik, trombus dapat mengalami kejadian-kejadian yang berbeda. Trombus dapat mengalami disolusi (hilang) sehingga tidak mengalami gejala atau dapat menempel pada proses aterosklerosis sehingga penyumbatan pada suatu lumen arteri bertambah besar dan menimbulkan gejala klinik. Pecahannya plak juga dapat menyebabkan suatu gejala klinik, dikarenakan pecahan plak tersebut berjalan bersama dengan aliran darah dan akan menyumbat pembuluh darah distal yang ukurannya akan lebih kecil. Jika pecahnya sangat besar maka kemungkinan besar akan terjadi penyumbatan pada pembuluh darah besar (Jauch EC *et al.*, 2013).

### 2.5.3 Faktor Risiko Aterosklerosis

Definisi faktor risiko aterosklerosis adalah adanya keadaan, kebiasaan atau abnormalitas yang dihubungkan dengan aterosklerosis. Faktor-faktor risiko dapat dibedakan menjadi faktor risiko mayor atau utama dan faktor risiko minor. Faktor risiko mayor seperti usia, jenis kelamin, keturunan (ras), merokok, tinggi kolesterol dalam darah, hipertensi dan juga kurangnya aktivitas fisik, sedangkan untuk faktor risiko minor seperti stress, alkohol, diet dan nutrisi (Kumar *et al.*, 2007).

## 2.6 Inflamasi

Inflamasi adalah suatu proses kompleks yang dimulai dari kerusakan jaringan, yang disebabkan oleh faktor endogen (misalnya nekrosis jaringan) dan faktor eksogen (misalnya kontak dengan bahan asing atau infeksi). Respon inflamasi merupakan bagian dari kekebalan *innate* dan kekebalan yang didapat *acquired*. Kekebalan *innate* merupakan sistem kekebalan yang sudah kita dapat sejak lahir elemennya pada: kulit, sistem pencernaan, paru-paru, pernapasan, sirkulasi, organ limfa dan serum. Sistem imun ini merupakan suatu hubungan respon yang unik terhadap inflamasi (Baratawidjaja K, 2009).

Inflamasi pada umumnya merupakan respon terhadap jejas pada jaringan hidup yang memiliki vaskularisasi. Respon radang ini diikuti oleh proses yang sangat penting, yaitu reaksi pada endotel. Endotel adalah bagian terpenting pembuluh darah yang berperan dalam proses aterosklerosis. Endotel menjadi target utama dari injuri mekanis dan khemis akibat faktor hiperlipidemia. Kolesterol LDL terutama yang teroksidasi sangat potensial merusak endotel (Kontush dan Chapman, 2006).

Inflamasi bertujuan untuk menyekat serta mengisolasi jejas, menghancurkan mikroorganisme yang menginvasi tubuh serta menghilangkan aktivitas toksinnya, dan mempersiapkan jaringan bagi kesembuhan serta perbaikan. Meskipun pada dasarnya respon bersifat protektif, namun inflamasi dapat pula berbahaya. Respon ini dapat menyebabkan reaksi hipersensitivitas yang bisa membawa kematian atau kerusakan organ yang persisten serta progresif akibat inflamasi kronik dan fibrosis seperti

arthritis rheumatoid, aterosklerosis (Mayer,2006).

Pengaturan respon inflamasi dicirikan oleh peran antara efek pro-inflamasi (memulai sinyal) dan anti inflamasi (menghentikan sinyal) yang dimediasi oleh sejumlah sitokin. Sitokin merupakan protein yang mudah larut dengan berat molekul yang rendah yang diproduksi pada respon terhadap antigen dan bertindak sebagai mediator untuk mengatur sistem imunitas baik alamiah maupun adaptif. Sitokin merupakan *messenger* kimiawi dan termasuk diantaranya adalah *tumor necrosis factors*, interleukin, interferon, kemokin, dan faktor pertumbuhan. Peran sitokin sangatlah kompleks, satu sitokin dapat bertindak pada sejumlah tipe sel yang berbeda (*pleiotropic*), sitokin yang sama mengatur sejumlah fungsi yang berbeda (*multifunctional*) dan sejumlah sitokin yang berbeda dapat memiliki fungsi yang sama (*redundant*). Pada umumnya sitokin dibagi menjadi sitokin pro-inflamasi dan sitokin anti-inflamasi. Sitokin pro-inflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), IL-12, IL-18 dan granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). Sitokin anti-inflamasi seperti IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$  dan transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Hartanto, 2009).

## 2.7 Hubungan hiperlipidemia dengan inflamasi

Inflamasi merupakan respon terhadap jejas pada jaringan hidup yang memiliki vaskularisasi. Respon ini dapat timbul karena jaringan nekrotik dinding vaskuler dan respon sel radang. Respon radang yang terjadi diikuti oleh proses endotel, di mana endotel adalah bagian terpenting pembuluh darah yang berperan dalam proses aterosklerosis. Endotel menjadi target utama dari kerusakan mekanis dan kimia akibat faktor hiperlipidemia (Kumar *et al.*, 2007).

Hiperlipidemia mempunyai peranan penting pada terjadinya kerusakan sel endotel yang diakibatkan oleh adanya LDL yang teroksidasi. Oksidasi LDL kemudian merangsang ekspresi dari *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) dan *Monocyte Chemotactic Protein-1* (MCP-1) yang akan menarik monosit ke dinding arteri dan monosit berdiferensiasi menjadi makrofag sebagai respon atas

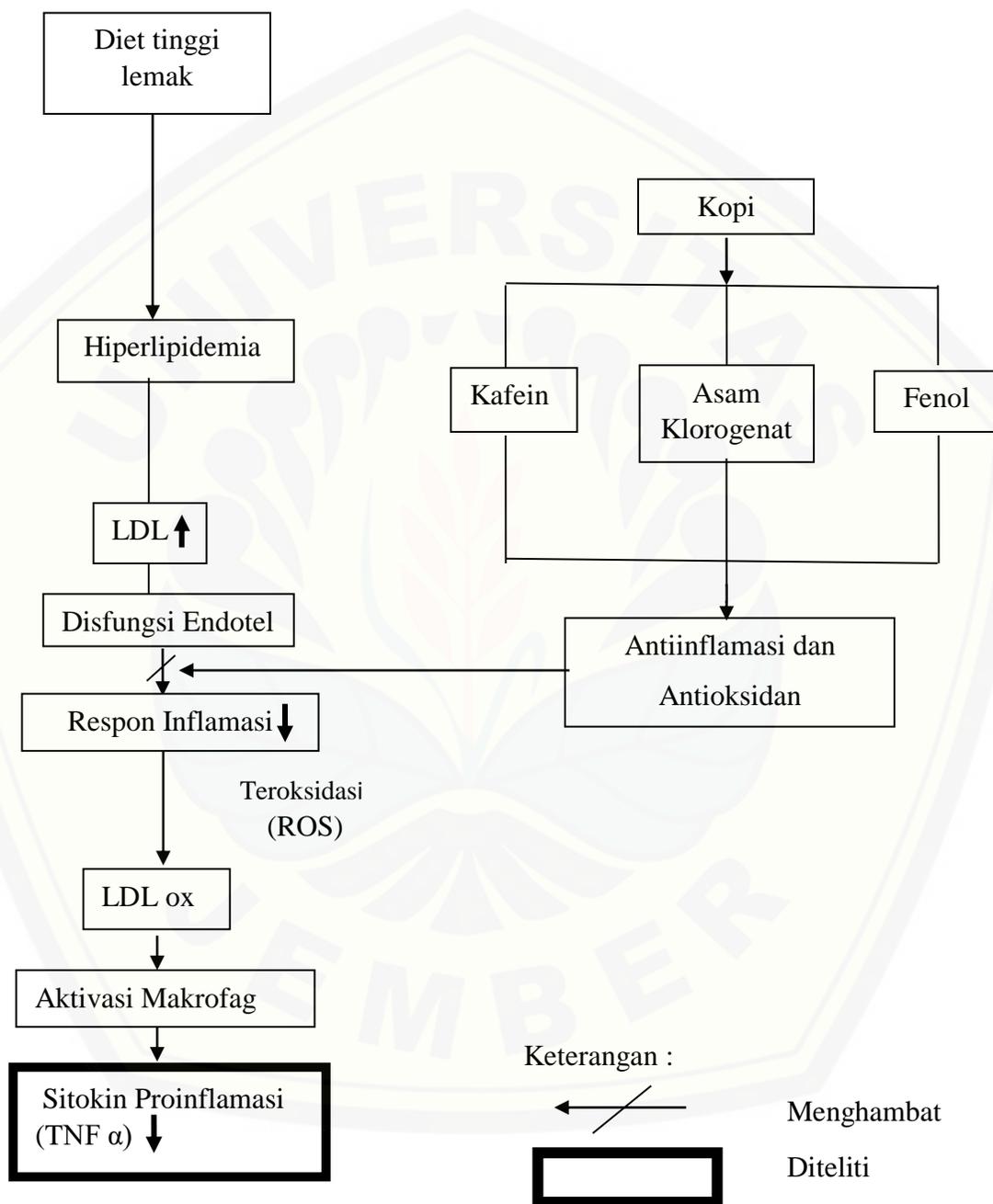
diproduksinya agen lokal *monocyte colony stimulating factor* (MCSF). Hal ini menghambat mobilitas makrofag sehingga terjadi immobilisasi pada subendotel. Tahap berikutnya adalah pembentukan sel busa di mana *Foam cell* atau sel busa terjadi karena LDL teroksidasi diambil oleh makrofag melalui reseptor LDL scavenger sehingga makrofag penuh dengan lemak (Chapman dan Kontush, 2006). Terbentuknya *foam cell* akan memproduksi *reactive oxygen spesies* (ROS), sitokin inflamasi seperti TNF- $\alpha$  yang akan meningkatkan terjadinya aterosklerosis. Peningkatan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 akan meningkatkan ekspresi molekul-molekul adhesi dan perekrutan monosit dalam perkembangan lesi aterosklerosis (Hartanto, 2009).

## 2.8 Tumor Nekrosis Faktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  pada awalnya ditemukan pada tumor tertentu yang mengalami pendarahan. Pendarahan ini ternyata disebabkan adanya nekrosis jaringan. Pada penderita infeksi oleh parasit ditemukan bahan yang dinamakan cahectin sebagai penyebab kekurusan yang berlebihan (kakeksi). Dua jenis mediator tersebut ternyata termasuk golongan sitokin yang kemudian dinamakan tumor nekrosis (TNF) (Subowo, 2009).

TNF- $\alpha$  adalah salah satu sitokin proinflamasi yang paling poten. Sitokin diketahui memegang peranan patogenik dalam penyakit inflamasi kronik. TNF- $\alpha$  diproduksi berlebih di jaringan adiposa pada model tikus obesitas dan memegang peranan penting dalam proses pembentukan aterosklerosis (Bastard *et al.*, 2006). TNF- $\alpha$  merupakan salah satu target untuk pencegahan aterosklerosis. TNF terutama dihasilkan oleh neutrofil, limfosit, makrofag sel NK dan beberapa sel non limfoid seperti astrosit, sel endotel dan sel otot polos. Sumber TNF- $\alpha$  pada keadaan aterosklerosis dapat berasal dari makrofag maupun sel lainnya seperti sel endotel dan sel lemak (Sukhanov *et al.*, 2007).

2.9 Kerangka Konsep



Gambar 2.4 Kerangka konsep

Diet tinggi lemak merupakan makanan yang dapat menyebabkan keadaan hiperlipidemia dalam tubuh. Keadaan tersebut dapat meningkatkan LDL yang dapat menyebabkan disfungsi endotel. Adanya disfungsi endotel akan menyebabkan terjadinya suatu respon inflamasi. Saat terjadi inflamasi LDL akan mengalami modifikasi oleh aktivasi *reactive oxygen spesies* (ROS) menjadi LDLox. Setelah itu LDL ox akan difagositosis oleh makrofag sehingga membentuk *foam cell* dan meningkatkan sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ).

Kopi robusta bertujuan untuk menghambat disfungsi endotel dengan kandungan antioksidan dan antiinflamasi. Kandungan kopi yang terdiri dari kafein, asam klorogenat dan fenol dapat menangkal adanya radikal bebas (ROS) dalam darah dan juga menghambat terjadinya disfungsi endotel. Dengan terhambatnya disfungsi endotel maka respon inflamasi dan aktivasi makrofag berkurang sehingga dapat menurunkan sitokin inflamasi yaitu TNF- $\alpha$ .

### **2.10 Hipotesis**

Hipotesis pada penelitian ini yaitu Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dapat mengurangi ekspresi mediator inflamasi (TNF- $\alpha$ ) pada tikus wistar (*Rattus norvegicus*) hiperlipidemia.



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test only control group design*, yaitu melakukan pengamatan dan pengukuran setelah perlakuan dan hasilnya dibandingkan dengan kontrol (Notoatmodjo, 2010).

### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

#### 3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi, meliputi:

- a. Laboratorium Fisiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk perlakuan terhadap hewan coba.
- b. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada untuk processing jaringan dan pembuatan preparat histologik.
- c. Laboratorium Histologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk pengecatan dan pengamatan jaringan.

#### 3.3.2 Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan bulan November 2017 sampai selesai.

### 3.3. Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel Bebas

- Pemberian diet tinggi lemak yaitu campuran kuning telur dengan minyak babi.
- Kopi robusta.

### 3.3.2 Variabel Terikat

Ekspresi TNF- $\alpha$  pada sel endotel arteri karotis.

### 3.3.3 Variabel Terkendali

#### a. Kriteria hewan coba

Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Rattus Norvegicus* strain Wistar dengan berat badan 180-200 gr, berumur 2-3 bulan, dan keadaan umum baik.

#### b. Pakan dan minum tikus

Semua kelompok tikus diberikan diet standar dan minum secara *ad libitum*. Kelompok 1 diberi diet standar, kelompok 2 diinduksi dengan diet tinggi lemak dan kelompok 3 diinduksi diet tinggi lemak dan kopi.

#### c. Prosedur penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari tahap adaptasi selama satu bulan dan tahap perlakuan.

#### d. Dosis diet tinggi lemak

Dosis diet tinggi lemak yang diberikan adalah sebanyak 5 ml/hari. Dilakukan dua kali sondasi dalam satu hari (Harsa, 2014).

#### e. Dosis Kopi Robusta

Dosis kopi robusta yang digunakan untuk menginjeksi sebanyak 3,6 ml/ hari. Dilakukan dua kali sondasi dalam satu hari.

## 3.4 Definisi Operasional

### 3.4.1 Diet Tinggi Lemak

Diet tinggi lemak adalah pakan yang diberikan pada sampel penelitian untuk mendapatkan keadaan hiperlipidemia. Pada penelitian ini digunakan pakan dari campuran kuning telur bebek dan minyak babi dengan perbandingan 2:3.

### 3.4.2 Seduhan Kopi

Seduhan kopi robusta (*C. canephora*) adalah hasil pelarutan bubuk kopi Robusta Gunung Ijen (PTP XII Persero, Indonesia) dengan air. Konsumsi seduhan kopi robusta diberikan sebanyak 3,6 ml/hari yang diberikan dua kali sehari.

### 3.4.3 TNF- $\alpha$

Pengamatan TNF- $\alpha$  dilakukan dengan melihat ekspresi TNF- $\alpha$  berwarna coklat pada preparat sel endotel tunika intima arteri karotis yang telah diwarnai Imunohistokimia (IHC) dengan mikroskop perbesaran 400 X.

## 3.5 Sampel Penelitian

### 3.5.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tikus wistar yang diinduksi diet tinggi lemak.

### 3.5.2 Besar Sampel

Besar sampel penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah 12 ekor tikus yang dibagi dalam 3 kelompok. Adapun besar sampel minimal tiap kelompok didapat dari perhitungan rumus sebagai berikut (Daniel, 2005).

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

Keterangan :

n : besar sample tiap kelompok

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

$\sigma$  : standar deviasi sampel

d : kesalahan yang masih dapat di toleransi

Dengan asumsi bahwa kesalahan yang masih dapat di terima ( $d$ ) sama besar dengan standar deviasi sampel ( $\sigma$ ) maka :

$$n \geq \frac{z^2 \times \sigma^2}{d^2}$$
$$n \geq (1,96^2)$$
$$n \geq 3,86$$
$$n \geq 4$$

Berdasarkan rumus di atas, jumlah minimal sampel yang harus digunakan adalah 4 sampel untuk masing-masing kelompok. Penelitian ini menggunakan 4 ekor sampel untuk masing-masing kelompok yang dipilih secara acak dengan rincian sebagai berikut:

- a) Kelompok I (Kontrol) merupakan kelompok yang diberi diet standar.
- b) Kelompok II (H) merupakan kelompok tikus yang diberi perlakuan diet tinggi lemak.
- c) Kelompok III (C) merupakan kelompok tikus yang diberi perlakuan diet tinggi lemak dan kopi.

### 3.5.3 Kriteria Sampel

#### a. Kriteria inklusi

Tikus *Rattus Novergicus* strain Wistar jantan dengan berat badan 180 gr – 200 gr berumur 2-3 bulan.

## 3.6 Alat dan Bahan Penelitian

### 3.6.1 Alat Penelitian

- a. Kandang tikus
- b. Tempat makan dan minum
- c. Sonde lambung
- d. Timbangan digital

- e. Scalpel
- f. label identitas
- g. Pisau mikrotom
- h. Pinset
- i. Deck glass/ kaca penutup
- j. Object glass/ kaca object
- k. Rak Pengecatan
- l. Disposable syringe
- m. Mikroskop cahaya

#### 3.6.2 Bahan Penelitian

- a. Pakan standart hewan coba dan air minum
- b. Kuning telur
- c. Minyak babi
- d. Kopi robusta
- e. Irisan arteri karotis tikus (*frozen section*)
- f. Akuades steril
- g. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / Methanol
- h. Antibodi primer anti TNF- $\alpha$  (Bioss)
- i. Antibodi sekunder Biotinilated (Dako)
- j. Antibodi sekunder streptavidin (Dako)
- k. IHC Kit
- l. DAB kromogen
- m. Xylene
- n. Mayer's hematoksilin
- o. Bahan sterilisasi yaitu, kapas, cotton roll.

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Ethical Clearance

Sebelum dilaksanakan penelitian, prosedur perlakuan hewan coba telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada dengan nomor surat 001062/KKEP/FGK\_UGM/EC/2017.

#### 3.7.2 Ringkasan Prosedur Penelitian

Sebelum diberi perlakuan tikus ditimbang. Selanjutnya tikus dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol, hiperlipid (H) dan hiperlipid+kopi (C). Kelompok H mendapat perlakuan berupa sondasi diet tinggi lemak selama perlakuan dan kelompok C mendapat perlakuan sondasi diet tinggi lemak dan seduhan kopi selama perlakuan. Pada hari ke-28 semua kelompok hewan coba dikorbankan dengan pemberian ketamin secara overdosis. Leher hewan coba di bedah dan difiksasi dengan larutan campuran PBS dan formalin. Setelah itu dilakukan trimming jaringan dan pemotongan beku (*frozen section*) secara melintang pada arteri karotis komunis sebelum percabangan menjadi arteri karotis interna dan eksterna. Kemudian dilakukan pewarnaan imunohistokimia untuk melihat ekspresi TNF- $\alpha$ .

#### 3.7.3 Tahap Persiapan dan Pembagian Kelompok Hewan coba

Penelitian ini akan dilakukan pada hewan coba tikus dengan kriteria yang telah ditentukan. Hewan coba diadaptasikan selama 1 bulan sebelum diberi perlakuan.

#### 3.7.4 Pembuatan larutan perlakuan

##### a. Larutan pakan hiperlipid

Bahan yang digunakan yaitu kuning telur bebek dan lemak babi. Teknik pembuatan suspense pakan hiperlipid adalah dengan cara mencampur 300 gram lemak babi dan 200 gram kuning telur bebek. Dosis lemak babi sebesar 150 gram/hari untuk manusia, setelah dikonversi untuk tikus menjadi :  $0,018 \times 150 \text{ gram} = 2,7$

gram/ 200 gram BB/hari. Jadi pemberian lemak babi pada tikus wistar sebesar 3 gram/200 gram BB/hari. Dosis untuk kuning telur adalah 2 gram/200 gram BB tikus (Harsa, 2014).

#### b. Seduhan Kopi

Seduhan kopi dibuat dari bubuk kopi robusta 3 gr dan di campur dengan air mendidih (100°C) sebanyak 200 cc (Susilawati, 2013) dan ditunggu sampai suhu 37°C atau suhu tubuh sebelum dilakukan sondase. Dosis untuk seduhan kopi didapatkan dari nilai konversi yaitu 0,018 dikalikan dengan banyaknya air kopi. Jadi untuk dosisnya adalah  $0,018 \times 200 \text{ ml} = 3,6 \text{ ml/ hari}$ , yang diberikan 2 kali sehari.

#### 3.7.5 Pemeriksaan Kadar LDL

Pemeriksaan profil lipid (LDL) dilakukan sebelum perlakuan dan sebelum dekapitasi. Pengambilan darah dilakukan melalui vena infraorbita sebanyak 3 ml yang diletakkan dalam tabung ependorf untuk kemudian dilakukan proses sentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm hingga didapatkan serum darah. Selanjutnya dilakukan penghitungan profil lipid secara enzimatik menggunakan spektrofotometer. Kadar LDL normal pada tikus yaitu dibawah 37,99 mg/dl. Jika lebih dari 37,99 mg/dl maka dapat dikatakan bahwa tikus sudah mengalami hiperlipidemia.

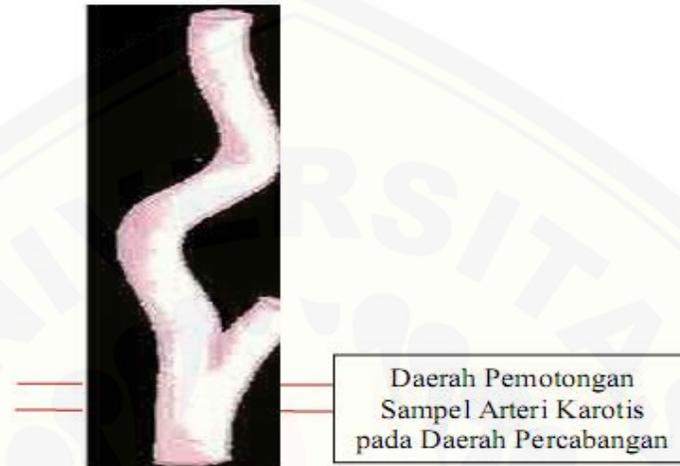
#### 3.7.6 Pengambilan Arteri Karotis

Setelah perlakuan selama 4 minggu pada hari ke-28 semua sampel hewan coba dieutanasia untuk diambil arteri karotisnya. Hewan coba dikorbankan dengan cara pemberian ketamin sebanyak 0.2 ml 200/gram BB. Setelah hewan coba mati, dilakukan pengambilan arteri karotis kanan dan kiri dengan cara membedah daerah leher.

#### 3.7.7 Pemrosesan Jaringan (Arteri Karotis)

Leher yang sudah dipotong kemudian difiksasi pada formalin 10% yang dicampur dengan larutan PBS dengan perbandingan 1:9. Selanjutnya dilakukan

pemotongan jaringan secara melintang pada daerah arteri karotis komunis sebelum bercabang menjadi arteri karotis interna dan eksterna untuk mendapatkan preparat histologi menggunakan metode Potongan Beku (*Frozen Section*) (Gambar3.1).



Gambar 3.1 Ilustrasi daerah pemotongan sampel arteri karotis (Sumber: Beigelman,2014)

Proses pemeriksaan histologis arteri karotis ini menggunakan pewarnaan imunohistokimia pada masing-masing preparat. Pengecatan imunohistokimia digunakan untuk mewarnai TNF- $\alpha$  pada endotel.

Teknik pengecatan Imunohistokimia yang dilakukan adalah sesuai dengan standar protokol, yaitu:

- a. Preparat direndam dalam aquades selama 10 menit
- b. Preparat dibilas dalam larutan PBS selama 5 menit
- c. Preparat diberi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 10 menit
- d. Bilas dengan larutan PBS 3x5 menit
- e. Preparat diberi antibody primer *anti rabbit* TNF- $\alpha$  1:500 dan didiamkan selama satu malam dalam suhu 4°C
- f. Setelah satu malam dikeluarkan dari suhu 4°C dan ditunggu sampai mencapai suhu kamar
- g. Bilas dengan larutan PBS 3x5 menit
- h. Preparat diberi antibody sekunder *anti mouse* Biotinilated selama 60 menit
- i. Bilas dengan larutan PBS 3x5 menit

- j. Preparat diberi antibodi sekunder *anti mouse* streptavidin selama 10 menit
- k. Bilas dengan larutan PBS 3x5 menit
- l. Preparat dilakukan pewarnaan DAB chromogen 1:200 dalam substrate selama 20 menit
- m. Bilas dengan larutan PBS 3x5 menit
- n. Bilas dengan akuades 10 menit
- o. Preparat dilakukan pengecatan Mayer's Hematoxilin selama 45 detik
- p. Bilas dengan air 10 menit
- q. Mounting menggunakan cairan gliserin lalu ditutup dengan cover glass.

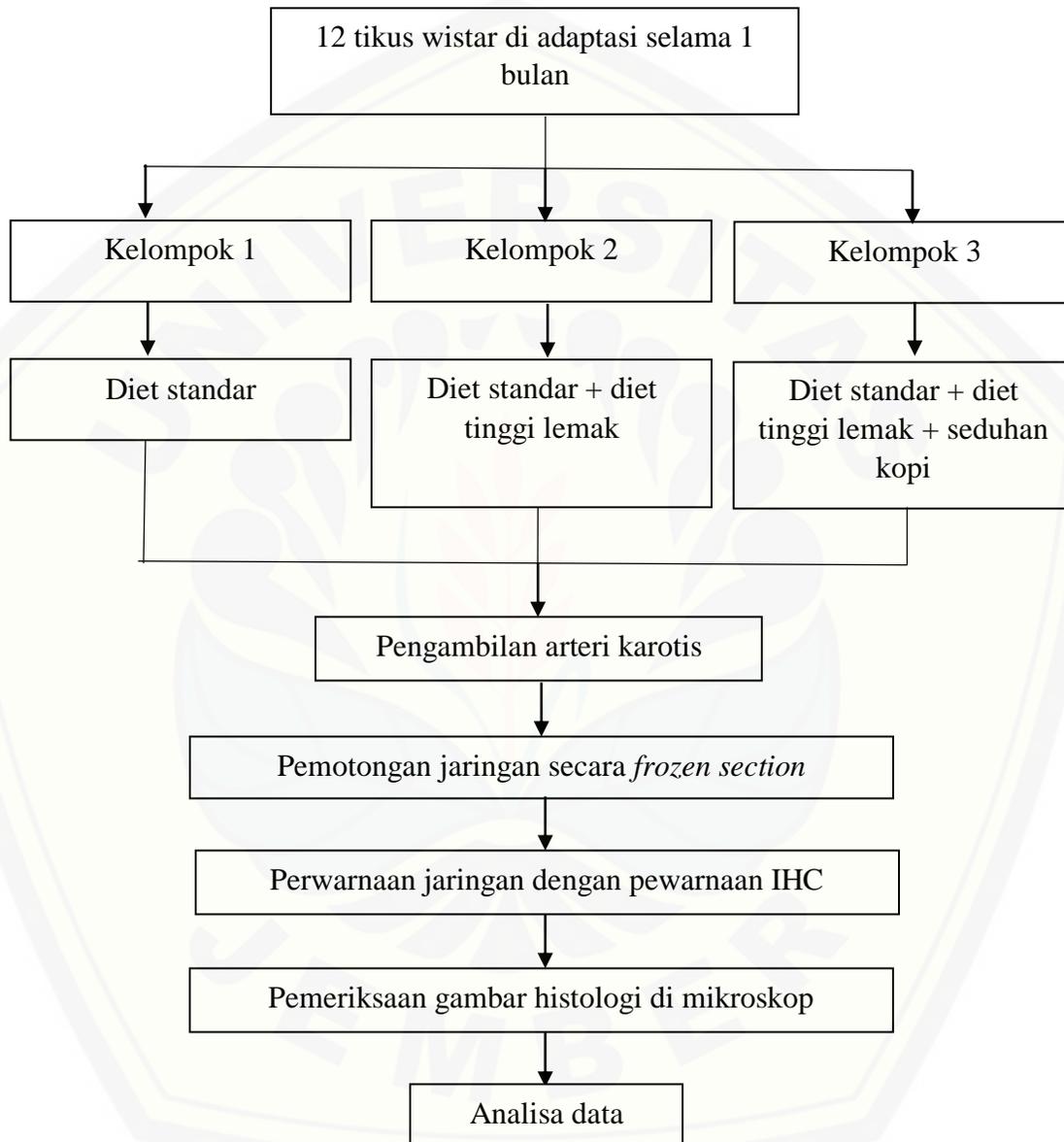
### 3.8 Pengamatan

Pengamatan gambaran histologi arteri karotis dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan pewarnaan imunohistokimia (IHC) pembesaran 400x. Pengamatan dilakukan oleh 3 pengamat pada 4 lapang pandang yang dianggap paling representatif. Pada gambaran histologi ekspresi TNF- $\alpha$  ditunjukkan dengan adanya intensitas warna coklat pada sitoplasma sel endotel di tunika intima. Penghitungan intensitas warna coklat yang menunjukkan ekspresi TNF- $\alpha$  dilakukan dengan bantuan *software ImageJ* dengan melihat angka *grayscale*. Nilai *grayscale* yang rendah menunjukkan ekspresi yang kuat, sedangkan nilai *grayscale* yang tinggi menunjukkan ekspresi yang lemah (Nafi, iyah, 2015).

### 3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa skala data rasio. Data dianalisis dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data yang terdistribusi secara normal, lalu uji homogenitas menggunakan *Levene Test*. Jika diperoleh hasil uji data terdistribusi normal dan homogen, selanjutnya diuji parametrik dengan *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan pada ketiga kelompok, didapatkan hasil ( $p < 0,05$ ) maka selanjutnya dapat dilanjutkan uji beda LSD untuk mengetahui perbedaan tiap-tiap kelompok ( $p > 0,05$ ).

### 3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur penelitian



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian seduhan kopi robusta dapat menurunkan ekspresi TNF- $\alpha$  pada sel endotel arteri karotis yang diinduksi diet tinggi lemak.

### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan berkaitan dengan penelitian ini adalah:

1. Perlu diteliti lebih lanjut mengenai variasi jenis, metode penyeduhan, dosis dan pemberian seduhan kopi robusta untuk mengetahui efek penurunan TNF- $\alpha$  yang lebih baik.
2. Peneliti lain yang berminat dalam penelitian sejenis, disarankan untuk meneliti ekspresi sitokin proinflamasi selain TNF- $\alpha$  seperti IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, kemokin dan ekspresi sitokin antiinflamasi.
3. Berdasarkan penelitian ini, kopi dapat dijadikan sebagai dasar bahan obat antiinflamasi dan antioksidan.

**DAFTAR PUSTAKA**

- American Association of Clinical Endocrinologist and American College of Endocrinology (AAACE/ACE). 2015. *Diabetes Comprehensive Care. Clinical Practice Guidelines*
- American Heart Association (AHA). 2011. *Metabolic risk for cardiovascular disease edited by Robert H. Eckel*. Wiley - Blackwell Publishing.
- Anwar, TB. 2011. *Dislipidemia Sebagai Faktor Resiko Penyakit Jantung Koroner. Skripsi*, Universitas Sumatera Utara.
- Aryafatta, 2008. *Kandungan Kafein Dalam Kopi*. Jakarta; Erlangga.
- Baraas F., 2006. *Kardiologi Molekuler, Radikal Bebas, Disfungsi Endotel, Aterosklerosis, Antioksidan, Latihan Fisik dan Rehabilitasi Jantung*. Yayasan Kardia Iqratama, RS. Jantung Harapan Kita.
- Baratawidjaja K, Rengganis I. 2009. *Imunologi Dasar, Edisi Kedelapan*. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Indonesia
- Bastard, J.P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M.J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., dan Feve, B. 2006. *Recent Advances in the Relationship Between Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance*. Eur Cytokin Netw. Mar;17(1);4-12. PubMed US National Library of Medicine.
- Botham KM, Mayes PA. 2012. *Bioenergetika dan metabolisme karbohidrat serta lipid*. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editors. *Biokimia Harper (Edisi 27)*. Jakarta: EGC
- Brown CT, 2014. *Penyakit aterosklerotik koroner*. Dalam: Price SA, Wilson LM (Eds). *Patofisiologi: konsep klinis proses-proses penyakit. Edisi 6*. Penerjemah: Brahm U. Pendit, Huriawati Hartanto, Pita Wulansari, dan Dewi Asih Mahanani. Jakarta: EGC.
- Daniel, W. 2005. *Biostatic Foundation for Analysis in The Health Sciences*. Eight Edition. Georgia: Willey
- Darniwa, Adisty V. & Ridwan, Ahmad. 2014. *Potensi Ekstrak Kayu Manis (Cinnamomum burmanii) Terhadap Perbaikan Profil Lipid Tikus yang Diinduksi Hiperlipidemia*. *Prosiding. Seminar Nasional : Peran Makanan Fungsional dalam Penanganan Penyakit Degeneratif dengan Pendekatan Nutrigenomik*. Yogyakarta : Fakultas Kedokteran UGM.

- Farah, A. 2012. *Coffee constituents in Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention. First Edition*. United Kingdom : Blackwell Publishing Ltd.
- Food and Drug Administration (FDA). 2007. Medicines in my home: caffeine and your body. *Jurnal of Food and Drug Administration*.
- Goetz CG. 2007. *Textbook of Clinical Neurology. Edisi 3*. Philadelphia : Saunders.
- Gofir, A. 2009. *Manajemen Stroke*. Yogyakarta: Pustaka Cendeka Press.
- Goldberg, A.C. 2008. *Dyslipidemia. The Merck Manual for Health Care Professionals*. USA. Merck Sharp and Dohme Corp.inc.
- Guyton, AC., dan Hall, JE. 2007. *Text Book of Medical Physiology*. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Hardinsyah. 2009. Polifenol dan Kopi Serta Manfaatnya Bagi Kesehatan. Sambutan Ketua Umum Pergizi Pangan Indonesia Pada Pembukaan Diskusi Ilmiah Polifenol Dan Kopi Serta Manfaatnya Bagi Kesehatan. Jakarta: Four Seasons Hotel, 4 April 2009
- Harsa, I Made Subhawa. 2014. Efek Pemberian Diet Tinggi Lemak terhadap Profil Lemak Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Ilmiah Kedokteran Vol. 3*
- Hartanto, O.S. 2009. Peran Sitokin dan Metabolisme Lipid dalam Stroke. *Jurnal Berkala Neurosains*.
- Herwiyarirasanta, B.A. 2010. Effect of Black Soybean Extract Supplementation in Low Density Lipoprotein Level of Rats (*Rattus norvegicus*) With High Fat Diet. *Science Article Universitas Airlangga*. Surabaya
- International Food Information Council Foundation (IFIC). 2008. Caffeine & health: clarifying the controversies. *IFIC Review*.
- Ita, Mada Mistahari. 2011. Pemberian *Growth Hormone* Menurunkan Kadar *Tumor Necrosis Factor –  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) Pada Tikus yang Dislipidemia. *Skripsi*. Universitas Udayana Denpasar.
- Jauch, E.C., Saver, J.L., Adams, H.P., Bruno, a., Connors, J.J., Demaerschalk, B.M., 2013. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart

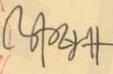
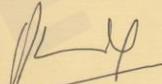
- Association/American Stroke Association. *Journal of The American Heart Association*.
- Johan Frostegard. 2013. *Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease*. BMC Medicine, vol 11.
- Lyrawati D. 2008. *Farmakologi Hipertensi*. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Kontush A., dan Chapman M.J. 2006. *Functionally defective highdensity lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis*. Pharmacol Rev : Sep;58(3):342-74
- Kontush A., dan Chapman, M.J. 2008. HDL :Close to our memories?. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. *Journal of The American Heart Association*
- Kumar, Abbas, Fausto, Mitcheel. 2007. *Robbins Basic Pathology. 8th edition*. Elsevier.
- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. 2007. *Buku ajar patologi .7 nd ed, Vol. 2*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC: 860-1.
- LaMorte, Wayne W. 2013. *Pathogenesis of Atherosclerosis*. Boston University School of Public Health.
- Li Meng, Shen Zhe, Li You-Ming. 2013. *Potential Role of Helicobacter Pylori Infection in Nonalcoholic Fatty liver disease*. World J Gastroenterol 19 (41) : 7024-7031.
- Mattioli, A.V., Farinetti, A., Miloro, C., Pedrazzi, P., Mattioli,G. 2011. Influence of coffee and caffeine consumption on atrial fibrillation in hypertensive patients.*Journal of Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*.
- Mayer, G. 2006. *Immunology Innate (non specific ) Immunity. Microbiology and Immunology On-Line Textbook*. USC School of Medicine.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J. & Hu, Y. 2013. Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism : A Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
- Murray Robert K, Granner Daryl K, Mayes Peter A, Rodwell Victor W. Bani Anna P, Sikumbang Tiara M.N. (2003). *Biokimia Harper. 25th ed*. Jakarta : EGC.

- Murray, R. K., Granner, D. K., & Rodwell, V. W. 2009. *Biokimia harper (27 ed.)*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Nafi, iyah, N. 2015. Algoritma Kohonen dalam Mengubah Citra Graylevel Menjadi Citra Biner. *Jurnal JITIKA*. Vol 9
- Najayati, S. & Danarti. 2012. *Kopi, Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Jakarta : PT. Penebar Swadaya.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta : Rineka Cipta.
- Price, Sylvia Anderson; Wilson, M. Loraine. 2006. *Komplikasi Diabetes Melitus dalam Patofisiologi Konsep Klinis Proses - Proses Penyakit*. Edisi 6. EGC.Jakarta.
- Pristiana, D.Y., Siti Susanti., Nurwantoro. 2017. Aktivitas Antioksidan dan Kadar Fenol Berbagai Ekstrak Daun Kopi (*Coffea sp.*): Potensi Aplikasi Bahan Alami untuk Fortifikasi Pangan. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*.
- Rahardjo, Pudji. 2012. *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Penebar Swadaya: Jakarta.
- Ross R. 2007. *Pathogenesis of atherosclerosis*. In : *Heart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Braunwald E, Zipes PD, Libby P, W.B. Saunders Company, Sixth edition. Philadelphia, pp. 915-933.
- Sargowo, D., Seniorita, A., Widodo, A., 2010. Peranan ekstrak kulit manggis dalam penurunan kadar TNF- $\alpha$  dan IL-1 Pada dyslipidemia. *Skripsi*, Universitas Brawijaya
- Singh, V., Malkunje L, Mohammad S, Singh N, Dhasmana S, Das S K. 2012. The Maxillofacial Injuries: A Study. *National Journal of Maxillofacial Surgery* 3: 166-171
- Smeltzer, S, & Bare. 2008. *Brunner & Suddarths Textbook of Medical Surgical Nursing*. Philadelphia : Lippin cott
- Schneider Barbara , Martin Carnoy, Jeremy Kilpatrick, William H. S, Richard J. S. 2007. *Estimating Causal Effects Using Experimental and Observational Designs*. Washington, D.C : American Educational Research Association.

- Subowo, 2009. *Imunobiologi Edisi 2.*, CV Sagung Seto Jakarta.
- Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid II edisi V.* Jakarta: Interna Publishing.
- Sukhanov, S., Higashi, Y., Yung Shai, S., Vaughn, C., Mohler, J., Li, Y., Hua Song, Y., Titterington, J., Delafontaine, P. 2007. IGF-1 Reduces Inflammatory Responses, suppresses Oxidative Stress, and Decreases Atherosclerosis Progression in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27;84-2690.
- Susilawati, I.D.A., Suryono, Ermawati, T. 2013. Kajian Efek Kopi Pada Periodontitis dan Aterosklerosis. *Penelitian Fundamental DP2M Dikti.*
- Tugasworo D, Purwaningsih E. 2010. *Patogenesis aterosklerosis.* Semarang : BP UNDIP ;. p. 3-19.
- Thomas, A.N.S. 2007. *Tanaman Obat Tradisional.* Yogyakarta. Kanisus.
- Weinberg BA, Bonnie KB. 2010. *The Miracle of Caffeine: Manfaat Tak Terduga Kafein Berdasarkan Penelitian Paling Mutakhir.* Bandung: Penerbit Qanita.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas.* Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- World Health Organization. 2013. *Programmes and Projects : Cardiovascular diseases.* Geneva: World Health
- Yuwono HS. 2005. Dapatkah serbuk kopi membantu menyembuhkan luka?. Suatu Penelitian Pendahuluan.; Kongres Nasional ke-2 Obat Tradisional Indonesia. Diselenggarakan SP3T Bandung, Jawa Barat.
- Zhao, Y., Wang, J., Balleve, O., Luo, H. & Zhang, W. 2011. Antihypertensive Effects and Mechanisms of Chlorogenic Acids. *Hypertension Research.*

## LAMPIRAN

## A. Ethical Clearance

 <b>KOMISI ETIKA PENELITIAN</b> <b>FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA</b> Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta Telp. 081239447900	
<b>KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN</b> <b>("ETHICAL CLEARANCE")</b> No.001062/KKEP/FGK-UGM/EC/2017	
Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:	
Judul	: KAJIAN EFEK KOPI PADA INHIBISI ATEROSKLEROSIS KAROTIS
Peneliti Utama	: drg. Rendra Chriestedy Prasetya, M.DSc
Anggota Penelitian	: drg. Nadie Fatimatuzzahro, M.DSc
Penanggung Jawab Medis	: drg. Rendra Chriestedy Prasetya, M.DSc
Unit/Lembaga	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Lokasi Penelitian	: 1. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember 2. Laboratorium Biomolekuler Universitas Jember
Waktu Penelitian	: Mei 2017 – Selesai
Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.	
Wakil Dekan Bidang Penelitian, Pengabdian Kepada Masyarakat dan Kerjasama  drg. Triana Wahyu Utami, M.DSc., Ph.D.	Yogyakarta, 4 Mei 2017 Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM  Prof. Dr.drg. Pinandi Sri Pudyani, SU., Sp.Ort(K)

## B. Surat Izin Penelitian


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

---

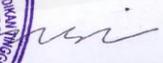
Nomor : ~~0238~~ /UN25.8/TL/2018  
 Perihal : Ijin Penelitian

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	: Kanwangwang Dwi N.A
2	NIM	: 141610101036
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Mastrib 2 No10 Jember
6	Judul Penelitian	: Pengaruh Kopi Robusta (Coffe Cenephora) Terhadap Ekspresi TNF $\alpha$ Pada Sel Endotel Arteri Korotis Tikus Wistar Yang Induksi Diet Tinggi Lemak
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
8	Data/alat yang dipinjam	: -
9	Waktu	: Januari 2018 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Mengetahui Pengaruh Kopi Robusta (Coffe Cenephora) Terhadap Ekspresi TNF $\alpha$ Pada Sel Endotel Arteri Korotis Tikus Wistar Yang Induksi Diet Tinggi Lemak
11	Dosen Pembimbing	: 1. Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti , M.Si 2. drg. Nadie Fatimatuazzahro, MD.Sc

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an Dekan  
 Wakil Dekan I,  
  
  
**Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes**  
 NIP.196109031986022001



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

Nomor : 0239 /UN25.8/TL/2018  
Perihal : Ijin Penelitian

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                    | : Kanwangwang Dwi N.A   |
| 2  | NIM                     | : 141610101036  |
| 3  | Semester/Tahun          | : 2017/2018   |
| 4  | Fakultas                | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember   |
| 5  | Alamat                  | : Jl. Mastrip 2 No10 Jember   |
| 6  | Judul Penelitian        | : Pengaruh Kopi Robusta (Coffe Cenephora0 Terhadap Ekspresi TNF $\alpha$ Pada Sel Endotel Arteri Karotis Tikus Wistar Yang Induksi Diet Tinggi Lemak                  |
| 7  | Lokasi Penelitian       | : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  |
| 8  | Data/alat yang dipinjam | : -   |
| 9  | Waktu                   | : Januari 2018 s/d Selesai  |
| 10 | Tujuan Penelitian       | : Untuk Mengetahui Pengaruh Kopi Robusta (Coffe Cenephora0 Terhadap Ekspresi TNF $\alpha$ Pada Sel Endotel Arteri Karotis Tikus Wistar Yang Induksi Diet Tinggi Lemak |
| 11 | Dosen Pembimbing        | : 1. Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti , M.Si<br>2. drg. Nadie Fatimatuzzahro, MDSc  |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an Dekan  
Dekan I,

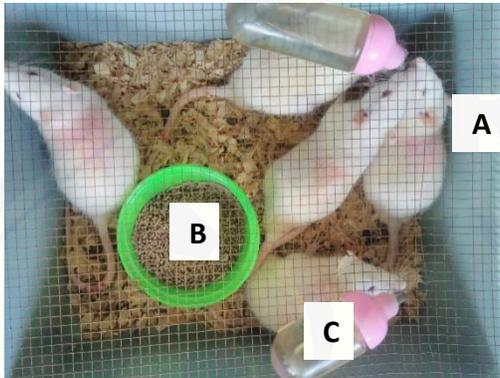


**Dl. drg. JDA Susilawati, M.Kes**  
NIP.196109031986022001

## C. Alat dan Bahan Penelitian

### 1. Alat Penelitian

#### 1. Alat Pemeliharaan Hewan Coba



Keterangan :

- A. Kandang
- B. Tempat Makan
- C. Tempat Minum
- D. Timbangan Digital

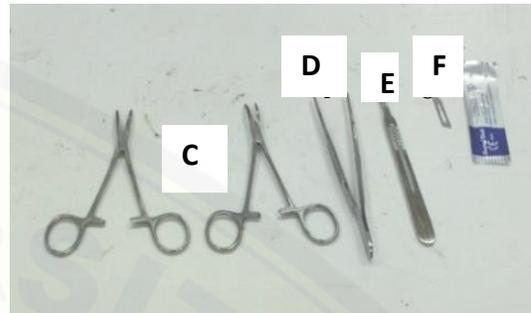
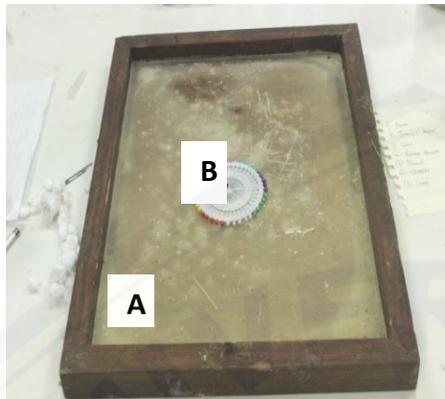
#### 2. Alat Pemberian Pakan Hiperlipid



Keterangan :

- A. Sonde Lambung
- B. Syringe

3. Alat Pembedahan Hewan Coba



Keterangan :

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

4. Alat Pemrosesan Jaringan dan Pengecatan



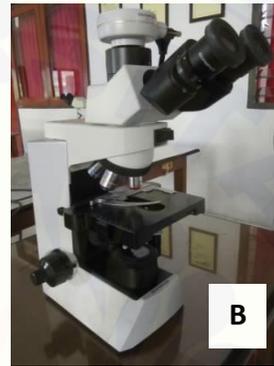
Keterangan :

A. Mesin *Frozen section*

B. *Freezer*

C. Rak Pengecatan

5. Alat untuk Pengamatan



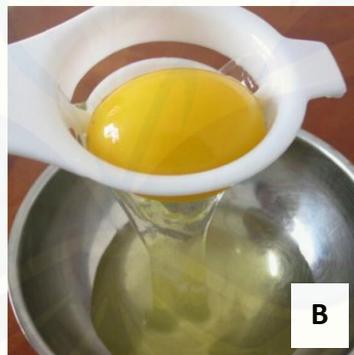
Keterangan :

A. Optilab

B. Mikroskop

Cahaya

2. Bahan Penelitian





Keterangan :

- |   |                               |
|---|-------------------------------|
| A. Lemak Babi                                 | E. Antibodi Sekunder, Mayer's |
| B. Kuning Telur Bebek                         | Hematoksin                    |
| C. Kopi Robusta "Gunung Ijen" PTP XII Persero | F. Larutan PBS                |
| D. Bahan Pengecatan Antibodi TNF- $\alpha$    | G. Entellan                   |

### 3. Proses Pembedahan Hewan Coba



A. Anastesi ketamin



B. Pembedahan hewan coba untuk pengambilan leher

### 4. Proses *Frozen Section*



A. Alat untuk memotong jaringan dengan suhu dalam alat  $-20^{\circ}\text{C}$   
Pemotongan jaringan dengan mesin *frozen section*



B. Pemotongan jaringan dengan mesin *frozen section*

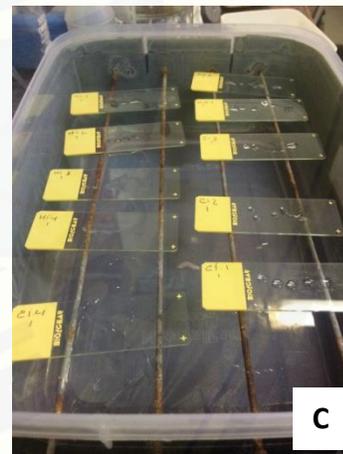
5. Proses Pengecatan Jaringan



A. Pemberian antibodi primer



B. Pemberian antibodi sekunder

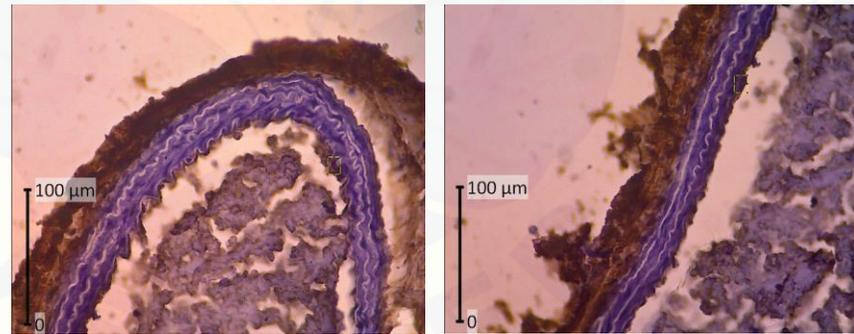
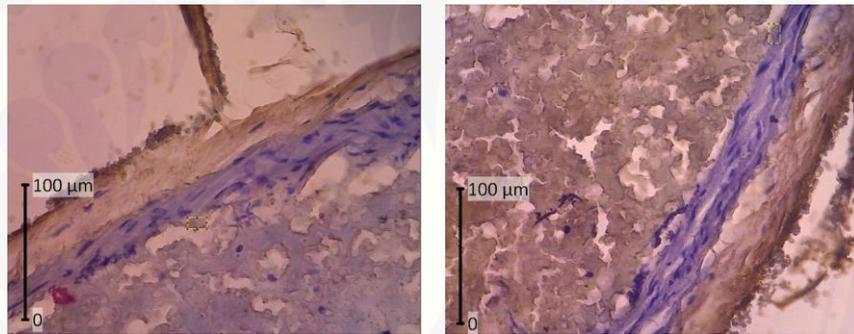
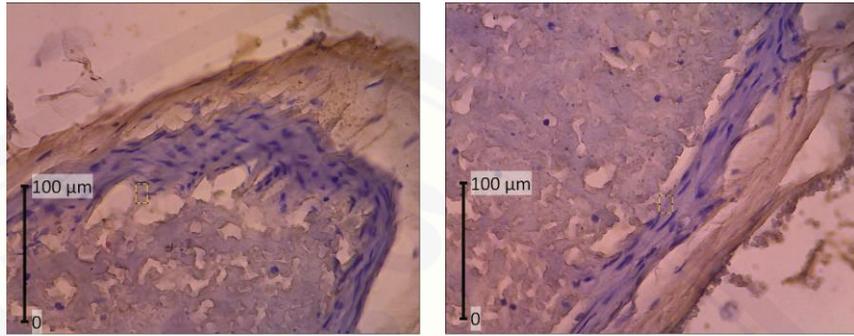


C. Proses pengecatan IHC

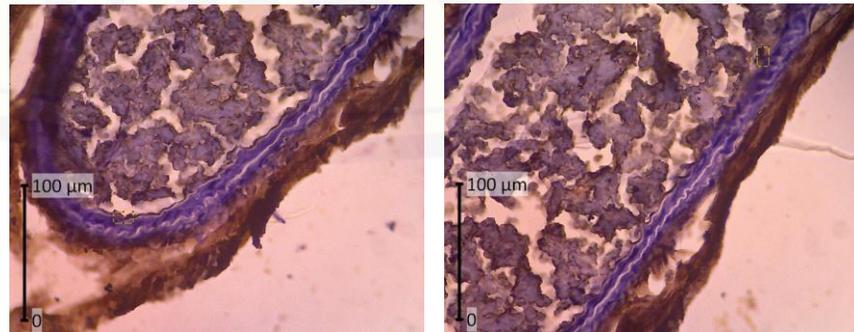
**D. Data Hasil Penelitian**

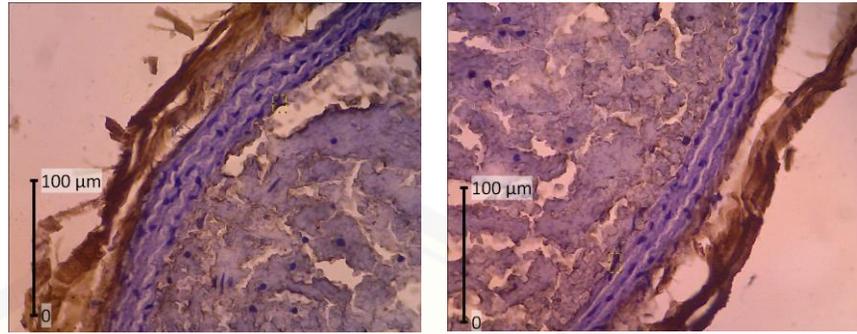
- a. Gambaran histologi arteri karotis tikus dengan pewarnaan imunohistokimia (400x)

Kontrol

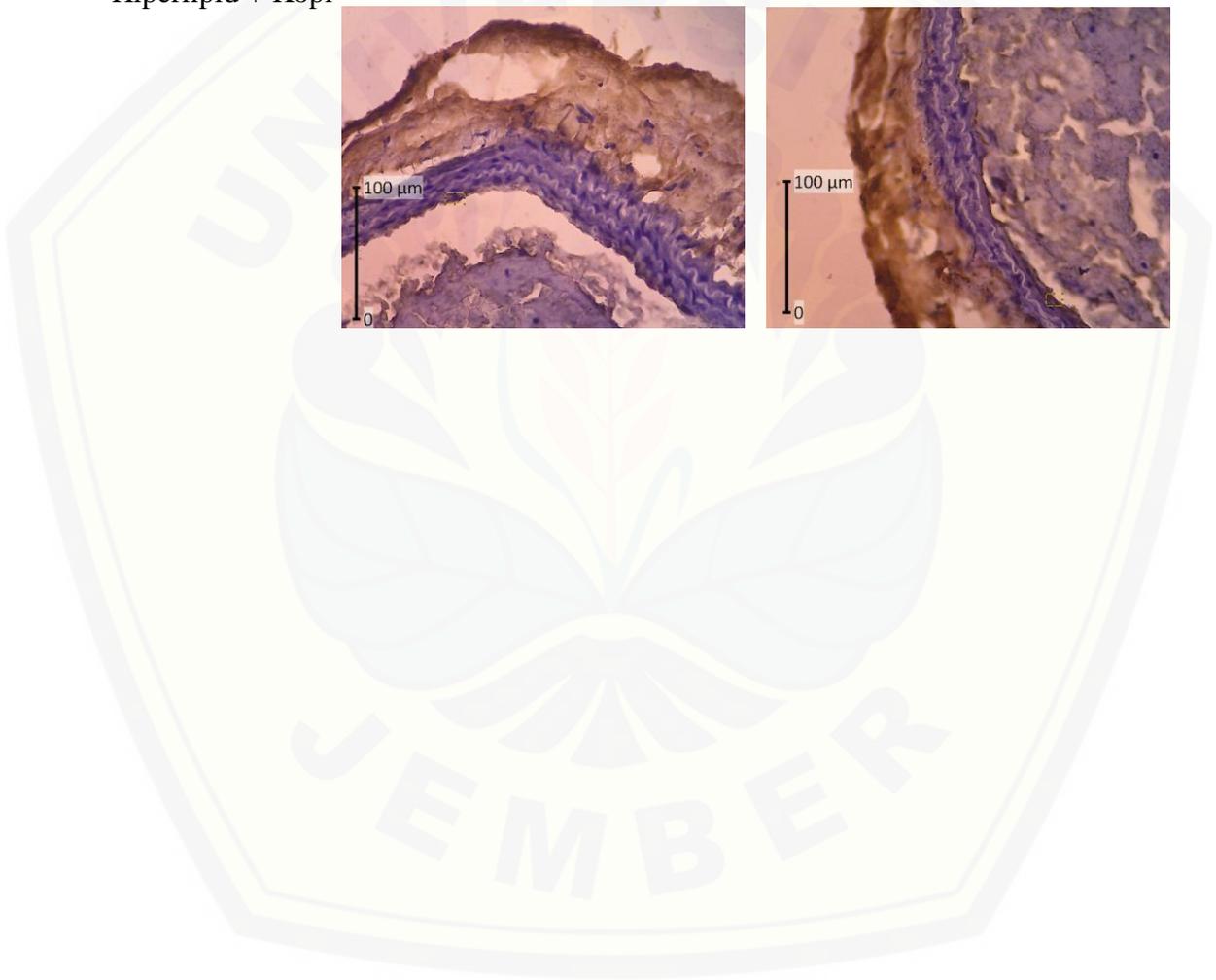
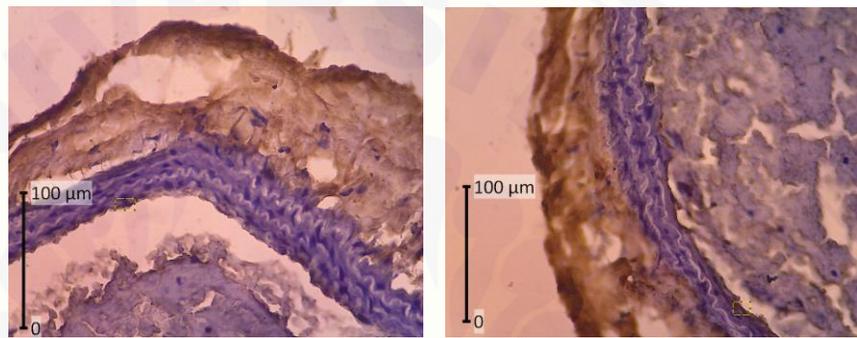


Hiperlipid





Hiperlipid + Kopi



b. Tabel Hasil Penghitungan ekspresi TNF- $\alpha$ 

Kelompok	Pengamat 1	Pengamat 2	Pengamat 3	Rata-rata
K1	119	117	117	118
K2	107	106	104	106
K3	109	109	109	109
K4	109	113	112	111
H1	75	77	76	76
H2	77	78	77	77
H3	79	77	77	78
H4	81	80	80	80
C1	85	85	88	86
C2	87	93	92	91
C3	96	92	95	94
C4	97	97	98	97

Keterangan:

K : Kelompok kontrol

H : Kelompok hiperlipid

C : Kelompok hiperlipid+kopi

**E. Hasil Uji Statistik**a. Hasil Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Tests of Normality				
	Kelompok	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Hasil	Kontrol	0,944	4	0,677
	Hiperlipid	0,971	4	0,85
	Kopi	0,984	4	0,925

## a. Lilliefors Significance Correction

b. Hasil homogenitas *Levene*

Test of Homogeneity of Variances			
Hasil			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,253	2	9	0,331

c. Hasil Uji beda *One Way ANOVA*

ANOVA					
Hasil					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2226,167	2	1113,083	65,583	0
Within Groups	152,75	9	16,972		
Total	2378,917	11			

d. Hasil Uji lanjut *Least Significant Difference* (LSD)

Multiple Comparisons					
Dependent Variable: Hasil					
LSD					
(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
Kontrol	Hiperlipid	33,25000*	2,91309	0	26,6601
	Kopi	19,00000*	2,91309	0	12,4101
Hiperlipid	Kontrol	-33,25000*	2,91309	0	-39,8399
	Kopi	-14,25000*	2,91309	0,001	-20,8399
Kopi	Kontrol	-19,00000*	2,91309	0	-25,5899
	Hiperlipid	14,25000*	2,91309	0,001	7,6601

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