



**UJI SITOTOKSISITAS KOPI ROBUSTA DEKAFFEINASI
PADA KULTUR SEL FIBROBLAS GINGIVA MANUSIA**

SKRIPSI

Oleh

Dhystika Zahrah Septania

131610101048

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**UJI SITOTOKSISITAS KOPI ROBUSTA DEKAFEINASI
PADA KULTUR SEL FIBROBLAS GINGIVA MANUSIA**

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

**Dhystika Zahrah Septania
131610101048**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

SKRIPSI

**UJI SITOTOKSISITAS KOPI ROBUSTA DEKAFEINASI
PADA KULTUR SEL FIBROBLAS GINGIVA MANUSIA**

HALAMAN PEMBIMBINGAN

Oleh

**Dhystika Zahrah Septania
NIM. 131610101048**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S.

Dosen Pembimbing Pendamping : Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes.

PERSEMBAHAN

Dengan setulus hati skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Edy Rusdianto, Ibunda Siti Nurharini tercinta yang membesarkan sedari kecil, senantiasa memberikan motivasi, nasehat dan bimbingan, serta doa setulus hati yang tiada henti diberikan sampai saat ini;
2. Kakak tercinta Adisty Novensca S.Gz, Adik tercinta Siddy Akbar Febrianza dan Dissy Anissa Febrilianty atas segala dukungan;
3. Guru – guru, ustad – ustadzah dan dosen – dosenku yang telah menuangkan ilmunya dan membimbing sejak TK hingga Perguruan Tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTO

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kadar kesanggupannya.” (Q.S. Al-Baqarah: 286)

“Dan janganlah kamu berputus asa dari rahmat Allah. Sesungguhnya tiada berputus asa dari rahmat Allah melainkan orang-orang yang kufur (terhadap karunia Allah). ” (Q.S. Yusuf: 87)

*Al-Qur'anul Karim, Special for Muslimah. 2012. Bandung: Cordoba Internasional Indonesia

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dhystika Zahrah Septania

NIM : 131610101048

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Sitotoksisitas Kopi Robusta Dekafeinasi pada Kultur Sel Fibroblas Gingiva Manusia” 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 manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juli 2018

Yang menyatakan,

Dhystika Zahrah Septania

NIM 131610101048

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Sitotoksisitas Kopi Robusta Dekafeinasi pada Kultur Sel Fibroblas Gingiva Manusia” ini telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari : Kamis

tanggal : 31 Mei 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota

drg. Rendra Christedy Prasetya, MD.Sc
NIP. 198305312008011003

Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes
NIP. 196903031997022001

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

Dr. drg. Zahreni Hamzah, M.S
NIP. 196104011985112001

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes
NIP. 197005091999032001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros
NIP. 196901121999601001

RINGKASAN/SUMMARY

Uji Sitotoksitas Kopi Robusta Dekafeinasi pada Kultur Sel Fibroblas Gingiva Manusia. Dhystika Zahrah Septania 131610101048, 48 halaman. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Kopi robusta banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Kopi robusta dapat menimbulkan dampak negatif dan positif bagi kesehatan. Dampak negatif pada kopi robusta disebabkan karena kandungan kafein pada kopi robusta. Kafein pada kopi dapat menimbulkan komplikasi kesehatan. Kafein dapat menginduksi kematian sel terprogram/apoptosis. Apabila apoptosis sel tidak terkendali proliferasi pada siklus sel akan terhambat. Oleh karena itu, kopi robusta dilakukan proses dekafeinasi sehingga dampak negatif dari kafein berkurang. Proses pembuatan kopi robusta dekafeinasi dilakukan dengan metode *swiss water process*. Kopi robusta dekafeinasi pada sel fibroblas belum dilakukan penelitian. Penelitian ini diperlukan untuk menguji biokompatibilitas dengan uji sitotoksitas. Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah mengetahui efek toksik suatu bahan tehadap sel.

Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT Assay. Penelitian uji MTT Assay dilakukan setelah menyiapkan bahan penelitian berupa kopi robusta dekafeinasi yang dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 1,2 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,0375 mg/ml dan kultur sel fibroblas gingiva manusia dengan pertumbuhan 80% konfluen. Sel fibroblas dengan konsentrasi 2×10^3 sel/180 μ l di distribusikan ke dalam 96 *microwell plate* dan dipaparkan kopi robusta dekafeinasi sesuai konsentrasi. Uji MTT Assay dilakukan berdasarkan kapasitas enzim suksinat dehydrogenase dalam mitokondria yang mengubah garam kuning larut air MTT menjadi Kristal formazan berwarna biru tua keunguan. Intensitas warna biru tua keunguan menunjukkan aktivitas sel yang absorbansinya dapat dibaca dengan ELISA reader. Data absorbansi kemudian dikonversikan ke dalam persentase viabilitas sel.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kopi robusta dekafeinasi tidak toksik apabila dipaparkan pada sel fibroblas gingiva manusia dengan rata-rata viabilitas sel di atas 90%. Konsentrasi 0,0375 mg/ml dipilih sebagai konsentrasi optimum yang dapat dimanfaatkan sebagai alternatif tindakan preventif dalam bentuk obat kumur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kopi robusta dekafeinasi dapat membantu kinerja sel fibroblas gingiva manusia. Peningkatan proliferasi sel akibat pemaparan bahan kopi robusta dekafeinasi dapat membantu kinerja sel yang terdapat jejas, sehingga proses penyembuhan lebih cepat. Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kopi robusta tidak toksik pada kultur sel fibroblas gingiva manusia.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksisitas Kopi Robusta Dekafeinasi pada Kultur Sel Fibroblas Gingiva Manusia”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Ayahanda Edy Rusdianto, Ibunda Siti Nurharini, Adisty Novensca, Siddy Akbar Febrianza, Dissy Annisa Febrilianty yang tidak pernah berhenti memberikan segala macam dukungan, kasih sayang, do'a dan semangat dalam penyelesaian skripsi ini;
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. Dr. drg. Zahreni Hamzah M.S., Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes., selaku dosen pembimbing skripsi yang selama ini dengan sabar membimbing, memberikan nasihat dan bantuan dalam penyelesaian penelitian serta selalu memotivasi untuk menyelesaikan skripsi;
4. drg. Rendra Christedy Prasetya, MD.Sc., Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes., selaku dosen penguji skripsi yang telah memberi masukan demi kesempurnaan skripsi;
5. drg. Hestieyonini Hadnyanawati M.Kes., selaku dosen pembimbing akademik. yang telah memberikan banyak nasihat dan selalu memotivasi sedar mahasiswa baru;
6. Bapak Kaliawan selaku Staf Laboratorium Kimia Analisis Instrumentasi Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang, dan Ibu Rumbi selaku Staf Laboran Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM yang telah membantu dalam proses penelitian;

7. Mochammad Fahmi, yang menguatkan, memberikan pencerahan, menemani di kala suka dan duka selama menempuh perkuliahan hingga penyelesaian skripsi ini;
8. Keluarga kedua selama di Jember tercinta, Anastasia Okta Erisha, Usnida Mubarokah, Cholida Rachmatia, Farah Firdha, Danarwati Budiningrum, Dassy Fitri Wulandari yang mencurahkan dukungan dan semangat;
9. Rekan seperjuangan skripsi: Putri, Ziyana , mbak Lulu, mbak popon, mas agya, Shandy, Nico, Adnan, Sani, Kharishah, Mbak Fatim, Rachel, Elissa, Clara yang telah menemani dan membantu selama proses pembuatan skripsi;
10. Sahabat – sahabat SMA Astie Dyah Rahmawati, Sekarsih Saptanti yang selalu memberikan waktunya untuk memberi dukungan dari jauhan dan selalu menginspirasi;
11. Seluruh teman-teman seperjuangan FKG angkatan 2013;
12. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian; atas perhatian, perkenan dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan khususnya dibidang kesehatan serta menjadi upaya dalam meningkatkan mutu kesehatan masyarakat.

Jember, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
SKRIPSI	ii
HALAMAN PEMBIMBINGAN	iii
PERSEMBAHAN	iv
MOTO	v
PERNYATAAN	vi
PENGESAHAN	vii
RINGKASAN/SUMMARY	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.3 Tujuan Penilitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kopi	4
2.2 Jenis Kopi	4
2.2.1 Kopi Robusta	4
2.2.2 Taksonomi kopi robusta.....	5
2.2.3 Jenis Kopi Berdasar Pengolahan.....	6
2.2.4 Kandungan Senyawa Dalam Kopi Robusta.....	6
2.3 Kopi Robusta Dekafeinasi	10
2.4 Fibroblas	12
2.4.1 Struktur Fibroblas	12
2.5 Siklus Sel	13
2.6 Uji Sitotoksitas (MTT Assay)	14
2.7 Kerangka konsep	18
2.7 Hipotesis	19

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	20
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	20
3.2 Tempat Penelitian.....	20
3.3 Waktu Penelitian	20
3.4 Variabel Penelitian	20
3.5 Definisi Operasional	21
3.5.1 Kopi Robusta dekaffeinasi	21
3.5.2 Sel fibroblas gingiva manusia	21
3.5.3 Uji sitotoksitas.....	21
3.6 Sampel Penelitian	21
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	22
3.7.1 Alat Penelitian.....	22
3.7.2 Bahan Penelitian	22
3.8 Prosedur Penelitian	23
3.8.2 Pembuatan Konsentrasi kopi robusta dekaffeinasi.....	23
3.8.3 Kultur Sel Fibroblas.....	24
3.8.4 Panen Sel Fibroblas	24
3.8.5 Penghitungan dan pembuatan konsentrasi sel fibroblas yang akan digunakan untuk sampel	24
3.8.6 Uji Sitotoksitas (MTT Assay)	25
3.8.7 Pengamatan hasil	26
3.9 Analisis data	26
3.10 Alur penelitian.....	27
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Hasil Penelitian dan Analisa Data.....	28
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	33
5.1 Kesimpulan	33
5.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34
LAMPIRAN	39

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 komposisi kimia dari biji dan bubuk kopi robusta dekafeinasi	8
Tabel 4.1 Presentase viabilitas sel fibroblas gingiva manusia.....	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Rumus bangun kafein.....	9
Gambar 2.2 (a) Rumus bangun asam klorogenat (b) Rumus bangun asam kafeat (c) Rumus bangun asam quinat.....	10
Gambar 2.3 Gambaran sel fibroblast gingiva manusia.....	14
Gambar 4.1 Efek kopi robusta dekaffeinasi terhadap sel fibroblas.....	17
Gambar 3.1 Kopi robusta dekaffeinasi pada tabung appendorf	22
Gambar 3.2 Cara perhitungan sel fibroblas hemositometer.....	23
Gambar 3.3 Alur Penelitian	26
Gambar 4.1 Viabilitas sel fibroblas gingiva manusia yang dipapar kopi robusta dekaffeinasi	28

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN A. Surat keterangan <i>Ethical Clearance</i>	38
LAMPIRAN B. Surat Izin Penelitian	39
LAMPIRAN C. Perhitungan Pengenceran	40
LAMPIRAN D. Hasil Absorbansi ELISA <i>Reader</i>	40
LAMPIRAN E. Analisis Data.....	41
LAMPIRAN F. Prosedur Penelitian	43
LAMPIRAN G. Alat dan Bahan Penelitian	46

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi robusta banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Berdasarkan statistik perkebunan komoditas kopi Direktorat Jendral Perkebunan, dari total produksi kopi Indonesia komposisi kopi robusta kurang lebih delapan puluh tiga persen dan sisanya tujuh belas persen kopi arabika. Produksi kopi dalam negeri selalu mengalami kenaikan tiap tahun, terhitung dari tahun 2014 hingga tahun 2016 (Dofir, 2016).

Kopi robusta dekaffeinasi memiliki kandungan yang dapat bermanfaat bagi tubuh seperti trigonellin, asam kafeat, asam klorogenik. Asam kafeat dapat memberikan efek bioaktif pada senyawa antioksidan. Asam kafeat juga memiliki efek anti-inflamasi, anti-mutagenik, anti-bakteri dan anti-karsinogenik (Li *et al.*, 2015). Asam klorogenik berperan pada sel fibroblas yaitu mampu melawan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dengan cara mempertahankan struktur normal sel dan fungsinya (Winarsi, 2007).

Penelitian untuk menguji biokompatibilitas kopi robusta dekaffeinasi terhadap jaringan atau sel di rongga mulut masih belum banyak dilakukan. Untuk mengetahui biokompatibilitas suatu bahan kedokteran gigi dapat dilakukan dengan pemeriksaan invitro menggunakan uji sitotoksitas (Emilda *et al.*, 2014). Uji sitotoksitas digunakan untuk mengukur efek toksik bahan terhadap sel. Efek toksitas bahan diukur dengan pengukuran viabilitas sel dalam kultur (Freshney, 2000; Craig dan Powers, 2002). Toksisitas merupakan kemampuan racun/ zat toksik yang menimbulkan cidera dan kerusakan sistem biologis. Berdasarkan ISO 10993-5 tahun 2009 menunjukkan bahwa semakin kecil hasil kehidupan sel menunjukkan penurunan aktivitas metabolismik sel. Persentase viabilitas sel semakin rendah menunjukkan semakin tingginya potensi sitotoksitas suatu biomaterial. Jika viabilitas kurang dari 90% maka biomaterial tersebut berpotensi toksik.

Sel fibroblas mudah dikultur karena memiliki kemampuan tumbuh dan melekat yang tinggi serta regenerasi yang cepat (Freshney, 2005). Sel fibroblas merupakan sel yang paling banyak digunakan untuk uji sitoksisitas material di bidang kedokteran gigi. Sel fibroblas terlibat secara aktif dalam pembentukan serat terutama serat kolagen dan matriks ekstraseluler lainnya (Freshney, 2005). Apabila sel fibroblas gingiva mengalami jejas akibat terpapar bahan toksik akan mengalami gangguan pada proses perbaikan atau penyembuhan jaringan. Rangsangan bahan toksik dapat menyebabkan jejas pada sel dengan cara merusak membran sel, mitokondria, dan mengganggu enzim-enzim atau substrat endogen sel (Cotran *et al.*, 1999).

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan sebagai dasar bahwa kopi robusta dekaffeinasi aman bagi sel dan jaringan gingiva manusia. Kopi robusta dekaffeinasi dapat dijadikan sebagai tindakan preventif dalam bidang kedokteran gigi seperti dalam bentuk obat kumur. Pemilihan bahan sebagai obat kumur karena kandungan *chlorhexidine gluconate* 0,2% pada obat kumur memiliki sifat anti-bakteri berspektrum luas dan digunakan sebagai pembersih kavitas, *chlorhexidine gluconate* 0,2% juga memiliki sifat toksik bila dipapar dengan konsentrasi tinggi (Lessa *et al.*, 2010).

Berdasarkan penelitian (Chang, 2001) pemaparan *chlorhexidine gluconate* 0,2% selama 120 detik terhadap sel fibroblas ligament periodontal manusia menyebabkan hampir seluruh aktivitas mitokondria. Pengaruh *chlorhexidine gluconate* 0,2% dapat menghambat sintesis DNA dan proliferasi sel sehingga menurunkan persentase kehidupan sel. Kopi robusta dekaffeinasi sebagai bahan preventif dalam bentuk obat kumur masih belum ada. Namun perlu di kaji lebih lanjut mengenai dosis yang tepat dan toksisitas kopi robusta dekaffeinasi sehingga tidak membahayakan sel dan jaringan gingiva manusia. Berdasarkan uraian di atas maka perlu dikaji tentang toksisitas kopi robusta dekaffeinasi terhadap sel fibroblas gingiva manusia.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimana toksisitas kopi robusta dekaffeinasi pada kultur sel fibroblas gingiva manusia?.

1.3 Tujuan Penilitian

Tujuan umum dari penelitian ini untuk mengetahui dan menganalisis toksisitas kopi robusta dekaffeinasi pada kultur sel fibroblas gingiva manusia.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

- 1.4.1 Memberikan informasi hasil uji toksisitas kopi robusta dekaffeinasi terhadap sel fibroblas gingiva manusia.
- 1.4.2 Menjadikan kopi robusta dekaffeinasi sebagai salah satu alternatif pemilihan bahan herbal seperti obat kumur dalam Kedokteran Gigi.
- 1.4.3 Sebagai acuan dasar penelitian berikutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kopi

Kopi merupakan salah satu jenis tanaman perkebunan yang sudah lama dibudidayakan dan memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Kopi berasal dari Afrika, daerah pegunungan Etiopia. Kopi baru dikenal oleh masyarakat dunia setelah tanaman tersebut dikembangkan di luar daerah asalnya, yaitu Yaman di bagian Selatan Arab melalui saudagar Arab (Rahardjo, 2012).

Kopi merupakan sejenis minuman yang berasal dari proses pengolahan biji tanaman kopi. Kopi digolongkan ke dalam famili Rubiaceae dengan genus *Coffea*. Secara umum, kopi hanya memiliki dua spesies yaitu *Coffea arabica* dan *Coffea robusta* (Saputra, 2008). Kopi dapat digolongkan sebagai minuman psikostimulan yang akan menyebabkan orang tetap terjaga, mengurangi kelelahan, dan memberikan efek fisiologis berupa peningkatan energi (Bhara, 2009).

2.2 Jenis Kopi

Kopi di Indonesia memiliki tiga jenis kopi yang dikembangkan, yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*), kopi robusta (*Coffea robusta*), dan kopi liberika (*Coffea liberica*). Namun, pada umumnya penduduk Indonesia lebih banyak menanam kopi jenis robusta, sedangkan kopi arabika hanya ditanam berkisar 10 % (Herman, 2003).

2.2.1 Kopi Robusta

Kopi robusta sudah banyak tersebar di wilayah Indonesia dan Filipina. Kopi robusta (*Coffea robusta*) adalah tanaman budidaya berbentuk pohon yang termasuk dalam famili *Rubiaceae* dan genus *Coffea* (Najiyati dan Danarti, 2006). Biji kopi robusta memiliki biji yang agak bulat, lengkungan biji lebih tebal dibandingkan kopi arabika dan garis tengah dari atas ke bawah hampir rata (Pangabean, 2012). Kopi robusta memiliki biji agak bulat, lengkungan biji lebih tebal dibandingkan kopi arabika dan garis tengah dari atas ke bawah hampir rata

(Pangabean, 2012). Pertumbuhan kopi robusta hampir sama dengan kopi arabika yaitu tergantung kondisi tanah, cuaca, pengolahan. Kopi dikemas berbeda untuk setiap negara dan menghasilkan rasa yang kurang lebih juga berbeda. Dalam 1 cangkir kopi robusta dengan 10 gr bubuk kopi mengandung 100 mg kafein (Lelyana, 2008).

2.2.2. Taksonomi kopi robusta

Dalam taksonomi tumbuhan, kopi robusta (*Coffea Robusta*) diklasifikasikan sebagai berikut (Plantamour, 2013):

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Super Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliophyta</i>
Sub Kelas	: <i>Asteridae</i>
Ordo	: <i>Rubiales</i>
Famili	: <i>Rubiaceae</i>
Genus	: <i>Coffea</i>
Spesies	: <i>Coffea Robusta Lindl, Ex De Will.</i>

2.2.3 Jenis Kopi Berdasar Pengolahan

Dalam pengolahannya, kopi dikemas berbeda beda. Jenis-jenis kopi berdasarkan pengolahannya terdiri dari:

a. Kopi Bubuk

Pengolahan kopi bubuk hanya ada tiga tahapan yaitu: penyangraian (*roasting*), penggilingan (*grinding*) dan pengemasan. Penyangraian sangat menentukan warna dan cita rasa produk kopi yang akan dikonsumsi sedangkan penggilingan yaitu menghaluskan partikel kopi sehingga dihasilkan kopi *coarse* (bubuk kasar), *medium* (bubuk sedang), *fine* (bubuk halus), *very fine* (bubuk amat halus). Pilihan kasar halusnya bubuk kopi berkaitan dengan cara menyeduh kopi yang digemari oleh masyarakat (Ridwansyah, 2003). Kopi bubuk yang langsung diseduh dengan air panas akan meninggalkan ampas di dasar cangkir (Dollemore dan Mark, 2001).

b. Kopi Instan

Kopi instan dibuat dari ekstrak kopi dari proses penyangraian. Kopi sangrai yang masih melalui tahapan: ekstraksi, *drying* (pengeringan) dan pengemasan. Kopi yang telah digiling, diekstrak dengan menggunakan tekanan tertentu dan alat pengekstrak. Ekstraksi bertujuan untuk memisahkan kopi dari ampas nya. Proses pengeringan bertujuan untuk menambah daya larut kopi terhadap air, sehingga kopi instan tidak meninggalkan endapan saat diseduh dengan air (Ridwansyah, 2003).

2.2.4 Kandungan Senyawa Dalam Kopi Robusta

Komposisi kimia dari biji kopi bergantung pada spesies dan varietas dari kopi tersebut serta faktor lain yang berpengaruh antara lain lingkungan tempat tumbuh, tingkat kematangan dan kondisi penyimpanan. Proses pengolahan juga akan mempengaruhi komposisi kimia dari kopi. Penyangraian akan mengubah komponen yang labil yang terdapat pada kopi sehingga membentuk komponen yang kompleks (Panggabean, 2011). Kopi robusta memiliki bahan aktif berupa kafein, fenol, flavonoid, alkaloid, saponin, asam klorogenik, trigonelin

(Ciptaningsih, 2012). Komposisi kimia dari biji dan bubuk kopi robusta dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 2.1 Komposisi Kimia Kopi Robusta Dekafeinasi (%)

NO.	Nama Sampel	Proses dekafeinasi sisa (%)
1	Trigonelline	29
2	Kafein	39
3	Asam Klorogenat	18
4	Asam Kafeat	83

(Sumber: Hasil Dekafeinasi Lab. Kimia Analisis Instrumentasi Polinema Malang)

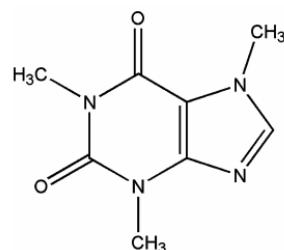
a. Trigonellin

Trigonellin, demetilasi untuk asam nikotinat, terdapat 1-3 mg asam nikotinik / 240 ml dalam seduhan kopi (Higdon *et al.*, 2006; Stadler *et al.*, 2002). Senyawa kimia dari trigonellin dapat berubah menjadi N-methylpyridinium selama proses pemanggangan, sehingga menyebabkan meningkatkannya TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity) (Votavova *et al.*, 2009). TEAC merupakan metode pengujian untuk mengukur jumlah radikal yang dapat ditangkal oleh antioksidan yang dikenal dengan kapasitas antioksidan (Lien *et al.* 1999).

Hasil dekafeinasi pada tabel 2.1 menunjukkan pengurangan kadar trigonellin yang cukup besar hal ini disebabkan karena semakin tinggi suhu yang digunakan dalam proses dekafeinasi, maka laju penurunan kadar trigonelin akan semakin cepat dan kadar trigonelin yang terlarut semakin besar karena panas saat proses dekafeinasi menyebabkan ikatan trigonelin pada kopi akan mudah terlarut oleh etil asetat. Semakin tinggi suhu yang digunakan, maka kemampuan untuk melepaskan ikatan dan pelarutan trigonelin akan semakin besar (Mulato, 2001).

A. Kafein

Kafein (*1,3,7-trimethylxanthine*) adalah alkaloid purin yang terbentuk secara alami dalam biji kopi (James, 2004). Bentuk murni kafein dijumpai sebagai kristal berbentuk tepung putih atau berbentuk seperti benang sutera yang panjang dan kusut. Kristal kafein mengikat satu molekul air (Janzen dan Oestrich, 2010). Kafein pada kopi memiliki efek fisiologis meliputi diuresis, stimulasi sistem saraf pusat, stimulasi sekresi asam lambung, dan asam lemak bebas (Belibi *et al.*, 2002). Kafein dilaporkan dapat menginduksi kematian sel terprogram serta menganggu regulator pertumbuhan p53 (Bode dan Dong, 2007).



Gambar 2.1. Rumus bangun Kafein (Sumber: Bragagnolo dan Rodrigues, 2013).

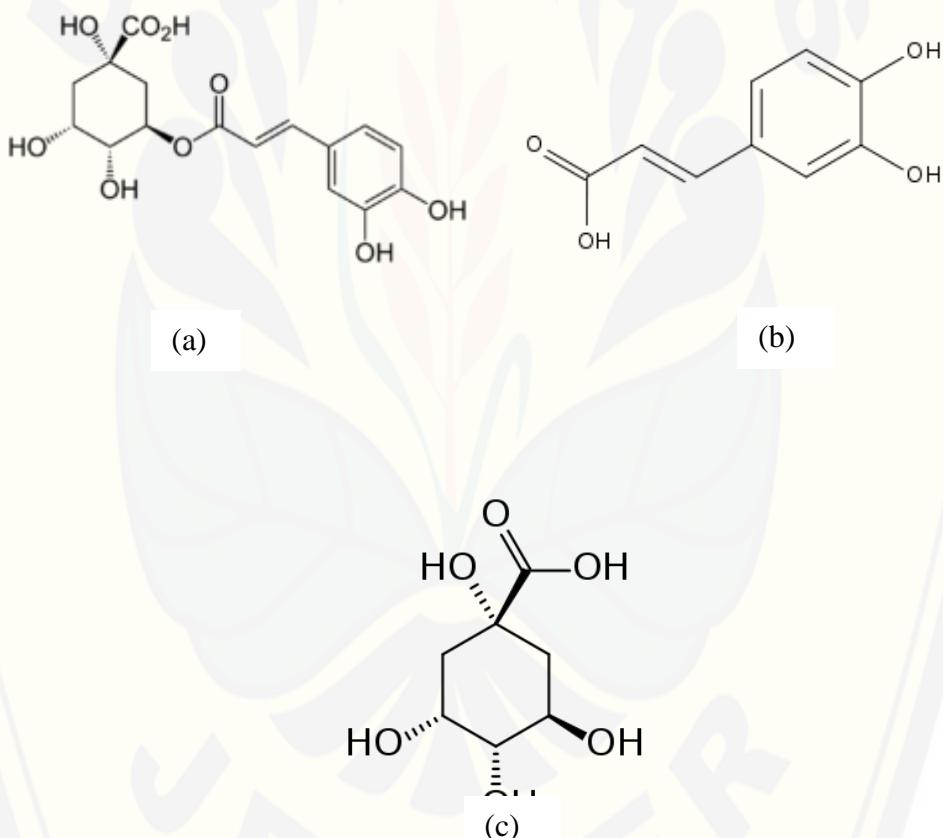
b. Asam Klorogenat

Asam klorogenat (*1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid*) adalah keluarga dari ester yang terbentuk antara asam quinat dan asam trans-sinamat, yang merupakan komponen penting dari fenol makanan (Clifford, 1999). Asam klorogenat adalah senyawa golongan fenilpropanoid dan terdapat pada biji kopi dalam konsentrasi yang tinggi (Mahendradatta, 2007). Asam klorogenat paling umum adalah asam *5-O-caffeoylequinic* (Gambar 2.2).

Asam klorogenat yang terdapat dalam satu cangkir kopi mengandung sebesar 15—325 mg tergantung varietas, komposisi, pengolahan dan penyajian (Pergizi Pangan 2009). Asam klorogenat yang terdapat dalam minuman kopi akan dicerna melalui proses pencernaan. Studi yang dilakukan menunjukkan bahwa asam klorogenat, pada saat proses pencernaan dapat mengurangi penyerapan karbohidrat dalam saluran pencernaan, sehingga menurunkan kadar gula dalam darah dan hal tersebut baik bagi penderita diabetes dan jantung

(Mahendradatta, 2007). Studi penelitian menunjukkan sekitar 33% asam klorogenat diserap oleh proses pencernaan (Olthof *et al.*, 2001). Selain itu, asam klorogenat mampu melawan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dengan cara mempertahankan struktur normal sel dan fungsinya (Winarsi, 2007).

Asam klorogenat merupakan antioksidan yang diperlukan untuk mempertahankan keadaan sel radikal yang stabil dengan menyumbangkan atom hidrogen untuk mengurangi radikal bebas dan menghambat reaksi dari asam p-kumarat. Asam kafeat membentuk ester dengan gugus alkohol dalam asam lainnya yang terbentuk pada lintasan asam siklimat, yaitu asam quinat, dan menghasilkan asam klorogenat (Salisbury dan Ross, 1995).



Gambar 2.2 (a) Rumus bangun asam klorogenat (b) Rumus bangun asam kafeat (c) Rumus bangun asam quinat (Sumber: Mahendradatta, 2007; (Salisbury dan Ross, 1995)).

Proses dekaffeinasi biji kopi dengan pelarut etil asetat pada suhu tinggi menyebabkan mudah terlepasnya asam klorogenat. Perlakuan panas selama proses dekaffeinasi mengakibatkan asam klorogenat mengalami hidrolisis menjadi senyawa dengan berat molekul yang lebih rendah, kemudian diikuti dengan dekomposisi asam klorogenat menjadi senyawa organik lain dan mempunyai sifat mudah terlarut dalam pelarut. Hal tersebut menyebabkan kadar asam klorogenat dalam biji kopi turun secara bertahap selama berlangsungnya proses dekaffeinasi dengan pola penurunan mirip yang terjadi dengan penurunan kadar kafein (Mulato *et al.*, 2001).

c. Asam Kafeat

Asam Kafeat (3,4-dihydroxycinnamic acid) merupakan senyawa fenolik yang banyak ditemukan pada kopi robusta dekaffeinasi pada hasil dekaffeinasi yang dilakukan di Politeknik Negeri Malang. Asam kafeat diketahui bermanfaat antioksidan kuat saat terdapat radikal bebas (Gulcin, 2006). Selain itu, banyak penelitian yang menunjukkan bahwa asam kafeat memiliki efek anti-inflamasi, anti-mutagenik, antibakteri dan sifat anti-karsinogenik. Asam kafeat yang masuk kedalam tubuh akan diserap sampai 95%. Asam Kafeat mampu mengurangi radikal lipoperoksil (ROO^{\bullet})- dengan menyumbangkan atom hydrogen yang menghambat reaksi rantai peroksidasi lipid (Mattos, 2015). Radikal bebas jika dibiarkan akan menimbulkan kerusakan DNA, mutagenesis, karsinogenesis dan inhibisi (Zhu *et al.*, 2002).

2.3 Kopi Robusta Dekaffeinasi

The International Standards Organisation (ISO 3509-1989) mendefinisikan bahwa kopi dekaffeinasi merupakan kopi yang dilakukan proses dekaffeinasi sehingga kadar kafein rendah. Kadar bebas kafein yang sesuai standar yaitu berkisar 97% – 99,9% (Ramalakshmi & Raghavan, 2000).

Beberapa metode yang digunakan dalam proses dekaffeinasi adalah metode langsung dan metode tidak langsung dengan masing-masing metode menggunakan larutan air atau kimia. Beberapa ahli juga menyebutkan metode air

(steam) dan metode kimia (Ramalakshmi & Raghavan, 2000). Metode dekafeinasi dapat dilakukan dengan beberapa metode, diantaranya yaitu :

a. *Swiss Water Process* (dengan air).

Proses ini menggunakan pelarut berupa air panas sehingga mudah dilakukan. pada proses ini diperoleh biji kopi bebas kafein 97% namun kekurangan dekafeinasi dengan menggunakan pelarut air panas adalah kehilangan flavor kopi pada kopi yang dihasilkan (Ramalakshmi & Raghavan, 2000).

b. *Chemical Solvent Process* (dengan pelarut kimia).

Pelarut etil asetat karena pelarutan etil asetat lebih mudah dalam pengendalian prosesnya, laju pelarutan kafeinnya lebih cepat dibandingkan dengan pelarut air, mutu produk akhir yang dihasilkan juga sesuai dengan persyaratan kopi terdekafeinasi dan dapat diterima konsumen (Ramalakshmi & Raghavan, 2000).

c. *Supercritical Carbon dioxide Process* (dengan karbondioksida superkritis).

Karbondioksida superkritis ialah senyawa karbondioksida yang berada diantara fase gas dan fase cair karbondioksida sehingga karbondioksida ini mampu untuk melarutkan atau membawa bahan lain (kafein). Karbondioksida supekritis digunakan karena sifatnya sebagai pelarut yang tidak dapat teroksidasi, sifatnya yang tidak berbahaya. Proses ini yang paling banyak digunakan untuk proses dekafeinasi kopi (Ramalakshmi & Raghavan, 2000).

d. *Sunflower oil Solvent Process* (dengan minyak bunga matahari).

Metode dekafeinasi menggunakan minyak bunga matahari sebagai pelarutnya. Minyak bunga matahari digunakan dalam proses ini karena sifatnya yang non-toksik, lebih murah, dan ramah lingkungan mengingat bahwa penggunaan pelarut kimia yang dapat meninggalkan residu pada produk sehingga berpengaruh terhadap kesehatan. (Ramalakshmi & Raghavan, 2000).

Proses dekafeinasi menimbulkan efek terhadap kandungan bahan dalam kopi. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, nilai total fenol pada kopi bubuk mengalami penurunan, semakin lama waktu pengukusan dan semakin tinggi konsentrasi etil asetat semakin turun pula nilai total fenol dari kopi bubuk. Hal ini disebabkan karena terjadinya pelunakan jaringan terhadap biji kopi pada proses pengukusan dan larutnya senyawa fenol dalam etil asetat saat proses ekstraksi. Selain itu, nilai kadar kafein semakin menurun seiring dengan semakin lamanya waktu pengukusan dan semakin tingginya konsentrasi etil asetat (Wijaya dan Yuwono, 2015).

Pengurangan kadar kafein memiliki kelemahan yaitu kemampuan air melarutkan kafein sangat terbatas pada suhu rendah. Pengurangan kadar kafein dengan suhu air yang tinggi menyebabkan pelarutan senyawa-senyawa pembentuk cita rasa dan aroma di dalam biji kopi, sehingga karakteristik mutu aroma dan cita rasanya lebih rendah dari sebelumnya (Mulato *et al.*, 2001).

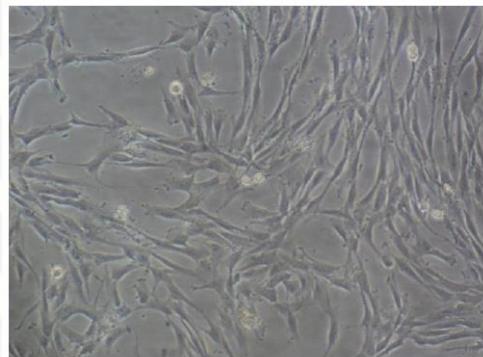
2.4 Fibroblas

Fibroblas adalah komponen seluler primer dari jaringan ikat dan sumber sintesis utama dari matrik protein misalnya kolagen. Fibroblas adalah sel yang paling banyak terdapat di jaringan ikat. Fibroblas berfungsi menyintesis kolagen, elastin, glikosaminoglikan, proteoglikan dan glikoprotein multi-adhesif. Fibroblas memiliki dua tahap aktivitas yaitu: aktif dan tenang. Sel dengan aktivitas sintesis tinggi secara morfologis berbeda dari fibroblas tenang, yang tersebar dalam matriks yang telah disintesis sel tersebut (Junqueira, 2007). Fibroblas mudah untuk dikultur karena memiliki kemampuan tumbuh dan regenerasi yang cepat. Fibroblas terlibat secara aktif dalam pembentukan serat terutama serat kolagen dan matriks ekstraseluler lainnya (Freshney, 2005). Fibroblas pada gingiva manusia paling banyak ditemukan pada jaringan periodontal (Wang *et al.*, 2002).

2.4.1 Struktur Fibroblas

Fibroblas biasanya tersebar sepanjang berkas serat kolagen dan tampak dalam sediaan sebagai sel fusiform dengan ujung-ujung meruncing. Fibroblas

ditemukan dalam bentuk stelata gepeng dengan beberapa cabang langsing, inti panjang terlihat jelas, namun garis bentuk selnya mungkin sukar dilihat pada sediaan histologis karena bila relatif tidak aktif, sitoplasmanya eosinofilik seperti serat kolagen disebelahnya. Fibroblas telah dikaji secara luas dalam biakan jaringan, tempat sel ini dapat diamati dalam isolasi anyaman serat secara *in vivo*. Fibroblas bermigrasi keluar dari eksplan dengan cabang-cabangnya melekat pada sel didekatnya untuk membentuk suatu jaringan (Fawcet, 2002). Fibroblas merupakan sel yang menghasilkan komponen ekstrasel dari jaringan ikat yang mengalami pertumbuhan. Fibroblas yang tidak aktif disebut sebagai *fibrosit*. Fibroblas berpotensi untuk fibrogenesis dalam jaringan ikat yang tidak aktif selama perkembangannya (Fawcet, 2002).



Gambar 2.3 Gambaran sel fibroblas ginggiva manusia (Sumber: Rizky, 2016)

2.5 Siklus Sel

Siklus sel merupakan proses perkembangbiakan sel yang memperantai pertumbuhan dan perkembangan makhluk hidup. Siklus sel memiliki dua fase utama, yakni fase S (sintesis) dan fase M (mitosis). Fase S merupakan fase terjadinya replikasi DNA kromosom dalam sel, sedangkan pada fase M terjadi pemisahan 2 set DNA kromosom tersebut menjadi 2 sel (Nurse, 2000). Fase yang membatasi kedua fase utama tersebut yang dinamakan Gap. G1 (Gap-1) terdapat sebelum fase S dan setelah fase S dinamakan G2 (Gap-2). Pada fase G1, sel melakukan persiapan untuk sintesis DNA yang merupakan fase awal siklus sel. Penanda fase ini adalah adanya ekspresi dan sintesis protein sebagai persiapan

memasuki fase S. Pada fase G2, sel melakukan sintesis lebih lanjut untuk proses pembelahan pada fase M (Ruddon, 2007).

Setiap tahap dalam siklus sel dikontrol oleh regulator siklus sel. Siklus sel dikontrol oleh beberapa protein yang bertindak sebagai regulator positif dan negatif. seperti (1) *cyclin*, jenis *cyclin* utama dalam siklus sel adalah cyclin D, E, A, dan B. *Cyclin* diekspresikan secara periodik sehingga konsentrasi *cyclin* berubah-ubah pada setiap fase siklus sel. Cyclin D berbeda dengan *cyclin* yang lain karena *cyclin* D tidak diekspresikan secara periodik akan tetapi selalu disintesis ketika terdapat stimulasi dari growth factor. (2) *Cyclin-dependent kinases* (CDK), jenis CDK utama dalam siklus sel adalah CDK 4, 6, 2, dan 1. CDK 4, 6, dan 2, bertindak sebagai regulator positif yang memacu terjadinya siklus sel. (3) *Cyclin-dependent kinase inhibitor* (CKI), merupakan regulator negatif siklus sel yang dapat menghambat aktivitas CDK. *Cyclin-dependent kinase inhibitor* terdiri dari dua kelompok protein yaitu INK4 (p15, p16, p18, dan p19) dan CIP/KIP (p21, p27, p57). Keluarga INK4 membentuk kompleks yang stabil dengan CDK sehingga mencegah CDK mengikat *cyclin* D. INK4 bertugas mencegah progresi fase G1. Keluarga CIP/KIP meregulasi fase G1 dan protein p21 juga menghambat sintesis DNA dengan menonaktifkan *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) (Vermeulen et al., 2003).

Disfungsi mitokondria akan membuat peningkatan pelepasan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan akan terbentuk radikal hidroksil (OH-), radikal hidroksil dapat memicu terjadinya mutasi gen terutama pada *protooncogene* dan *tumor suppresor gene*. Apabila mutasi gen tidak dapat diperbaiki maka, siklus sel menjadi tidak terkendali dan terjadi penyakit keganasan (Cavalier, 1997).

2.6 Uji Sitotoksitas (MTT Assay)

Uji sitotoksitas adalah suatu uji bahan pada jaringan yang dilakukan untuk mengetahui apakah suatu bahan tersebut bersifat toksik (Neviyanti, 2004). Uji sitotoksitas merupakan jenis uji *in vitro* yang sering digunakan untuk mengukur sitotoksitas bahan kedokteran gigi. Uji sitotoksitas dapat dilakukan dengan menggunakan kultur sel. Uji sitotoksitas menggunakan kultur sel memiliki

keuntungan antara lain mudah dikontrol, hasil obyektif, dapat diulang, cepat, dan relatif mudah (Wataha, 2001).

Metode yang sering digunakan untuk uji sitotoksitas adalah uji kolorimetrik menggunakan MTT *assay*. Metode uji kolorimetrik dengan menggunakan MTT *assay* atau uji MTT *assay* [3-(4,5-dimet iltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide] merupakan uji kolorimetrik yang sensitif, kuantitatif dan terpercaya untuk mengukur viabilitas, proliferasi dan aktivasi sel. Uji MTT dilakukan berdasarkan kapasitas enzim suksinat dehidrogenase di dalam mitokondria. Suksinat dehidrogenase merupakan ikatan kompleks enzim yang berperan dalam siklus asam sitrat dengan mentransfer elektron saat mengkonversi suksinat menjadi fumarat pada proses metabolisme di dalam sel. Pada saat uji sitotoksitas dengan MTT-*assay*, suksinat dehidrogenase inilah yang mengubah garam kuning larut air *methylthiazol tetrazolium* (MTT) menjadi kristal formazan berwarna biru tua keunguan yang tidak larut dalam air (Duval *et al.*, 2012., Doyle dan Griffiths, 2000).

Uji MTT sangat sensitif untuk mengevaluasi viabilitas sel. Kelebihan MTT *assay* adalah dapat dibuat semiotomatis, valid, tidak memerlukan transfer sel, dan tidak menggunakan radiosotop (Carmichael *et al.*, 1987; Van *et al.*, 1991). Kelemahannya antara lain nilai absorbansi absolut tidak sama pada berbagai galur sel sehingga sebaiknya dibuat uji pendahuluan dan perbandingan dengan uji sitotoksitas lainnya (Carmichael *et al.*, 1987; Van *et al.*, 1991).

Nilai absorbansi (OD) dari kristal formazan yang telah dilarutkan dapat diukur menggunakan spektrofotometer (*Elisa reader* dan *microplate reader*) dengan panjang gelombang tertentu (Loomis TA, 1986). Penyerapan maksimal tergantung dari pelarut yang digunakan. Konsentrasi formazan yang berwarna ungu dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup karena reduksi hanya terjadi ketika enzim reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria aktif (Mosmann, 1983). Viabilitas dinyatakan dengan membandingkan nilai absorbansi kelompok perlakuan yang dipajan dengan bahan uji dengan kelompok kontrol (sampel tanpa

bahan uji). Semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup dengan menganalisis nilai IC₅₀ (CCRC, 2009).

2.7 Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan kematian kultur sel fibroblas

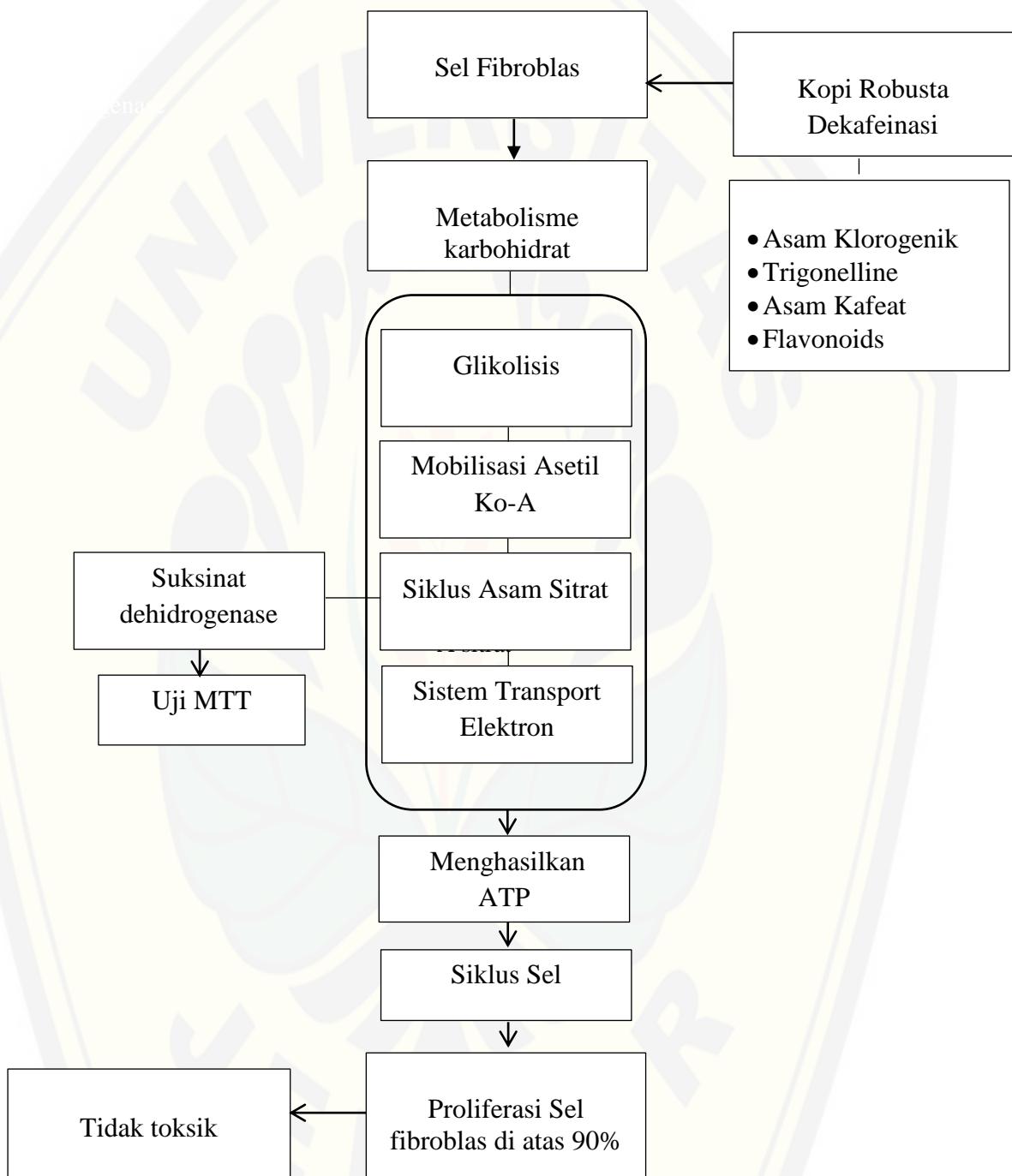
Sel fibroblas memerlukan bantuan dari tubuh agar dapat berfungsi dengan efisien. Sel fibroblas memerlukan air untuk mengangkut bahan anorganik seperti kalsium dan sodium, makanan untuk membantu pelepasan energi dan proses metabolisme. Kemampuan sel yang paling mendasar adalah berproliferasi. Proliferasi dipengaruhi oleh PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), EGF (*Epidermal Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), TGF (*Transforming Growth Factor*) merupakan *growth factor* yang diisolasi dari platelet. PDGF berfungsi dengan mengendalikan kejadian awal di tahapan G0 atau tahapan G1 dari siklus sel fibroblas sedangkan kontrol sel memasuki fase S dipengaruhi oleh hormon somatotropin yang terkandung dalam plasma sehingga PDGF dan plasma diperlukan untuk stimulasi sintesis DNA yang optimal. PDGF dan plasma dicampur dalam PPP (*Platelet Poor Plasma*) sebagai faktor pertumbuhan untuk kultur fibroblas (Scher et al., 1979; Damayanti dan Wathon, 2017).

Proliferasi sel fibroblas dapat ditingkatkan secara biologis dengan mengganti serum pertumbuhan yang biasa digunakan pada kultur sel yaitu FBS (Fetal Bovine Serum). Fungsi utama serum dalam media kultur adalah untuk memberikan faktor hormonal untuk merangsang pertumbuhan, proliferasi dan diferensiasi sel (Damayanti dan Wathon, 2017). Namun, penggunaan FBS dibatasi karena dapat menyebabkan pertumbuhan seluler dan respon fisiologis yang tidak tepat, dalam beberapa kasus efek negatif dari FBS dilaporkan dapat menghalangi pematangan sel atau menyebabkan diferensiasi sel tertunda (Valk et al, 2015).

Medium DMEM terkandung beberapa senyawa yang dapat membuat metabolisme respirasi dan jumlah mitokondria lebih banyak sehingga proliferasi sel lebih cepat tercapai. Faktor yang perlu diperhatikan agar dapat memberikan hasil yang sesuai yang diharapkan dan meminimalisir kerugian yang

terjadi antara lain: substrat, suhu, pH medium. Apabila pemberian medium tidak cocok maka akan terjadi kematian sel oleh karena autolysis, baik suhu maupun tekanan udara Selain itu, penelitian (kusyati,2010) memperlihatkan bahwa kultur sel fibroblas muda mampu membelah lebih banyak (total sekitar 50) dibandingkan dengan sel yang berasal dari usia tua.

2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.4 Efek kopi dekafinasi terhadap sel fibroblas.

2.8 Hipotesis

Kopi dekaffeinasi bersifat tidak toksik terhadap kultur sel fibroblas gingiva manusia.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan pada penelitian ini menggunakan *the post test only control group design*.

3.2 Tempat Penelitian

- 3.2.1 Pembuatan kopi robusta dekafeinasi dilakukan di Laboratorium Kimia Analisis Instrumentasi Politeknik Negeri Malang.
- 3.2.2 Kultur sel fibroblas gingiva dan uji MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada.

3.3 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2017.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah kopi robusta dekafeinasi.

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah toksisitas kultur sel fibroblast gingiva manusia.

3.4.3 Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah jenis produksi kopi yang digunakan, asal produksi kopi

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Kopi Robusta dekafeinasi

Kopi robusta dekafeinasi merupakan kopi yang telah mengalami proses dekafeinasi. Kopi robusta dekafeinasi bubuk instan produksi Pusat Penelitian Kopi dan Kakao (Puslitkoka) PTPN XII Jember. Dekafeinasi pada sampel menggunakan metode *swiss water process* di Laboratorium Kimia Analisis Instrumentasi Politeknik Negeri Malang. Dekafeinasi bertujuan agar kadar kafein dalam kopi berkurang sehingga konsumen dapat menikmati flavor dan rasa khas dari kopi tanpa efek stimulan, metode terlampir. Berdasarkan legislasi dari pasar *European Union*, pengurangan kadar kafein pada kopi sangrai adalah sebesar 0.1% dan 0.3% pada kopi instan.

3.5.2 Sel fibroblas gingiva manusia

Sel fibroblas gingiva manusia adalah sel fibroblas yang berasal dari stok kultur fibroblas gingiva manusia yang diambil dari jaringan gingiva manusia sehat yang tersedia di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada.

3.5.3 Uji sitotoksitas

Uji sitotoksitas adalah uji *in vitro* untuk mengetahui toksitas bahan kedokteran gigi dengan menggunakan kultur sel. Uji sitotoksitas dilakukan menggunakan MTT *assay* dan kemudian diukur dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 595 nm dengan gambaran yang terbentuk biru formazan pada sel fibroblas yang hidup.

3.6 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi 6 kelompok. Pengelompokan tersebut yaitu:

1. Kelompok 1 merupakan kelompok perlakuan yang berisi sel fibroblas yang dipapar kopi dekafeinasi dengan konsentrasi dengan 1,2 mg/ml,

2. Kelompok 2 merupakan kelompok perlakuan yang berisi sel fibroblas yang dipapar kopi dekafeinasi dengan konsentrasi 0,6 mg/ml,
3. Kelompok 3 merupakan kelompok perlakuan yang berisi sel fibroblas yang dipapar kopi dekafeinasi dengan konsentrasi 0,3 mg/ml,
4. Kelompok 4 merupakan kelompok perlakuan yang berisi sel fibroblas yang dipapar kopi dekafeinasi dengan konsentrasi 0,15 mg/ml,
5. Kelompok 5 merupakan kelompok perlakuan yang berisi sel fibroblas yang dipapar kopi dekafeinasi dengan konsentrasi 0,075 mg/ml,
6. Kelompok 6 merupakan kelompok perlakuan yang berisi sel fibroblas yang dipapar kopi dekafeinasi dengan konsentrasi 0,0375 mg/ml,

Terdapat 2 kelompok tambahan sebagai perbandingan dan standarisasi uji MTT Assay yaitu: kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol sel yang berisi media kultur dan sel fibroblas, kelompok kontrol media yang berisi media kultur.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

a. Alat panen sel fibroblas

Mikropipet *syringe*, petridish, inkubator CO₂, mikroskop *inverted, conical tube*, hemasitometer

b. Alat untuk tahap MTT assay

Inkubator CO₂, 96-well plate, alumunium foil, *Elissa reader*

c. Alat untuk penghitungan jumlah sampel yang akan digunakan sampel

Pipet pasteur, Mikroskop, hemositometer, *counter*

3.7.2 Bahan Penelitian

a. Kopi robusta dekafeinasi

b. Kultur sel fibroblas

c. Bahan MTT

Tripsin, Media kultur sel fibroblas, PBS, larutan MTT, *stopper reagent*

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pengajuan *Ethical Clearance*

Pengajuan *ethical clearance* dilakukan di bagian etika dan advokasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta untuk mendapatkan perizinan pelaksanaan penelitian.

3.8.2 Pembuatan Konsentrasi kopi robusta dekafeinasi

Kopi robusta dekafeinasi dimasukkan kedalam tabung *appendorf* dengan spatula kemudian ditimbang dengan timbangan analitik dan didapatkan berat sebesar 5,4 mg.



Gambar 3.1 Kopi robusta dekafeinasi pada tabung appendorf
(sumber: dokumen pribadi).

Kopi robusta dekafeinasi setelah ditimbang selanjutnya menyiapkan 6 tabung reaksi untuk pengenceran kopi robusta dekafeinasi sesuai kelompok yaitu 1,2 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,0375 mg/ml. Kopi sebelumnya sudah ditimbang sebanyak 5,4 mg/ml dimasukkan ke *conical tube* kemudian dilakukan pengenceran sebagai berikut :

1. Kelompok 1 (kopi robusta dekafeinasi dengan konsentrasi 1,2 mg/ml) dimasukkan kopi robusta dekafeinasi sebanyak 222,2 μ l dan ditambahkan 777,8 μ l MK (berdasarkan rumus $VI \cdot MI = V2 \cdot M2$)
2. Kelompok 2 (kopi robusta dekafeinasi dengan konsentrasi 0,6 mg/ml) dimasukkan kopi robusta dekafeinasi sebanyak 500 μ l yang diambil dari kelompok 1 (konsentrasi 0,6 mg/ml)

3. Kelompok 3 dan seterusnya berlaku sama, hingga kelompok paling kecil yaitu 0,0375 mg/ml.

3.8.3 Kultur Sel Fibroblas

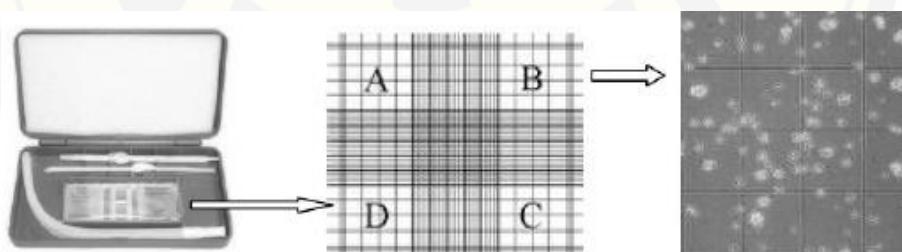
Kultur sel fibroblas gingiva manusia diambil dari stok kultur sel yang sudah ada di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada.

3.8.4 Panen Sel Fibroblas

Panen sel fibroblas dilakukan setelah sel 80% konfluen. Sel fibroblas diambil dari Inkubator CO₂ setelah itu media dibuang dengan menggunakan mikropipet pada *dish*. Sel dicuci dengan PBS steril 500 µl. Kemudian tambahkan tripsin 0,25% sebanyak 100 µl secara merata untuk melepaskan sel yang melekat di dasar *petridish*. Diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5%, pada suhu 37°C selama 3 menit. Media kultur dimasukkan sebanyak 2 ml untuk menginaktifkan tripsin. Sel diresuspensi dengan pipet sampai semua sel terlepas satu-satu (tidak menggerombol). Sel ditransfer kedalam *conical tube* baru. DMEM ditambahkan sebanyak ± 2-3 ml. Sel diresuspensi kembali. Panenan sel diambil 10 µl dan dipipetkan ke *hemacytometer*. Sel dihitung di bawah mikroskop *inverted* dengan *counter*.

3.8.5 Penghitungan dan pembuatan konsentrasi sel fibroblas yang akan digunakan untuk sampel

Hemositometer merupakan alat yang digunakan untuk menghitung jumlah sel yang terdiri dari 4 kamar hitung. Setiap kamar hitung terdiri dari 16 kotak. Penghitungan sel fibroblas dilakukan pada 4 kamar hemositometer.



Gambar 3.2 Cara perhitungan sel dengan hemositometer

Sel fibroblas yang gelap (mati) dan sel yang berada dibatas luar di sebelah atas dan di sebelah kanan tidak ikut dihitung. Sel di batas kiri dan batas bawah ikut dihitung. Rumus perhitungan jumlah sel/ml (CCRC, 2009),

$$\text{Jumlah sel terhitung /mL} = \frac{\sum \text{sel kamar A} + \sum \text{sel kamar B} + \sum \text{sel kamar C} + \sum \text{sel kamar D}}{4} \times 10^4$$

Perhitungan sel yang didapatkan sebanyak 15×10^4 . Sejumlah sel ditrasfer sebanyak yang diperlukan ke dalam *conical tube* dan media lengkap ditambahkan sesuai dengan konsentrasi sel yang dikehendaki.

3.8.6 Uji Sitotoksitas (MTT Assay)

1. Sel fibroblas dibuat suspensi sel yang mengandung 2×10^3 sel/180 μl medium kultur. Sebanyak 180 μl suspensi yang berisi sel fibroblas dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran 96-well plate kemudian diinkubasi selama 24 jam di inkubator CO_2 pada suhu 37°C agar sel fibroblas dapat beradaptasi dan menempel di sumuran.
2. Media kultur dibuang dan sel dicuci dengan 100 μl PBS. Ke dalam setiap sumuran ditambahkan 100 μl media kultur
3. Tambahkan kopi robusta dekafeinasi dengan konsentrasi yang sudah ditentukan
4. diinkubasi selama 24 jam di inkubator CO_2 pada suhu 37°C.
5. Media kultur dibuang di akhir inkubasi.
6. Setiap sumuran ditambahkan 100 μl larutan MTT. Kemudian, sel diinkubasi kembali selama 4 jam dalam inkubator CO_2 pada suhu 37°C.
7. Reaksi MTT dihentikan dengan *stopper reagent* 100 μl . Bungkus *plate* dengan alumunium foil dan diinkubasi di tempat gelap (suhu ruangan) semalam.
8. Absorbansi kemudian dibaca dengan menggunakan *ELISA reader* pada λ 595 nm. Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam *optical density*

(absorbansi). Pembuatan grafik absorbansi dan Hitung prosentase sel hidup dalam rumus prosentase viabilitas sel.

3.8.7 Pengamatan hasil

Absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari kontrol sel atau sama dengan kontrol sel. Jika absorbansi kontrol pelarut sama dengan kontrol sel maka hitung prosentase sel hidup dengan rumus berikut :

$$\text{Prosentase sel hidup} = \frac{(A_{\text{perlakuan}} - A_{\text{Kontrol Media}})}{(A_{\text{kontrol sel}} - A_{\text{kontrol media}})} \times 100\%$$

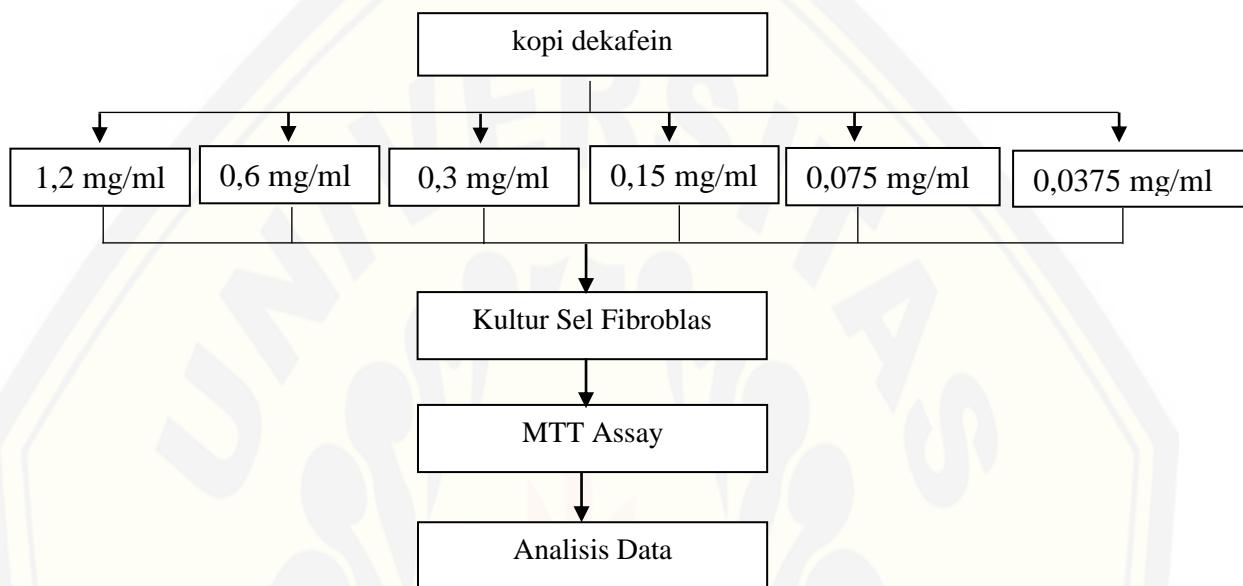
Keterangan:

% viabilitas sel	= persentase jumlah kehidupan sel setelah di uji.
Absorbansi tes	= Nilai Optical Density (OD) formazan setiap sampel setelah tes.
Absorbansi Media	= Nilai OD formazan pada rata-rata setiap kontrol media.
Absorbansi Sel	= Nilai OD formazan pada rata-rata kontrol sel (CCRC, 2017).

3.9 Analisis data

Penelitian ini menghasilkan data yang akan diuji menggunakan uji normalitas *Kolmogorof Smirnov* ($p>0,05$) dan homogenitas *Levene Test*. Kemudian dilakukan uji statistik parametrik dengan *One way ANOVA* ($P<0,05$).

3.10 Alur penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kopi robusta dekaffeinasi tidak toksik terhadap kultur sel fibroblas gingiva manusia, hasil penelitian menunjukkan adanya viabilitas sel lebih dari 90% pada berbagai konsentrasi. Konsentrasi optimal kopi robusta dekaffeinasi adalah 0,0375 mg/ml. Kopi robusta dekaffeinasi dengan konsentrasi 0,0375 mg/ml tidak menyebabkan sel proliferasi secara berlebihan pada fibroblas gingiva manusia.

5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui pengaruh pemaparan asam kafeat kopi robusta dekaffeinasi sebagai kandidat obat kumur pada kultur sel fibroblas gingiva manusia.

DAFTAR PUSTAKA

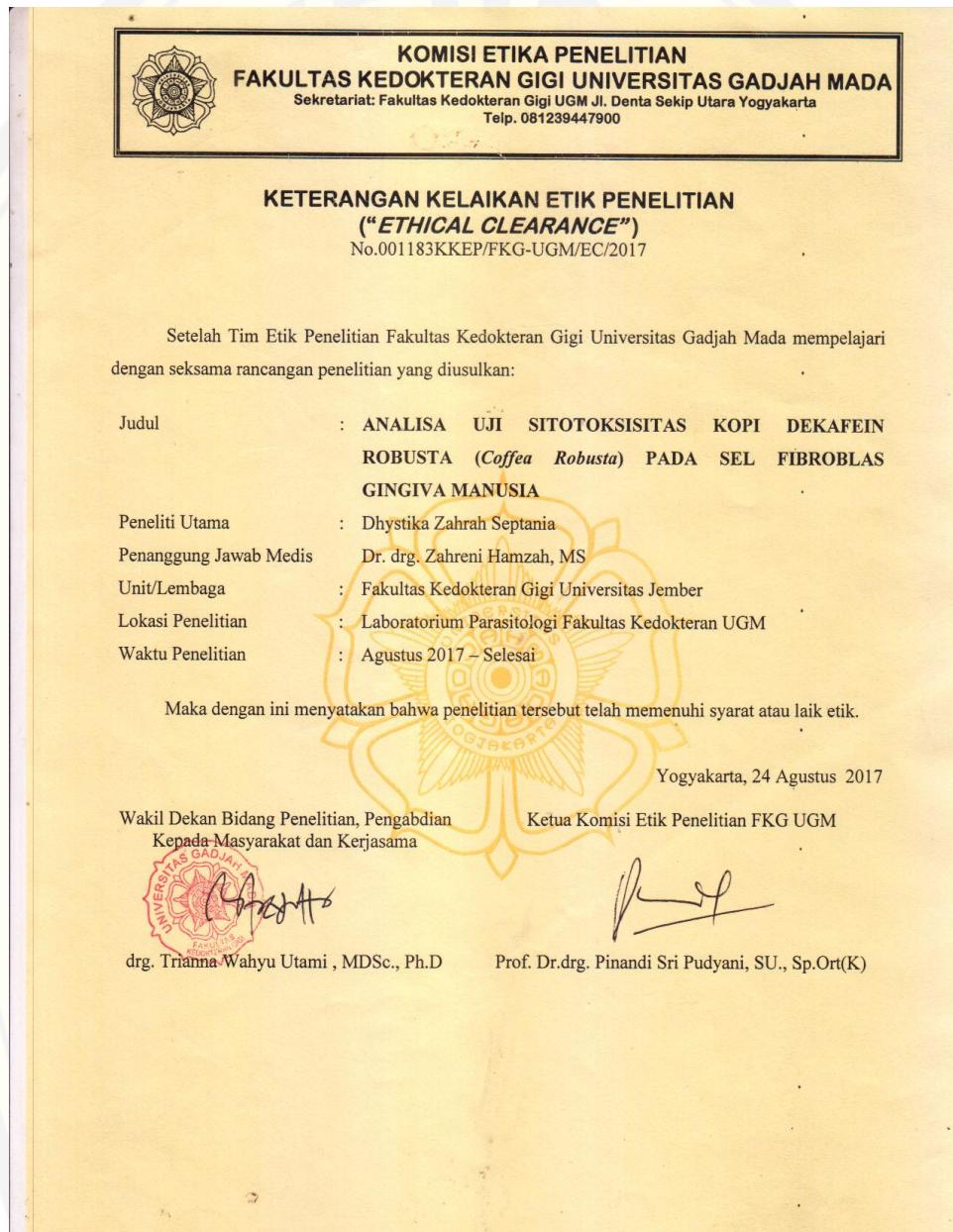
- Ayelign, A., K. Sabally. 2013. Determination of Chlorogenic Acids (CGA) in Coffee Beans Using HPLC. American Journal of Research Communication. Vol 1 (2), halaman 78-91.
- Bandele OJ, Osheroff N. 2008. Epigallocatechin gallate, a major constituent of green tea, poisons human type II topoisomerases. Chem Res Toxicol.
- Bawazeer N, A., Alsobahi N, A., 2007. Prevalence and Side Effects of Energy Drink Consumption among Medical Students at Umm Al-Qura University, Saudi Arabia. *International Journal of Medical Students*; 1(3): 104-108.
- Beecher,G.R. 2003. Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutr.* 133: 3248S–3254S
- Belibi,F.A., Wallace,D.P., Yamaguchi, T., Christensen, M., Reif, G., Grantham,J.J. 2002. The effect of caffeine on renal epithelial cells from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Neprhrol.* 13; 2723-2729.
- Bode A.M., Dong Z., 2007. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer, *Cancer Lett*, 247, 26-39.
- Bhara L.A.M., 2009. Semarang : Pengaruh Pemberian Kopi Dosis Bertingkat Per Oral 30 Hari terhadap Gambaran Histology Hepar Tikus Wistar. Skripsi. Universitas Diponegoro, Fakultas Kedokteran. 15-17.
- Bragagnolo,N., Rodrigues,N.P., 2013. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC-DAD-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*. 32;105-115.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gasdar AF, dkk. 1987. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Esei Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Res.*, **47**: 936-42.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T (1999). Robbins Pathologic Basis of Disease. WB Saunders: Philadelphia.
- CCRC, 2008, Prosedur Tetap Uji Sitotoksik Metode MTT. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- CCRC, 2009., *Protokol In Vitro, Cancer Chemoprevention Research Center*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

- Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(4):446-50.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N., 2003. Hiearchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51;2900-2911.
- Craig, R.G. and Powers J.M., 2002. *Restorative Dental Materials*, 11th Ed, Mosby Inc, St Louis Missouri.
- Depkes. 2006. Melawan Dampak Negatif Kafein. *Dalam Intisari*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. www.depkes.go.id.
- Emilda Yulie, Els Budiparman. Satiti Kuntari. 2014. Uji toksisitas ekstrak bawang putih Allium Sativum terhadap kultur sel fibroblast. *Dental Journal*. Vol 7 : 215-217.
- Fawcett, D.W., 2002, *Buku Ajar Histologi (A Textbook of Histology)*, edisi 12, EGC, Jakarta, 107-109.
- Freshney, R.I., 2000. *Cultural of Animal Cell : A manual of basic techniquis*, 4th Ed, Wiley-Liss Inc, New York, 330-337.
- Freshney, R.I., 2005. *Cultural of Animal Cell : A manual of basic techniquis*, 5th Ed. Willeyand Son, Inc, 330-337.
- Handayani H, S,H, Feronika, Yunianta. 2016. Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode Ultrasonic Bath (Kajian Rasio Bahan : Pelarut dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, Vol 4 (1) : 262-272.
- Herman. 2003. *Membangkitkan Kembali Peran Komoditas Kopi Bagi Perekonominian Indonesia*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Available http://www.ipard.com/art_perkebun di akses 15 Januari 2017.
- James, J.E., 2004. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken more seriously, *Psychomatic Medicine*, 66: 63-71.
- Jansen., Oestrich, S., 2010. *Chemistry of Coffee* CAFEÀ GmbH, Hamburg, Jerman: Elsevier Ltd. <http://www2.illy.com/wps/wcm/connect/us/illy> pada tanggal 15 Januari 2017
- Li Y, Chen LJ, Jiang F, Yang Y, Wang XX, Zhang Z, et al. Caffeic acid improves cell viability and protects against DNA damage: involvement of reactive oxygen species and extracellular signalregulated kinase. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(6):502-8.

- Johnston K.L, Clifford M.N, Morgan L.M. 2003. Coffee Acutely Modifies Gastrointestinal Hormon Secretion and Glucose Tolerance in Human: Glycemic Effect of Chlorogenic Acid and Caffeine. *Am J Clin Nutr*; 79 (4): 728-33.
- Ko, SD., Narayanan, AS., Page, RC. 1981. Infuence of cell cycle on collagen synthesis by human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*, 16:302-308
- Lelyana, R. 2008. Pengaruh Kopi Terhadap Kadar Asam Urat darah. Skripsi. Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik[Thesis]. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Lessa FCR, Aranha AMF, Nogueira I, Giro EMA, Hebling J and Costa CAS. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci* 2010; 18(1): 51.
- Lestari, dkk .2009. Konsumsi Kopi Masyarakat Perkotaan dan Faktor-Faktor yang Berpengaruh: Kasus di Kabupaten Jember. *Pelita Perkebunan*. Vol 25 (3) : 216-235.
- Loomis TA, 1986. Obat Tradisional dan Fisioterapi : Uji Toksikologi. Yogjakarta : Fakultas Farmasi UGM, 233-238.
- MacCorkle TA, Tan TH. 2005. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. *Cell Biochem Biophys*, 43(3):451-61.
- Mahendradatta, M. 2007. Pangan Aman dan Sehat. Lembaga Penerbitan Universitas Hasanudin: Makasar.
- Mosmann T, 1983. Rapid Colorimetric Esei For Cellular Growth And Survival : Application To Proliferation And Cytotoxic Eseis. *J.Immunol Meth.*, 65: 55-63.
- Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Alfthan G, Virtanen JK, Rissanen TH, Happonen P, Nyysönen K, Kaikkonen J, Salonen R, Salonen JT. 2005. The effects of coffee consumption on lipid peroxidation and plasma total homocysteine.
- Moskot M, Jakobkiewicz-Banecka J, Kloska A, Smolinska E, Mozolewski P, Malinowska M, Rychlowski M, Banecki B, Wegrzyn G, Gabig-Ciminska M. 2015. Modulation of expression of genes involved in glycosaminoglycan metabolism and lysosome biogenesis by flavonoids. *Sci Rep.* 2015;5:9378.
- Najiyati, S dan Danarti. 2006. *Kopi Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Penebar Swadaya, Jakarta.

- Nardini,M., Cirillo, E., Natella, F., Sacini, C. 2002. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999. Jakarta: EGC Press.
- Nurse, P., 2000. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, 100:71–78.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C.H. & Katan, M.B. 2001. Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans. *Journal of Nutrition*. 131: 66–71.
- Padmi A, 2008. "Uji sitotoksik ekstrak etanol 70% buah kemukus (*Piper cubeba* L.) terhadap sel Hela". Skripsi. Surakarta : Universitas Muhamadiyah Surakarta, 8 – 26.
- Panggabean, Edy. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: AgroMedia Pustaka.
- Ponte, Stefano. 2002. The ‘Latte Revolution’? Regulation, Markets and Consumption in the Global Coffee Chain. *World Development*. vol. 30, issue 7, 1099-1122
- Rahardjo, Pudji. 2012. *Kopi Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.Sarieff. 1986. *Ilmu Tanah Pertanian*. Bandung: Pustaka Buana.
- Ramalakshmi, K, Raghavan B. 2000. *Caffeine in coffee: It's Removal. Why and How? Critical*. Review in Food Science and Nutrition 39; 441-56
- Ridwansyah, 2003. Medan : Pengolahan Kopi. Skripsi. Universitas Sumatera Utara, Fakultas Pertanian. 14-16.
- Salisbury, F. B. dan C. W. Ross. 1995. Fisiologi Tumbuhan. Jilid I. Edisi IV. ITB, Bandung.
- Sudiana, I.K. 2011. Patobiologi Molekuler Kanker. Salemba Medika. Jilid 1. Edisi 2.
- Scalbert,A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimerez, L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention diseases. Critical review in Food Science adn nutrition. 45:4. 287-306.
- Tai, J., Cheung, S., Chan, E., Hasman, D., 2010. Antiproliferation Effect of Commercially Brewed Coffees on Human Ovarioan Cancer Cells In Vitro. *Nutrition and Cancer*, 62(8), 1044-1057.
- Van Noort R. Introduction to dental material.2nd ed. London: CV Mosby Company; 2003.p. 3–5.
- Van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ. dkk. 1991. Cell Mediated Cytotoxicity Against U937 Cell by Human Monocytes and Macrophages in a Modified Colorimetric MTT Esei. *J Immunol Meth.*, 141: 15-22.

- Votavová, L, Voldrich, M, Sevcik, R, Cizkova, H, Mlejnecka, J, Stolar, M, Fleisman, T. 2009. Changes of Antioxidant Capacity of Robusta Coffee During Roasting. *Czech J. Food Sci.* 27:S49-S52.
- Wataha, J.C., 2001. Principles of Biocompatibility for Dental Practitioners. *J Prosthet Dent.*, 86(2): 203-209.
- Winarsi, H. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan. Kanisius. Yogyakarta.
- Werdiningsih,S., Widjiastuti, I., Febriastuti. 2015, Uji biokompabilitas tanin ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana Linn.*) 0,78% dan *Chlorhexidine glucunate* 0,2% terhadap kultur sel fibroblas BHK-1. *Conservative dentistry journal* Vo. 5(1). Surabaya.
- Yusmarini. 2011. Senyawa Polifenol pada Kopi: Pengaruh Pengolahan, Metabolisme dan Hubungan dengan Kesehatan. Mini Review. SAGU. 10 (2). P.22-30.

LAMPIRAN**A. Surat Keterangan *Ethical Clearance***

B. Surat Izin Penelitian

 <p>KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS JEMBER FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI Jl. Kalimantan No. 37 Jember (0331) 333536, Fak. 331991</p>																																													
Nomor : 2714 /UN25.8/TL/2017 Perihal : Ijin Penelitian	28 JUL 2017																																												
<p>Kepada Yth Kepala Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Di Yogyakarta</p>																																													
<p>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 :</p>																																													
<table border="0"> <tbody> <tr> <td style="width: 15%;">1</td> <td>Nama</td> <td>:</td> <td>Dhystika Zahrah Septania</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>NIM</td> <td>:</td> <td>131610101048</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>Semester/Tahun</td> <td>:</td> <td>2016/2017</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Fakultas</td> <td>:</td> <td>Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>Alamat</td> <td>:</td> <td>Jl. Mastrip II No. 36 Jember</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>Judul Penelitian</td> <td>:</td> <td>Analisa Uji Sitotoksitas Kopi Dekafein Robusta (Coffea Robusta) Pada Sel Fibroblas Gingiva Manusia</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>Lokasi Penelitian</td> <td>:</td> <td>Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>Data/alat yang dipinjam</td> <td>:</td> <td>Elisa Reader, Inkubator, Mikroskop</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>Waktu</td> <td>:</td> <td>Agustus 2017 s/d Oktober 2017</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>Tujuan Penelitian</td> <td>:</td> <td>Untuk Mengetahui Sitotoksitas Kopi Dekafein Robusta Pada Kultur Sel Fibroblas Gingiva Manusia</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>Dosen Pembimbing</td> <td>:</td> <td>1. Dr. drg. Zahreni Hamzah, MS 2. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes</td> </tr> </tbody> </table>		1	Nama	:	Dhystika Zahrah Septania	2	NIM	:	131610101048	3	Semester/Tahun	:	2016/2017	4	Fakultas	:	Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember	5	Alamat	:	Jl. Mastrip II No. 36 Jember	6	Judul Penelitian	:	Analisa Uji Sitotoksitas Kopi Dekafein Robusta (Coffea Robusta) Pada Sel Fibroblas Gingiva Manusia	7	Lokasi Penelitian	:	Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta	8	Data/alat yang dipinjam	:	Elisa Reader, Inkubator, Mikroskop	9	Waktu	:	Agustus 2017 s/d Oktober 2017	10	Tujuan Penelitian	:	Untuk Mengetahui Sitotoksitas Kopi Dekafein Robusta Pada Kultur Sel Fibroblas Gingiva Manusia	11	Dosen Pembimbing	:	1. Dr. drg. Zahreni Hamzah, MS 2. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes
1	Nama	:	Dhystika Zahrah Septania																																										
2	NIM	:	131610101048																																										
3	Semester/Tahun	:	2016/2017																																										
4	Fakultas	:	Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember																																										
5	Alamat	:	Jl. Mastrip II No. 36 Jember																																										
6	Judul Penelitian	:	Analisa Uji Sitotoksitas Kopi Dekafein Robusta (Coffea Robusta) Pada Sel Fibroblas Gingiva Manusia																																										
7	Lokasi Penelitian	:	Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta																																										
8	Data/alat yang dipinjam	:	Elisa Reader, Inkubator, Mikroskop																																										
9	Waktu	:	Agustus 2017 s/d Oktober 2017																																										
10	Tujuan Penelitian	:	Untuk Mengetahui Sitotoksitas Kopi Dekafein Robusta Pada Kultur Sel Fibroblas Gingiva Manusia																																										
11	Dosen Pembimbing	:	1. Dr. drg. Zahreni Hamzah, MS 2. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes																																										
<p>Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih</p>																																													
 <p>an. Dekan Wakil Dekan I, <u>Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes</u> NIP.196109031986022001</p>																																													

C. Penghitungan Pengenceran

Rumus persamaan yang digunakan untuk pengenceran kopi robusta dekafeinasi:

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1 \text{ ml} \times 1,2 \text{ mg/ml} &= V_2 \times 5,4 \text{ mg/ml} \\ V_2 &= 222,2 \mu\text{l} + 777,8 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Sehingga untuk mendapatkan konsentrasi kopi 1,2 mg/ml dibutuhkan 222,2 μl kopi robusta dekafeinasidan ditambah 777,8 μl media kultur DMEM.

Keterangan :

V1 : Volume yang diinginkan (1ml)

V2 : Konsentrasi yang diinginkan (1,2 mg/ml)

V2 : Volume yang diinginkan untuk mendapatkan kopi robusta dekafeinasidengan konsentrasi 1,2 mg.ml

N2 : Konsentrasi Kopi robusta dekafeinasiyang tersedia 5,4 mg/ml

D. Hasil absorbansi Elissa Reader

Konsentrasi	absorbansi			Viabilitas(%)			Rerata viabilitas (%)
	UL.1	UL. 2	UL.3	VS.1	VS.2	VS.3	
1,2	0,197	0,213	0,225	117.045	135.227	148.864	133,712
0,6	0,196	0,217	0,197	115.909	139.773	117.045	124,242
0,3	0,196	0,217	0,208	115.909	139.773	129.545	128,409
0,15	0,181	0,195	0,212	98.864	114.773	134.091	115,909
0,075	0,187	0,204	0,193	105.682	125.000	112.500	114,394
0,0375	0,198	0,187	0,184	118.182	105.682	102.273	108,712

E. Analisis Data

E.1 Hasil uji normalitas menggunakan Uji *Kolmogorov-Smirnov*

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		viabilitas	konsentrasi
N		18	18
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	119.56267	.393750
	Std. Deviation	13.347982	.4178299
	Absolute	.187	.255
Most Extreme Differences	Positive	.187	.255
	Negative	-.100	-.197
Kolmogorov-Smirnov Z		.792	1.084
Asymp. Sig. (2-tailed)		.558	.191

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Dari data di atas dapat diketahui bahwa data terdistribusi normal, dengan nilai signifikansi sebesar 0,558 yang artinya nilai $p>0,05$.

E.2 Hasil uji homogenitas menggunakan *levene Test*

Test of Homogeneity of Variances

viabilitas			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.389	5	12	.847

Dari data di atas dapat diketahui bahwa data homogen, dengan nilai signifikansi sebesar 0,847 yang artinya nilai $p>0,05$.

E.3 Hasil uji Parametrik One Way Anova

ANOVA

Viabilitas

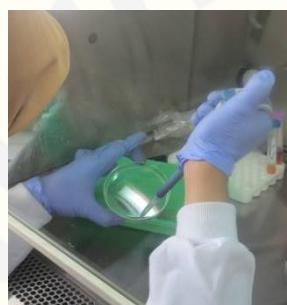
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1176.584	5	235.317	1.524	.254
Within Groups	1852.283	12	154.357		
Total	3028.867	17			

Dari data di atas dapat diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada seluruh kelompok dalam penelitian, dengan nilai sebesar 0,254 yang artinya nilai $p < 0,05$.

F. Prosedur Penelitian



Panen sel 80% konfluen



Sel fibroblas dibuang dengan
mikropipet pada *dish*



Menambahkan tripsin 100 μ l pada sel
fibroblas



Diinkubasi pada incubator 37°C
selama 5 menit



Menambahkan media kultur 2 ml
untuk menginaktifkan tripsin



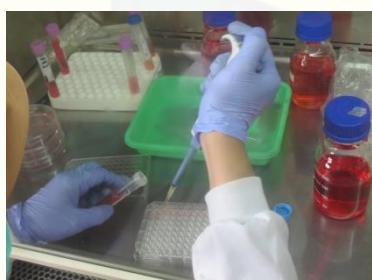
Sel di transfer ke dalam *conical tube* dan menambahkan DMEM 2ml dan diresuspensi kembali



Panenan sel diambil 10 μl dan dipipetkan ke *hemacytometer*



Sel dihitung dibawah mikroskop *inverted*



Sel fibroblas 2×10^3 sel/180 μl MK dan kopi dekafein yang sudah ditentukan konsentrasi dimasukkan kedalam 96-well plate dan diinkubasi selama 24 jam di inkubator CO₂ pada suhu 37°C



Media kultur dibuang diakhir inkubasi



Setiap sumuran ditambahkan 100 μl larutan MTT dan diikubasi kembali selama 4 jam



Reaksi MTT dihentikan dengan *stopper reagent* 100 μl bungkus dengan almunium foil pada suhu ruangan semalam

G. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan Bahan	
	
Kopi robusta dekafeinasi	Timbangan analitik
	
Media Kultur	inkubator CO ₂ 5%, suhu 37°C
	
Tripsin	Petridish
	
Mikroskop	<i>Blue tip dan yellow tip</i>



*Neubauer Improved
(hemasitometer)*



Elissa Reader



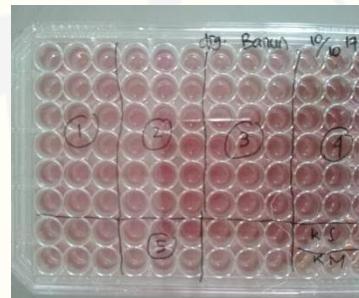
Conical tube



tabung appendorf



Laminar flow



96-well plate



Mikropipet