



**POTENSI SEDUHAN KOPI ROBUSTA DENGAN DAN TANPA
GULA TERHADAP VIABILITAS SEL MONOSIT YANG
DIPAPAR *Bacillus cereus***

SKRIPSI

Oleh

**Catur Nindita Agil Nuari
NIM 142210101029**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2018



**POTENSI SEDUHAN KOPI ROBUSTA DENGAN DAN TANPA
GULA TERHADAP VIABILITAS SEL MONOSIT YANG
DIPAPAR *Bacillus cereus***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu
syarat untuk menyelesaikan program Sarjana Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

Catur Nindita Agil Nuari
NIM 142210101029

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER

2018

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Kedua orang tua tercinta, Bapak Sumanto dan Ibu Misdinah, dan Kakak-kakakku tersayang;
2. Keluarga besar Eyang Simpen tersayang;
3. Para guru sejak Taman Kanak-kanak sampai Sekolah Menengah Atas dan para dosen di Perguruan Tinggi;
4. Almamater tercinta, Fakultas Farmasi Universitas Jember

MOTO

Barangsiapa yang bersungguh-sungguh, sesungguhnya kesungguhan tersebut
untuk kebaikan dirinya sendiri.

(Terjemahan Surah Al-Ankabut ayat 6)¹⁾

Dan cukuplah Rabb-mu menjadi pemberi petunjuk dan penolong.

(Terjemahan Surah Al-furqan ayat 31)¹⁾

Allah has perfect timing, not early, not late. It takes a little patience and a whole
lot of faith. But it worth to wait.

(Anonymous)

¹ Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. *Syaamil Al-Quran Terjemah Per-Kata*. Bandung: CV Haekal Media Centre.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Catur Nindita Agil Nuari

NIM : 142210101029

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Potensi Seduhan Kopi Robusta Dengan dan Tanpa Gula Terhadap Viabilitas Sel Monosit yang dipapar *Bacillus cereus*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, 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, 20 Juli 2018

Yang menyatakan,

Catur Nindita A.N.

NIM 142210101029

SKRIPSI

**POTENSI SEDUHAN KOPI ROBUSTA DENGAN DAN TANPA GULA
TERHADAP VIABILITAS SEL MONOSIT YANG DIPAPAR**

Bacillus cereus

Oleh

Catur Nindita Agil Nuari
NIM 142210101029

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Tantin Ermawati, M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi Seduhan Kopi Robusta Dengan dan Tanpa Gula Terhadap Viabilitas Sel Monosit yang Dipapar *Bacillus cereus*” karya Catur Nindita Agil Nuari telah diuji dan disahkan pada:

hari,tanggal : Jumat, 20 Juli 2018

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

Indah Purnama S., S.Si., M.Farm., Apt.
NIP 198304282008122004

drg. Tantin Ermawati, M.Kes.
NIP 198003222008122003

Tim Penguji:

Penguji I,

Penguji II,

Diana Holiday, S.F., M.Farm., Apt.
NIP 197812212005012002

Fransiska Maria C., S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP 198404062009122008

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt.
NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Potensi Seduhan Kopi Robusta Dengan dan Tanpa Gula Terhadap Viabilitas Sel Monosit yang Dipapar *Bacillus cereus*; Catur Nindita Agil Nuari; 142210101029; 2018; 57 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Sistem kekebalan tubuh (sistem imun) merupakan suatu sistem koordinasi respon biologis yang bertujuan untuk melindungi tubuh serta mencegah invasi organisme patogen, seperti virus, jamur, dan bakteri. Salah satu bakteri patogen yang dapat menyebabkan infeksi adalah *Bacillus cereus* yang terkadang dapat ditemui pada makanan. Ketika terjadi invasi patogen seperti *B.cereus*, maka sistem imun akan bekerja dengan melakukan fagositosis. Fagositosis merupakan proses pencernaan seluler (menelan) patogen atau benda asing oleh sel fagosit salah satunya adalah monosit. Monosit merupakan salah satu jenis leukosit yang inti selnya berbentuk lonjong mirip ginjal tanpa bolus yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh. Ketika terjadi infeksi, monosit akan mempertahankan dirinya agar tetap bisa melanjutkan hidup. Kemampuan suatu sel untuk mempertahankan diri dari serangan patogen untuk tetap bisa bertahan hidup dan menjalankan fungsinya disebut viabilitas sel. Berdasarkan penelitian sebelumnya terdapat beberapa tanaman yang secara in vitro dapat meningkatkan viabilitas sel, salah satunya adalah kopi.

Kebiasaan minum kopi di Indonesia sudah dari zaman nenek moyang, bahkan sekarang kebiasaan tersebut menjadi favorit di kalangan anak muda hingga dewasa sebagai pendamping "nongkrong" di kafe. Selera setiap individu dalam mengkonsumsi kopi pun berbeda-beda. Seringkali kopi diseduh dengan tambahan gula namun tidak sedikit orang yang suka mengkonsumsi kopi murni atau yang dikenal juga dengan sebutan kopi hitam (tanpa gula). Berdasarkan beberapa penelitian disebutkan bahwa mengkonsumsi kopi memiliki beberapa manfaat, salah satunya adalah sebagai antioksidan yang diperoleh dari kandungan senyawa pada kopi yaitu polifenol. Salah satu kandungan polifenol yang terdapat dalam biji kopi robusta adalah asam klorogenat. Antioksidan merupakan zat yang dapat melindungi tubuh dari radikal bebas yang dapat merusak membran sel. Semakin besar perlindungan membran sel yang diberikan maka integritas membran sel semakin kuat. Ketika integritas membran sel semakin kuat maka kekuatan sel untuk mempertahankan diri akan semakin besar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi seduhan kopi robusta dengan dan tanpa gula terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus*.

Tahapan penelitian dilakukan dengan melakukan sterilisasi, preparasi sampel, isolasi monosit, penempelan sel, inkubasi dengan sampel, pemaparan bakteri, uji viabilitas, dan analisis data. Sampel penelitian pada penelitian ini dibagi menjadi empat kelompok yaitu kelompok I (monosit + media 199), kelompok II (monosit + *B. cereus*), kelompok III (monosit + kopi + *B. cereus*), dan kelompok IV (monosit + kopi + gula + *B. cereus*). Uji viabilitas dilakukan

dengan melakukan melakukan pewarnaan menggunakan *trypan blue* kemudian diamati dibawah mikroskop *inverted*. Sel yang hidup akan tampak jernih (tidak menyerap pewarnaan *trypan blue* sedangkan sel yang mati dapat menyerap pewarnaan *trypan blue* sehingga tampak berwarna biru. Kemudian dilakukan analisis data dengan melakukan uji normalitas (*Saphiro Wilk*) dan uji homogenitas (*Lavene test*). Data yang diperoleh normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *one way anova*. Apabila terdapat perbedaan antar kelompok maka dilanjutkan dengan uji LSD.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa urutan kelompok dengan jumlah sel monosit yang hidup (*viable*) dari tinggi ke rendah yaitu kelompok I (monosit + media 199) sebesar $92,56\% \pm 1,25\%$, kemudian kelompok IV (monosit + kopi + gula + *B. cereus*) sebesar $66,65\% \pm 1,52\%$, kemudian kelompok III (monosit + kopi + *B. cereus*) sebesar $56\% \pm 5,93\%$, dan yang paling rendah adalah kelompok II (monosit + *B. cereus*) sebagai kontrol negatif sebesar $8,60\% \pm 0,24\%$. Berdasarkan hasil uji viabilitas tersebut dapat diketahui bahwa seduhan kopi robusta dengan dan tanpa gula dapat meningkatkan viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus*. Analisis statistik parametrik *one way anova* dan uji LSD menunjukkan nilai signifikansi $< 0,05$. Hal tersebut menunjukkan bahwa potensi seduhan kopi robusta dengan dan tanpa gula terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B.cereus* memiliki perbedaan yang signifikan.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi seduhan Kopi Robusta Dengan dan Tanpa Gula Terhadap Viabilitas Sel Monosit yang Dipapar *Bacillus cereus*”. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi di Fakultas Farmasi (S1) dan gelar Sarjana Farmasi.

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

1. Allah SWT, atas izin dan pertolongan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi untuk mencapai gelar sarjana;
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm, selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas persetujuannya untuk memulai skripsi ini;
3. Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Tantin Ermawati, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah bersedia meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, perhatian, dan waktunya dalam menyelesaikan skripsi ini;
4. Ibu Diana Holiday, S.F., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Fransiska Maria C., S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan saran dan kritik dalam skripsi ini;
5. Ibu Endah Puspita Sari selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama masa perkuliahan;
6. Mas Erwan, Mbak Azizah, dan Mbak Ning selaku Laboran *Bioscience* yang selalu membimbing penulis selama melakukan penelitian;
7. Ibu Misdinah yang telah memberi banyak dukungan, doa dan motivasi. Semoga ini menjadi langkah awal untuk meraih kesuksesan mendatang;
8. Mbak Titin, Mas Nova, Mbak Novi yang selalu memberikan doa, dukungan, motivasi dan hiburan selama mengerjakan skripsi;

9. Keluarga besar Eyang Simpen yang selalu memberikan dukungan dan motivasi untuk menyelesaikan skripsi ini;
10. Figuh Kuncoro Wiseso yang selalu memberikan motivasi, hiburan, dan bantuan selama mengerjakan skripsi;
11. Nadya Dini Lestari dan Yuvita Dian Damayanti yang selalu memberikan saran, semangat, dan hiburan selama mengerjakan skripsi;
12. CPD *Squads* (Tika, Luna, Mades, Inasa, Ulfa, Nina, Devi, Cah) yang selalu memberikan motivasi dan semangat dalam perjuangan mengerjakan skripsi;
13. Yulintan Maulidar yang merupakan *partner* “Duo Monosit” yang selalu memberikan motivasi, semangat, teman diskusi, berkeluh kesah, dan berjuang bersama untuk menyelesaikan skripsi ini;
14. Sarah Faradillah Safri *partner* kopi robusta yang selalu memberikan motivasi, bantuan, saran, dan hiburan selama mengerjakan skripsi;
15. Mbak Renova yang selalu memberi saran dan masukan serta tempat berkeluh kesah mengenai pembuatan skripsi;
16. Dian Faiz Alwyda, sahabat dari SMP yang selalu memberikan motivasi dalam mengerjakan skripsi;
17. Intan Fahri, Desi Exo, Anjar, Fenny, Syafira, Mia, Eva yang selalu memberikan semangat dan bantuan dalam mengerjakan skripsi ini;
18. Teman-teman Fakultas Farmasi angkatan 2014 (Pharmagen), yang selalu menemani penulias selama perkuliahan dan dalam proses mengerjakan skripsi ini;
19. Semua pihak yang secara langsung dan tidak langsung berperan membantu menyelesaikan skripsi ini;

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 20 Juli 2018

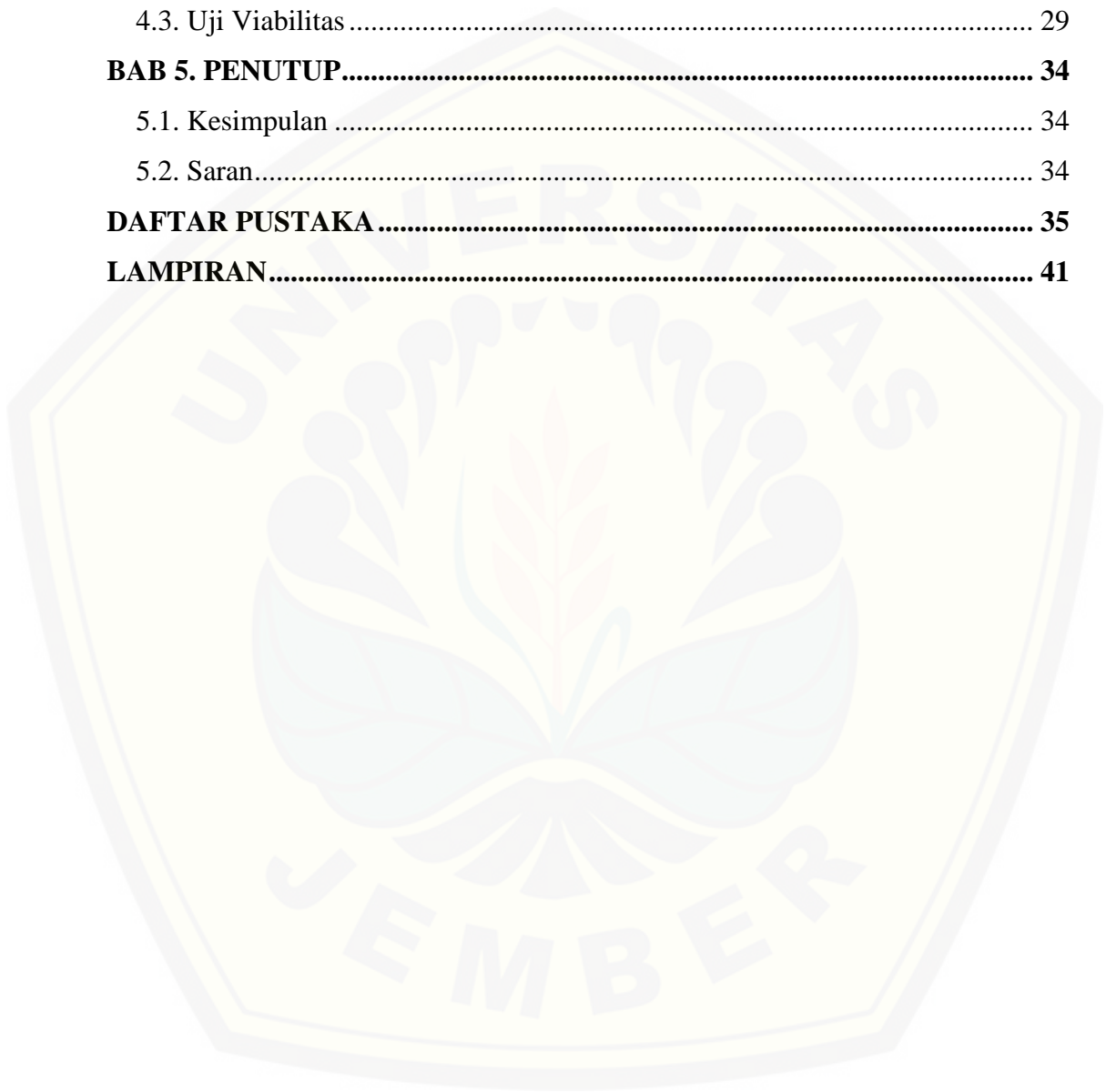
Catur Nindita A.N.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	2
DAFTAR LAMPIRAN	3
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Monosit dan Viabilitas	5
2.1.1. Deskripsi Monosit	5
2.1.2. Membran Sel	6
2.1.3. Fungsi	7
2.1.4. Viabilitas	8
2.1.5. Metode Isolasi Monosit.....	8
2.1.6. Metode Perhitungan Viabilitas Sel Monosit	10
2.2. Tinjauan Umum Kopi Robusta	10
2.2.1. Klasifikasi kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>)	11
2.2.2. Morfologi tanaman kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>)	11

2.2.3. Kandungan kimia kopi robusta	12
2.3. Tinjauan Umum Gula.....	14
2.4. <i>Bacillus cereus</i>	16
2.4.1. Taksonomi.....	16
2.4.2. Morfologi	16
2.4.3. Patogenesis.....	17
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	19
3.1. Jenis Penelitian.....	19
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.3. Variabel Penelitian	19
3.3.1. Variabel bebas	19
3.3.2. Variabel terikat.....	19
3.3.3. Variabel terkendali	19
3.4. Definisi Operasional.....	20
3.5. Sampel Penelitian.....	20
3.5.1. Kriteria Sampel	20
3.5.2. Penggolongan Sampel.....	20
3.6. Bahan dan Alat.....	21
3.6.1. Bahan	21
3.6.2. Alat.....	21
3.7. Prosedur Penelitian.....	21
3.7.1. Sterilisasi Alat	21
3.7.2. Pembuatan Seduhan Kopi Robusta dan Kopi Robusta + Gula	21
3.7.3. Pengambilan Sampel Darah	22
3.7.4. Pembuatan RPMI dan Media 199	22
3.7.5. Prosedur Isolasi Sel Monosit.....	23
3.7.6. Inkubasi Monosit dengan Seduhan Kopi dan Kopi + Gula	24
3.7.7. Pemaparan <i>Bacillus cereus</i>	24
3.7.8. Prosedur Uji Viabilitas Sel Monosit	24
3.7.9. Perhitungan Viabilitas Monosit.....	25
3.8. Analisis Data	25

3.9. Skema Kerja Penelitian	26
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1. Preparasi Bahan Uji.....	27
4.2. Isolasi Sel Monosit.....	27
4.3. Uji Viabilitas	29
BAB 5. PENUTUP.....	34
5.1. Kesimpulan	34
5.2. Saran.....	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN.....	41



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Komposisi kimia biji kopi arabika dan kopi robusta	13
Tabel 4.1 Hasil perhitungan viabilitas sel monosit yang dipapar <i>B.cereus</i> dan diinkubasi dengan seduhan kopi robusta dengan dan tanpa gula.....	33



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Sel Monosit	6
Gambar 2.2 Komponen Penyusun Membran Sel.....	6
Gambar 2.3 Komponen Penyusun Fosfolipid	7
Gambar 2.4 (A) Sel Hidup (B) Sel mati setelah pewarnaan <i>trypan blue</i>	8
Gambar 2.5 Hasil pemisahan pada isolasi monosit.....	9
Gambar 2.6 Morfologi buah kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>)	12
Gambar 2.7 Morfologi (a) biji kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>) dan (b) bubuk kopi robusta (<i>Coffea canephora</i>)	12
Gambar 2.8 Struktur Kimia Fenol.....	13
Gambar 2.9 Struktur kimia asam klorogenat	14
Gambar 2.10 Spora <i>Bacillus cereus</i> (mikroskopis).....	17
Gambar 2.11 <i>Bacillus cereus</i>	17
Gambar 4.1. Preparat apus monosit dengan perbesaran 1000x	30
Gambar 4.2. Hasil uji viabilitas sel monosit	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Perhitungan Sampel.....	41
Lampiran 2.1. Hasil Perhitungan Kelompok I.....	42
Lampiran 2.2. Hasil Perhitungan Kelompok II.....	42
Lampiran 2.3. Hasil Perhitungan Kelompok III.....	43
Lampiran 2.4. Hasil Perhitungan Kelompok IV.....	43
Lampiran 3.1. Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro Wilik</i>	44
Lampiran 3.2. Hasil Uji Homogenitas <i>Lavene Test</i>	47
Lampiran 3.3. Hasil Uji <i>one way anova</i>	47
Lampiran 3.4. Hasil Uji LSD.....	48
Lampiran 4.1. Gambar Sebelum Proses Isolasi.....	49
Lampiran 4.2. Hasil Pemisahan Sel Monosit.....	49
Lampiran 5.1. Foto Hasil Penelitian Kelompok I.....	50
Lampiran 5.2. Foto Hasil Penelitian Kelompok II.....	50
Lampiran 5.3. Foto Hasil Penelitian Kelompok III.....	51
Lampiran 5.4. Foto Hasil Penelitian Kelompok IV.....	51

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sistem kekebalan tubuh (sistem imun) merupakan suatu sistem koordinasi respon biologis yang bertujuan untuk melindungi tubuh serta mencegah invasi organisme patogen, seperti virus, jamur, dan bakteri (Munasir, 2001). Salah satu bakteri patogen yang dapat menyebabkan infeksi adalah *Bacillus cereus* yang terkadang dapat ditemui pada makanan (Bottone, 2010). Ketika terjadi invasi patogen seperti *B.cereus*, maka sistem imun akan bekerja dengan melakukan fagositosis. Fagositosis merupakan proses pencernaan seluler (menelan) patogen atau benda asing oleh sel fagosit (Lim dkk., 2017). Sel fagosit dibedakan menjadi dua, yaitu sel mononuklear (monosit dan makrofag) dan sel polimorfonuklear (neutrofil dan eosinofil) (Baratawidjaja dkk., 2014; Lim dkk., 2017).

Monosit merupakan salah satu jenis leukosit yang inti selnya berbentuk lonjong mirip ginjal tanpa bolus yang berperan dalam sistem kekebalan tubuh. Jumlah normal monosit dalam sirkulasi darah adalah 3-8% dari seluruh leukosit. Sel ini merupakan sel terbesar dibandingkan sel leukosit lainnya karena memiliki diameter 12-15 μm . Sel monosit juga memiliki kromatin yang halus dan tersebar merata serta sitoplasma yang berwarna biru abu-abu (Bonardo dkk., 2015). Monosit bersirkulasi selama satu sampai lima hari di dalam darah kemudian bermigrasi ke jaringan tubuh (Delita, 2012; Ginhoux dan Jung, 2014). Ketika terjadi infeksi, monosit akan mempertahankan dirinya agar tetap bisa melanjutkan hidup. Kemampuan suatu sel untuk mempertahankan diri dari serangan patogen untuk tetap bisa bertahan hidup dan menjalankan fungsinya disebut viabilitas sel (Baharom dkk., 2016). Berdasarkan penelitian sebelumnya terdapat beberapa tanaman yang secara *in vitro* dapat meningkatkan viabilitas sel, salah satunya adalah kopi (Budirahardjo, 2009).

Kopi merupakan salah satu komoditas pertanian di Indonesia yang memiliki nilai ekonomi yang cukup tinggi di dunia. Indonesia menduduki urutan

keempat sebagai pengeksport kopi terbesar di dunia. Jenis kopi yang dibudidayakan di Indonesia yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*) dan kopi robusta (*Coffea canephora*) (Hutabarat, 2004; Malian, 2004). Kebiasaan minum kopi di Indonesia sudah dari zaman nenek moyang, bahkan sekarang kebiasaan tersebut menjadi favorit di kalangan anak muda hingga dewasa sebagai pendamping "nongkrong" di kafe (Paramita dan Pinasti, 2016). Selera setiap individu dalam mengkonsumsi kopi pun berbeda-beda. Seringkali kopi diseduh dengan tambahan gula namun tidak sedikit orang yang suka mengkonsumsi kopi murni atau yang dikenal juga dengan sebutan kopi hitam (tanpa gula). Berdasarkan beberapa penelitian disebutkan bahwa mengkonsumsi kopi memiliki beberapa manfaat, salah satunya adalah sebagai antioksidan yang diperoleh dari kandungan senyawa pada kopi yaitu polifenol (Vignoli dkk., 2014; Afonso dkk., 2016).

Biji kopi robusta memiliki kandungan polifenol yang tinggi. Salah satu kandungan polifenol yang terdapat dalam biji kopi robusta adalah asam klorogenat (Jeszka-Skowron dkk., 2014). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Putri (2017) telah terbukti bahwa kandungan polifenol pada seduhan kopi robusta dengan dan tanpa gula memiliki aktivitas antioksidan (Putri, 2017). Antioksidan merupakan zat yang dapat melindungi tubuh dari radikal bebas yang dapat merusak membran sel. Menurut Winarsi dalam Asti (2015) senyawa antioksidan dapat menjaga integritas membran lipid, protein sel dan asam nukleat, serta dapat menjaga keutuhan struktur membran sel (Asti, 2015). Berdasarkan *review* yang dilakukan oleh Oteiza dkk. (2005) diduga polifenol dapat memberikan pengaruh pada membran sel (Oteiza dkk., 2005).

Pada sel tubuh, polifenol (asam klorogenat) berperan penting dalam perlindungan membran sel. Membran sel tersusun atas gugus hidrofilik (polar) dan gugus hidrofobik (non polar). Menurut Hendrik dalam Collado dkk. (2016) polifenol melindungi sel dengan cara berikatan dengan gugus polar pada membran sel (Collado dkk., 2016). Semakin besar perlindungan membran sel yang diberikan maka integritas membran sel semakin kuat. Ketika integritas membran sel semakin kuat maka kekuatan sel untuk mempertahankan diri akan semakin besar (Ingólfsson dkk., 2014).

Berdasarkan penjelasan tersebut, dapat diketahui bahwa kandungan polifenol biji kopi robusta mempunyai peranan terhadap viabilitas sel monosit dalam tubuh. Oleh karena itu peneliti ingin mengetahui potensi seduhan kopi robusta dengan dan tanpa gula terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus*.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Apakah seduhan kopi robusta dengan dan tanpa gula berpotensi meningkatkan viabilitas sel monosit yang dipapar dengan *B. cereus*?
2. Bagaimana potensi seduhan kopi robusta tanpa gula terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus* dibandingkan dengan seduhan kopi robusta dengan gula?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk menjawab rumusan masalah yaitu :

1. Untuk mengetahui adanya potensi seduhan kopi robusta dengan dan tanpa gula terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus*.
2. Untuk mengetahui potensi seduhan kopi robusta tanpa gula terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus* dibandingkan dengan seduhan kopi robusta dengan gula.

1.4. Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberikan informasi mengenai potensi seduhan kopi robusta dan kopi robusta dengan gula terhadap viabilitas sel monosit.
2. Memberikan pengetahuan dan pemahaman mengenai uji viabilitas sel monosit.

3. Memberikan informasi mengenai manfaat kopi robusta terhadap kesehatan tubuh.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Monosit dan Viabilitas

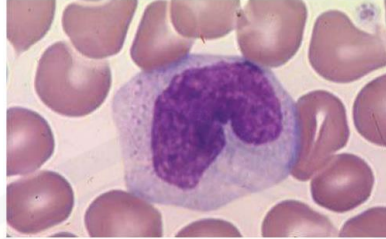
Tubuh memiliki sistem perlindungan ketika terjadi infeksi yang terdiri dari gabungan sel yang biasa disebut dengan sistem kekebalan tubuh (Baratawidjaja dkk., 2014). Sistem kekebalan tubuh (sistem imun) merupakan suatu sistem koordinasi respon biologis yang bertujuan untuk melindungi tubuh serta mencegah invasi organisme patogen (Munasir, 2001). Ketika terjadi invasi patogen maka sistem imun akan bekerja dengan melakukan fagositosis. Fagositosis merupakan proses pencernaan seluler (menelan) patogen atau benda asing oleh sel fagosit. Sel fagosit dibedakan menjadi dua, yaitu sel mononuklear (monosit dan makrofag) dan sel polimorfonuklear (neutrofil dan eosinofil) (Baratawidjaja dkk., 2014; Lim dkk., 2017).

2.1.1. Deskripsi Monosit

Monosit merupakan sel darah putih (mononuklear) yang berperan dalam imunitas nonspesifik bersama dengan sel polimorfonuklear atau granulosit (Baratawidjaja dkk., 2014). Monosit berjumlah sekitar 3-8% dari leukosit normal darah dengan diameter 9-10 μm tetapi diameter pada apusan darah kering mencapai 20 μm dan berbentuk pipih. Inti sel monosit terletak eksentris di dalam sel dan mempunyai lekukan berbentuk tapal kuda atau seperti ginjal. Sitoplasma mengandung granula dan terlihat seperti jala-jala (Kaushansky dkk., 2016).

Monosit berasal dari sumsum tulang dan berada di dalam sirkulasi darah, jaringan penyambung, dan rongga-rongga tubuh. Dalam sumsum tulang, sel progenitor monosit berdiferensiasi menjadi premonosit kemudian masuk kedalam sirkulasi dan berdiferensiasi menjadi monosit matang. Monosit berada dalam sirkulasi darah selama \pm 1-5 hari sebelum berjalan melalui membran kapiler ke dalam jaringan. Monosit bermigrasi melalui aliran darah dengan menembus

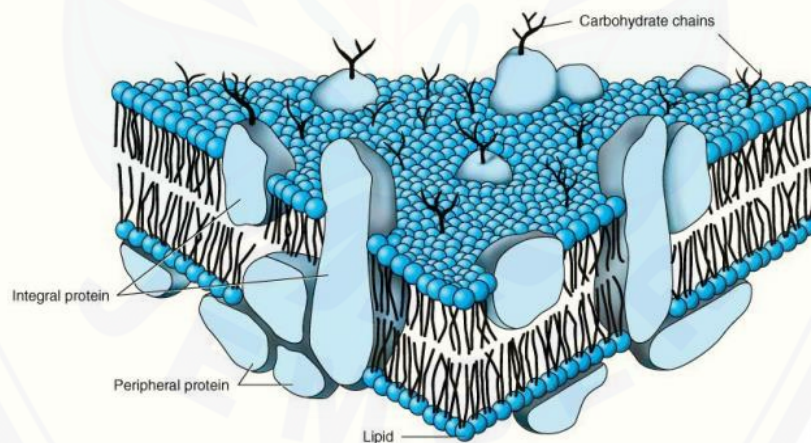
dinding kapiler dan masuk ke dalam jaringan untuk berdiferensiasi menjadi makrofag jaringan (Furth, 1992; Baratawidjaja dkk., 2014).



Gambar 2.1 Sel Monosit (Kaushansky dkk., 2016)

2.1.2. Membran Sel

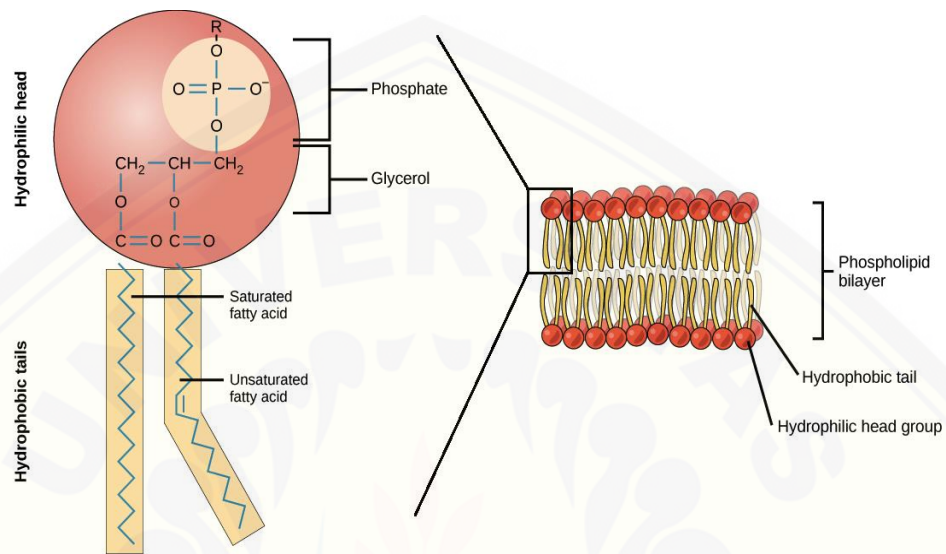
Komponen membran sel monosit sama seperti membran sel pada umumnya yaitu lemak, protein, dan karbohidrat. Dalam membran sel, komponen lemak yang jumlahnya melimpah adalah fosfolipid. Fosfolipid merupakan molekul amfipatik yang tersusun atas gugus kepala hidrofilik (polar) dan dua asam lemak hidrofobik (non polar) (Murray dkk., 2003). Komponen penyusun membran sel dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Komponen Penyusun Membran Sel (Murray dkk., 2003)

Membran sel terdiri dari dua lapisan fosfolipid yang biasa disebut dengan *lipid bilayer*. Fosfolipid mengandung asam lemak, alkohol, dan residu asam fosfat. Asam lemak biasanya terdiri dari 16-18 rantai karbon. Asam lemak terdiri atas asam lemak jenuh (*Saturated Fatty Acid*) dan asam lemak tidak jenuh (*Unsaturated Fatty Acid*). Asam lemak tidak jenuh terdiri atas asam lemak tidak jenuh tunggal (*Monounsaturated Fatty Acid*) yang memiliki satu ikatan ganda pada

atom-atom karbon penyusunnya dan asam lemak tidak jenuh ganda (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang memiliki lebih dari satu ikatan ganda pada atom-atom karbon penyusunnya (Murray dkk., 2003).



Gambar 2.3 Komponen Penyusun Fosfolipid

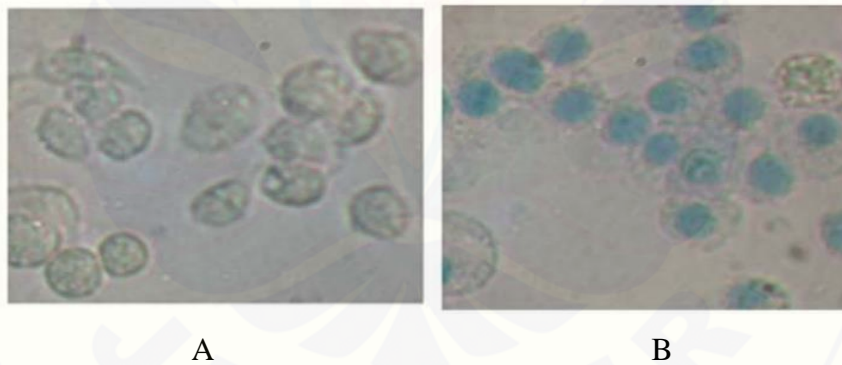
Membran sel monosit memiliki fungsi seperti membran sel pada umumnya yaitu sebagai pelindung organel di dalam sel, sebagai komunikasi antar sel dan memperantarai interaksi antar sel, sebagai pembatas yang bersifat selektif permeabel, serta sebagai *barier* keluar atau masuknya ion, molekul ataupun senyawa (Korn, 1998; Murray dkk., 2003).

2.1.3. Fungsi

Monosit berperan penting dalam melindungi tubuh terhadap serangan mikroorganisme atau patogen. Monosit merupakan imunitas nonspesifik yang melindungi tubuh dengan cara memfagosit mikroorganisme yang masuk ke sirkulasi darah. Dalam proses fagositosis, monosit membagi perannya dengan netrofil. Monosit berperan sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC), mengenal dan menyerang mikroba dan sel kanker, memproduksi sitokin, mengerahkan pertahanan sebagai respon terhadap infeksi (Baratawidjaja dkk., 2014).

2.1.4. Viabilitas

Viabilitas berasal dari kata *viable* yang berarti hidup. Menurut kamus kedokteran Dorland, viabilitas adalah kemampuan untuk bertahan hidup (Albert dkk., 2012). Viabilitas merupakan kemampuan suatu sel untuk bertahan hidup, tumbuh, dan berkembang. Viabilitas sel monosit bergantung pada integritas sel. Sel-sel yang *viable* memiliki membran sel yang utuh, sedangkan sel-sel yang mati tidak memiliki integritas membran sel sehingga mudah menyerap pewarnaan tertentu seperti *trypan blue*. *Trypan blue* merupakan pewarna diazo yang digunakan untuk mewarnai jaringan atau sel secara selektif. Mekanisme dari perwarna ini didasarkan pada perwarna negatif dan tidak berinteraksi dengan sel kecuali membran rusak (Tran dkk., 2011). Sel yang *viable* sitoplasmanya tampak jernih sedangkan sel-sel yang mati mempunyai sitoplasma yang berwarna biru karena telah menyerap warna (Arzumanyan dan Ozhovan, 2002). Perbedaan antara sel hidup dan mati setelah pewarnaan dengan *trypan blue* dapat dilihat pada Gambar 2.4.



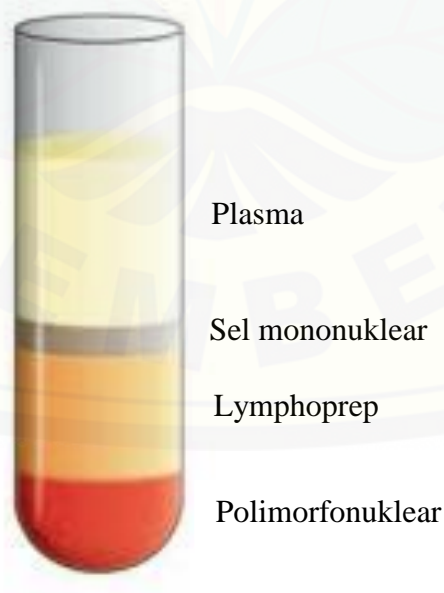
Gambar 2.4 (A) Sel Hidup (B) Sel mati setelah pewarnaan *trypan blue* (Tran dkk., 2011)

2.1.5. Metode Isolasi Monosit

Teknik isolasi monosit yang sering digunakan adalah teknik konvensional yaitu *gradient density centrifugation*. Menurut Grievink dkk., (2016) terdapat 3 teknik yang dapat digunakan untuk teknik *gradient density centrifugation* yaitu *Cell Preparation Tube (CPT)*, *Sep-Mate* dan *ficoll-pague*. Pada teknik CPT dan *Sep-Mate* sangat mudah untuk dilakukan dan waktu pengerjaan relatif lebih cepat, namun biayanya cukup mahal dan kemungkinan

terjadinya kontaminasi eritrosit cukup tinggi. Sedangkan untuk teknik *ficoll-pague* cukup sulit untuk dilakukan sehingga pengerjaannya juga membutuhkan waktu yang lama. Namun pada teknik ini memiliki biaya yang lebih murah dibandingkan CPT dan Sep-Mate dan kemungkinan terjadinya kontaminasi eritrosit relatif kecil (Grievink dkk., 2016). Sehingga pada penelitian ini digunakan teknik *gradient density centrifugation* menggunakan *ficoll-pague*. Teknik *gradient density centrifugation* merupakan metode pemisahan sel berdasarkan perbedaan ukuran partikel dan kerapatan partikel. Prinsip dari metode ini adalah bergerakanya suatu partikel yang memiliki ukuran dan kerapatan yang sama ke suatu posisi hingga membentuk suatu lapisan (Price, 1982; Loos dkk., 2015). Pada isolasi monosit akan terbentuk 4 lapisan seperti yang terlihat pada Gambar 2.5.

Dalam teknik *gradient density centrifugation* diperlukan media untuk mendapatkan isolat yang diinginkan. Media yang dapat digunakan adalah *Ficoll-pague* dan *Lymphoprep*TM. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Locca dkk. (2009) dijelaskan bahwa tipe media *gradient density* yang digunakan untuk isolasi monosit tidak mempengaruhi komposisi dan jumlah sel yang dihasilkan (Locca dkk., 2009).



Gambar 2.5 Hasil pemisahan pada isolasi monosit (Healthcare, 2007)

2.1.6. Metode Perhitungan Viabilitas Sel Monosit

Perhitungan viabilitas sel monosit dilakukan dengan metode mikroskopis menggunakan mikroskop *inverted*. Sebelum dilakukan perhitungan perlu dilakukan pewarnaan untuk mengetahui perbedaan sel yang hidup (*viable*) dan sel yang mati. Salah satu pewarnaan yang bisa digunakan adalah *trypan blue*. Viabilitas sel monosit dapat diketahui dengan menghitung persentase viabilitas sel yang diperoleh dengan membagi jumlah sel yang *viable* (hidup) dengan jumlah sel monosit seluruhnya (monosit yang menyerap dan tidak menyerap *trypan blue*) (Grievink dkk., 2016).

2.2. Tinjauan Umum Kopi Robusta

Kopi robusta (*Coffea canephora*) merupakan salah satu jenis kopi yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Kopi ini masuk ke Indonesia pada tahun 1900-an dan memiliki perkembangan yang pesat dibandingkan dengan kopi jenis lain. Hal tersebut dikarenakan kopi robusta memiliki syarat tumbuh dan pemeliharaan yang mudah serta hasil produksinya jauh lebih tinggi. Saat ini lebih dari 90% dari area pertanaman kopi di Indonesia terdiri atas kopi robusta (Prastowo dkk., 2010). Sentra produksi kopi robusta di Indonesia terpusat pada 5 provinsi yaitu Lampung, Sumatra Selatan, Sumatra Barat, Bengkulu dan Jawa Timur. Produksi kopi robusta di Jawa Timur berasal dari Kabupaten Banyuwangi, Kabupaten Bondowoso, Kabupaten Lumajang, dan Kabupaten Jember. Berdasarkan Triyanti (2016) disebutkan bahwa produksi kopi robusta di Kabupaten Jember mencapai 2.532 ton setiap tahunnya (Triyanti, 2016).

Setelah masa panen, kopi melalui beberapa tahapan proses hingga akhirnya bisa dinikmati menjadi sebuah minuman atau seduhan kopi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Chiron (2010) pengolahan buah kopi menjadi biji kopi bisa dilakukan dengan 3 cara yaitu cara kering, semi basah, dan basah (fermentasi). Cara kering merupakan cara yang sering digunakan untuk pengolahan kopi. Untuk cara kering, setelah pemanenan buah kopi selanjutnya dilakukan proses *kniser* (pemecahan kulit luar), kemudian dilakukan penjemuran.

Setelah kering dilakukan proses *huller* sehingga diperoleh kopi beras. Selanjutnya diolah untuk menjadi bubuk kopi (Choiron, 2010).

2.2.1. Klasifikasi kopi robusta (*Coffea canephora*)

Klasifikasi tanaman kopi robusta menurut *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS (Integrated Taxonomic Information System), 2011) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Gentiales
Famili	: Rubiaceae
Genus	: Coffea
Spesies	: <i>Coffea canephora</i>

2.2.2. Morfologi tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*)

Kopi termasuk kedalam kelompok tanaman semak belukar yang merupakan tanaman berkeping dua (dikotil) dan berakar tunggang. Bagian akar terdapat beberapa akar kecil yang tumbuh ke samping (akar lebar). Pada akar ini tumbuh rambut, bulu-bulu, dan tudung akar. Secara umum, daun kopi berbentuk bulat telur dengan ujung meruncing, bergelombang, terdapat garis menyamping, dan berwarna hijau agak terang. Pada setiap ketiak daun terdapat 8-24 kuntum bunga dengan kelopak bunga berwarna hijau dan mahkota bunga sebanyak 3-8 helai. Buah kopi mengalami beberapa pergantian warna berdasarkan tingkat kematangan. Untuk buah yang masih mentah berwarna hijau, hijau muda, dan kuning. Ketika buah sudah matang akan berwarna merah dan merah tua (Panggabean, 2011).

Morfologi biji kopi robusta (Gambar 2.6) tidak jauh berbeda dengan biji kopi lainnya. Adapun karakteristik fisik biji kopi robusta yaitu biji kopi berbentuk

sedikit bulat, terdapat lengkungan biji yang tebal, garis tengah parit atas ke bawah agak rata, serta untuk biji yang sudah diolah tidak terdapat kulit ari dibagian parit (lekukan) (Panggabean, 2011).



Gambar 2.6 Morfologi buah kopi robusta (*Coffea canephora*) (Panggabean, 2011)



(a)

(b)

Gambar 2.7 Morfologi (a) biji kopi robusta (*Coffea canephora*) (Panggabean, 2011) dan (b) bubuk kopi robusta (*Coffea canephora*) (Putri, 2017)

2.2.3. Kandungan kimia kopi robusta

Biji kopi robusta memiliki banyak kandungan kimia seperti lemak (minyak kopi dan diterpen), mineral, senyawa nitrogen (protein, asam amino bebas, kafein), dan polifenol (asam klorogenat). Senyawa-senyawa yang terkandung dalam biji kopi robusta memiliki manfaat tertentu seperti asam klorogenat, kafein, trigonelin dan diterpen memiliki peranan penting untuk menghasilkan aroma pada minuman kopi. Selain itu, kandungan polifenol pada biji kopi robusta juga memiliki aktivitas antioksidan yang dapat melindungi tubuh dari serangan patogen (Wang dan Ho, 2009; Phan dkk., 2014). Senyawa polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan dan jumlahnya cukup banyak adalah asam

klorogenat (Mussatto dkk., 2011). Komponen kimia pada biji kopi robusta dapat dilihat pada Tabel 2.1.

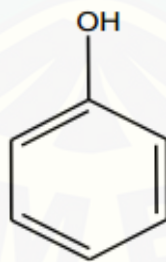
Tabel 2.1 Komposisi kimia biji kopi arabika dan kopi robusta yang sudah disangrai (% bobot kering)

Komponen	Arabika	Robusta
Kafein	1,3	2,4
Trigonelin	0,3	0,3
Karbohidrat	38	42
Asam klorogenat	2,5	3,8
Lemak	17,0	11,0
Asam-asam amino	7,5	7,5
Asam-asam organik	2,4	2,6
Melanoidin	25,4	25,9
Aroma volatil	0,1	0,1
Ash (mineral)	4,5	4,7

Sumber : (Oestreich-Janzen, 2013)

2.2.3.1. Senyawa Polifenol

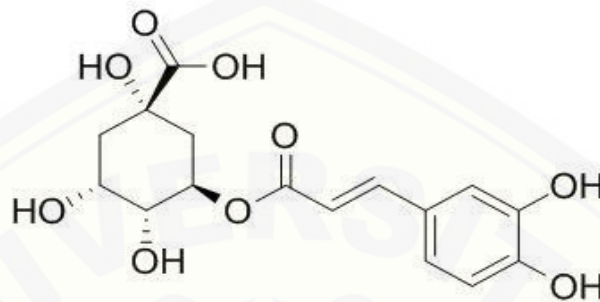
Senyawa polifenol merupakan senyawa yang memiliki lebih dari satu gugus fenol. Fenol merupakan senyawa yang memiliki gugus hidroksi yang melekat pada cincin benzena. Struktur kimia fenol dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Struktur Kimia Fenol

Senyawa polifenol dapat diperoleh dari beberapa sumber makanan yaitu sayuran, buah-buahan, dan makanan yang digunakan untuk diet sehari-hari seperti minyak sayur, minyak zaitun, anggur, teh, kopi, dan lain-lain. Senyawa polifenol memiliki aktivitas antioksidan yang dapat mencegah beberapa penyakit seperti penyakit neurodegeneratif, penyakit kardiovaskuler, kanker, serta sebagai antiinflamasi (Phan dkk., 2014). Selain itu, senyawa polifenol juga dapat

memberikan perlindungan pada membran sel yaitu dengan meningkatkan *rigiditas* membran sel (Oteiza dkk., 2005). Kandungan polifenol pada biji kopi robusta adalah asam klorogenat (Mussatto dkk., 2011). Struktur kimia asam klorogenat dapat dilihat pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9 Struktur kimia asam klorogenat (Kang dkk., 2004)

2.3. Tinjauan Umum Gula

Di masyarakat, gula termasuk salah satu kebutuhan pokok. Gula merupakan pemanis yang digunakan untuk keperluan rumah tangga maupun industri pangan. Selain itu, gula juga dapat digunakan sebagai bahan pengawet di bidang industri. Gula merupakan suatu karbohidrat sederhana yang larut dalam air. Menurut Siregar, N.S., (2014) gula dibedakan menjadi dua yaitu :

a. Monosakarida

Monosakarida merupakan karbohidrat sederhana yang terdiri dari satu molekul gula. Yang termasuk kedalam monosakarida yaitu glukosa, fruktosa, dan galaktosa.

b. Disakarida

Disakarida merupakan karbohidrat sederhana yang terdiri dari dua molekul gula. Yang termasuk kedalam disakarida yaitu sukrosa (gabungan glukosa dan fruktosa), laktosa (gabungan glukosa dan galaktosa), dan maltosa (gabungan dari dua glukosa).

Menurut Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (2015), gula dibedakan menjadi 4 yaitu :

a. Gula pasir (gula kristal putih)

Merupakan gula sukrosa kristal yang diproduksi dari bahan baku tebu atau bit. Proses pembuatan gula pasir terdiri dari beberapa tahapan yaitu penggilingan, klarifikasi, penguapan, kristalisasi, fugalisasi, pengeringan, dan pengemasan.

b. Gula putih lunak

Gula putih lunak (*soft white sugar*) merupakan kristal halus gula berwarna putih dan telah mengalami proses pemurnian.

c. Gula merah lunak

Gula merah lunak (*soft brown sugar*) merupakan kristal halus gula berwarna coklat terang hingga coklat gelap yang telah mengalami proses pemurnian serta terdapat kandungan sukrosa di dalamnya.

d. Gula aren

Gula aren merupakan suatu produk dari pengolahan air nira pohon aren (*Arenga pinnata* Merr). Kadar sakarosa dalam gula aren tidak lebih dari 77%.

Sejauh ini banyak dikembangkan berbagai macam pemanis. Namun masyarakat cenderung lebih memilih menggunakan gula pasir (Dachliani, 2006). Pada penelitian ini digunakan gula pasir yang merupakan gula yang diperoleh dari bahan baku tebu atau bit dan termasuk ke dalam kelompok sukrosa. Ketika terhidrolisis sukrosa akan terpecah menjadi satu unit glukosa dan fruktosa (Siregar, 2014).

2.4. *Bacillus cereus*

2.4.1. Taksonomi

Klasifikasi *Bacillus cereus* menurut *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS (Integrated Taxonomic Information System), 2010) adalah sebagai berikut :

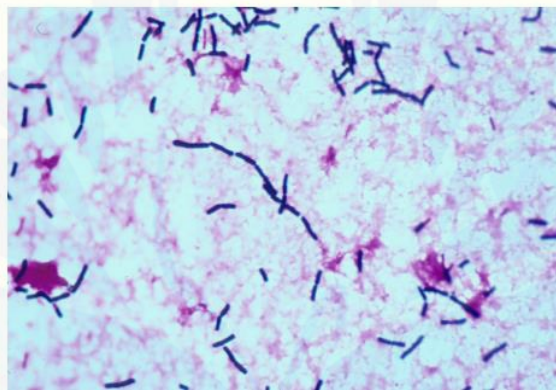
Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Posibacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Bacillaceae
Genus	: Bacillus
Spesies	: <i>Bacillus cereus</i>

2.4.2. Morfologi

Bacillus cereus merupakan bakteri gram positif bersel tunggal dengan endospora berbentuk oval atau silinder dan terletak ditengah (mesofil), fakultatif aerob, *casein*, dan *starch hydrolyzed*. Umumnya *B.cereus* ini mempunyai lebar sekitar 1,0-1,2 μm dan panjang sekitar 3-4 μm . Bakteri ini bersifat kosmopolit dan dapat tumbuh pada rentang pH 5,5-8,5. Suhu pertumbuhan maksimum *B.cereus* adalah 37-48 °C dan suhu pertumbuhan minimum 5-20 °C, sedangkan suhu pertumbuhan optimumnya adalah 30 °C (Brooks dkk., 2013).



Gambar 2.10 Spora *Bacillus cereus* (mikroskopis) (Brooks dkk., 2013)



Gambar 2.11 *Bacillus cereus* (Bottone, 2010)

2.4.3. Patogenesis

Bacillus cereus merupakan saprofit tanah yang dapat berkembang biak pada saluran pencernaan bagian bawah. Bakteri ini merupakan patogen oportunistik yang menyebabkan infeksi lokal dan sistemik serta keracunan makanan jenis emetik ataupun diare. Hal tersebut terjadi karena *B.cereus* memproduksi enterotoksin. Enterotoksin yang tertelan hingga saluran pencernaan dapat mengganggu selaput sel epitel yang melapisi saluran cerna sehingga dapat menyebabkan diare, mual, muntah, kram perut, hingga demam (Brooks dkk., 2013; Kilcullen dkk., 2016). Patogenesis *B. cereus* tergantung pada racun atau enterotoksin yang diproduksi oleh bakteri tersebut. Beberapa racun yang dapat

diproduksi oleh *B. cereus* yaitu *haemolysin*, *protease*, *fosfolipase*, dan toksin non protein (Tran dkk., 2011). Berdasarkan *review* yang dilakukan oleh Ramaro dan Sanchis (2013) disebutkan bahwa enterotoksin yang dihasilkan oleh *B. cereus* adalah *haemolysin II* (Ramarao dan Sanchis, 2013). *Haemolysin II* merupakan toksin yang dapat menginduksi pembentukan pori di selaput sel yang akan mempengaruhi permeabilitas membran, sehingga dapat menyebabkan kematian sel (Tran dkk., 2011; Ramarao dan Sanchis, 2013).



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Potensi seduhan kopi robusta dengan dan tanpa gula terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus* merupakan jenis penelitian *experimental laboratories in vitro* dengan rancangan penelitian *the post test control group design*.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi dan Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember, serta Laboratorium *Bioscience*, Rumah Sakit Gigi dan Mulut (RSGM) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Penelitian dilakukan mulai bulan Februari – Mei 2018.

3.3. Variabel Penelitian

3.3.1. Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah seduhan kopi robusta dan kopi robusta dengan penambahan gula pasir.

3.3.2. Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah persentase viabilitas sel monosit.

3.3.3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah isolat sel monosit, prosedur penelitian, dan konsentrasi *B. cereus*.

3.4. Definisi Operasional

- a. Seduhan kopi robusta merupakan minuman yang dibuat dari bubuk kopi robusta (Kopi Lanang Malangsari yang diproduksi Cafe Rollas Jember) dengan cara menyeduh bubuk kopi robusta dengan air panas suhu 85°C.
- b. Kopi robusta + gula merupakan seduhan kopi robusta yang ditambah dengan gula pasir.
- c. Isolat monosit berasal dari darah vena perifer (vena cubiti) wanita sehat yang tidak mempunyai riwayat kelainan darah yang diisolasi menggunakan teknik *gradient density centrifugation*.

3.5. Sampel Penelitian

3.5.1. Kriteria Sampel

Sel monosit yang diisolasi dari darah vena perifer (vena cubiti) wanita sehat yang tidak mempunyai riwayat kelainan darah dan tidak memiliki kebiasaan minum kopi.

3.5.2. Penggolongan Sampel

Pada penelitian ini sampel digolongkan dalam 4 kelompok, yaitu :

a. Kelompok I

Kelompok I berisi isolat monosit.

b. Kelompok II

Kelompok II sebagai kontrol negatif yang terdiri dari isolat monosit yang dipapar *B. cereus*.

c. Kelompok III

Kelompok III terdiri dari isolat monosit yang dipapar *B. cereus* dan diinkubasi kopi robusta.

d. Kelompok IV

Kelompok IV terdiri dari isolat monosit yang dipapar *B. cereus* dan diinkubasi kopi robusta + gula.

3.6. Bahan dan Alat

3.6.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu darah vena perifer, bubuk kopi robusta (Kopi Lanang Malang Sari yang diproduksi oleh Cafe Rollas Jember), gula pasir (Gulaku), HBSS (*Hank's Balanced Salt solution*) (Sigma), histopague (Sigma), *Bacillus cereus* (diperoleh dari laboratorium Biologi Fakultas Farmasi UNEJ), *trypan blue* (Gibco), *Lymphoprep*TM, RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) (Sigma), penicillin-streptomycin solution stabilized (Sigma), fungizon amphotericin, alkohol 70%, aquadest steril, dan media 199 (Gibro).

3.6.2. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu tabung falcon 15 ml (Nunc), *syringe* (One Med), inkubator, *coverslip*, *object glass*, *microtube*, mikroskop *inverted*, mikropipet, *blue tip* dan *yellow tip*, *handscoon* dan masker, tabung heparin, *autoclave*, *centrifuge*, *microplate*, *torniquet*, *vortex*, *incubator shaker*, *laminar flow cabinet*, filter (Corning), tabung eppendorf, kertas saring, timbangan analitik (Ohaus), termometer, dan seperangkat alat gelas (Pyrex).

3.7. Prosedur Penelitian

3.7.1. Sterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari logam dan alat gelas yang mudah memuai dicuci bersih kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* suhu 121°C selama 15 menit. Dan untuk alat yang terbuat dari plastik disterilkan menggunakan alkohol 70% di dalam *laminar air flow cabinet*.

3.7.2. Pembuatan Seduhan Kopi Robusta dan Kopi Robusta + Gula

Bubuk kopi robusta dibuat seduhan kopi berdasarkan berdasarkan pada hasil penelitian yang dilakukan oleh Putri (2017) yaitu dengan menyeduh 0,75 g bubuk

kopi robusta dalam labu ukur 10 ml dengan 10 ml air panas dengan suhu 85°C sehingga di dapat seduhan kopi murni. Dan untuk seduhan kopi robusta + gula dibuat kopi murni dengan penambahan 0,5 g gula. Kedua sampel yang telah diperoleh selanjutnya dikocok dan didiamkan sampai dingin sekitar 10 menit, kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan ampasnya. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi 10%. Dari hasil saringan tersebut dipipet 0,1 ml lalu ditambahkan air hingga 1ml. Kemudian dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan *syringe filter* 0,22 µm untuk mencegah adanya partikel padat pada bahan uji.

3.7.3. Pengambilan Sampel Darah

Diambil 6 cc darah dari darah perifer wanita sehat (tidak mempunyai riwayat kelainan darah) dan tidak memiliki kebiasaan mengkonsumsi kopi. Darah diambil menggunakan *syringe* secara intravena pada vena cubiti. Untuk mencegah penggumpalan, darah dimasukkan kedalam tabung heparin secara perlahan-lahan melalui dinding tabung.

3.7.4. Pembuatan RPMI dan Media 199

Pembuatan *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI) dilakukan dengan cara melarutkan serbuk RPMI kedalam *aquadest* steril. 1,56 g serbuk RPMI dilarutkan dalam 150 ml *aquadest* steril berdasarkan pada perhitungan berikut :

$$\frac{10,4 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 150 \text{ ml} = 1,56 \text{ g serbuk RPMI}$$

Pembuatan media 199 dilakukan dengan cara melarutkan serbuk media 199 ke dalam *aquadest* steril. 1,9 g serbuk media 199 dilarutkan dalam 200 ml *aquadest* steril berdasarkan pada perhitungan berikut :

$$\frac{9,5 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} \times 200 \text{ ml} = 1,9 \text{ g serbuk media 199}$$

3.7.5. Prosedur Isolasi Sel Monosit

Isolasi sel monosit dilakukan dengan menggunakan metode *Gradient Density Centrifugation* dengan teknik *Single Filter (Lymphoprep™)*. Langkah pertama yang dilakukan yaitu 3 ml darah dimasukkan kedalam tabung heparin/Ka EDTA dicampur hingga homogen. Kemudian darah diencerkan dengan menggunakan garam fisiologi (HBSS/PBS pH 7,4) dengan perbandingan 1:1, dicampur hingga homogen. Diluent darah dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 3 ml larutan *Lymphoprep™* dengan perbandingan *Lymphoprep™* dengan diluent darah 1:2. Kemudian dimasukkan melalui dinding tabung secara perlahan, larutan *Lymphoprep™* jangan sampai pecah. Selanjutnya di sentrifugasi dengan kecepatan 800 g selama 20 menit pada suhu 20 °C sehingga akan terbentuk 4 lapisan yaitu lapisan plasma, mononuklear, *Lymphoprep™*, dan polimorfonuklear eritrosit. Selanjutnya, lapisan kedua mononuklear (cincin kabut) dipipet secara hati-hati dan dimasukkan pada tabung steril. Sampel mononuklear diencerkan menggunakan HBSS/PBS (1:1), dicampur hingga homogen kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 900 g selama 3 menit pada suhu 20°C. Selanjutnya ditambahkan 1 ml HBSS/PBS pH 7,4 pada supernatan yang didapat, dan dicampur hingga homogen. Yang terakhir ditambahkan 5 µl *fungizone* dan 20 µl Penicillin-Streptomycin.

Selanjutnya disiapkan *Well Culture* lalu dimasukkan *coverslip* steril pada masing-masing *well* (disesuaikan dengan kebutuhan). Kemudian diteteskan 100 µl supernatan hasil isolasi sel pada *coverslip* yang sudah disiapkan. Selanjutnya diinkubasi selama 20-30 menit pada suhu 37°C. Setelah selesai, ambil dan ditambahkan 1 ml media kultur RPMI dan diinkubasi lagi selama 20-30 menit pada suhu 37°C. Kemudian diamati dibawah mikroskop *inverted* dengan menggoyangkan secara perlahan untuk melihat penempelan selnya. Setelah itu dicuci menggunakan media RPMI sebanyak 3 kali secara hati-hati untuk melepaskan kontaminasi selnya. Setelah dicuci kemudian diamati dibawah mikroskop *inverted* untuk melihat kontaminasi selnya. Setelah sel steril dan bebas dari kontaminasi, media kultur diganti menggunakan media kultur M.199, dan sel siap untuk dilakukan perlakuan.

3.7.6. Inkubasi Monosit dengan Seduhan Kopi dan Kopi + Gula

Prosedur yang dilakukan untuk inkubasi monosit dengan sampel (seduhan kopi dan kopi + gula) yaitu dengan menginkubasi isolat monosit dalam *microplate*. Inkubasi menggunakan *incubator shaker* (suhu 37 °C dan CO₂ 5%) selama 15 menit agar monosit melekat. Kemudian dilakukan pengecekan di bawah mikroskop *inverted*. Setelah itu monosit diresuspensi dengan 1000 µl RPMI lalu buang. Ditambahkan masing-masing 100 µl seduhan kopi robusta dan kopi robusta + gula pada *well culture* sesuai perlakuan dan homogenkan. Lalu dilakukan *pipetting* pada monosit dan bahan uji lalu diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37 °C dan CO₂ 5%. Amati dibawah mikroskop *inverted* dengan melihat pengaruh seduhan kopi robusta dan kopi robusta + gula terhadap sel monosit.

3.7.7. Pemaparan *Bacillus cereus*

Prosedur yang dilakukan untuk pemaparan *B. cereus* yaitu dengan menambahkan 100 µl *B. cereus* pada *well culture* yang berisi isolat monosit lalu dihomogenkan. Setelah homogen, diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37 °C dan CO₂ 5%. Kemudian sel difiksasi menggunakan metanol absolut selama 3 menit lalu dikeringkan.

3.7.8. Prosedur Uji Viabilitas Sel Monosit

Uji viabilitas sel dilakukan menggunakan metode mikroskopis. Viabilitas sel ditunjukkan oleh warna sel monosit setelah dipapar bakteri *B. cereus*. Monosit yang tidak menyerap pewarnaan *trypan blue* dihitung sebagai monosit yang hidup. Prosedur yang dilakukan adalah yaitu media kultur (media 199) dibuang dan ditambahkan 150 µl HBSS/PBS pH 7,4. Kemudian ditambahkan 50 µl *trypan blue* dan dihomogenkan. Selanjutnya diamati dibawah mikroskop *inverted* dengan waktu baca tidak boleh lebih dari 2 menit (Lonza, 2012).

3.7.9. Perhitungan Viabilitas Monosit

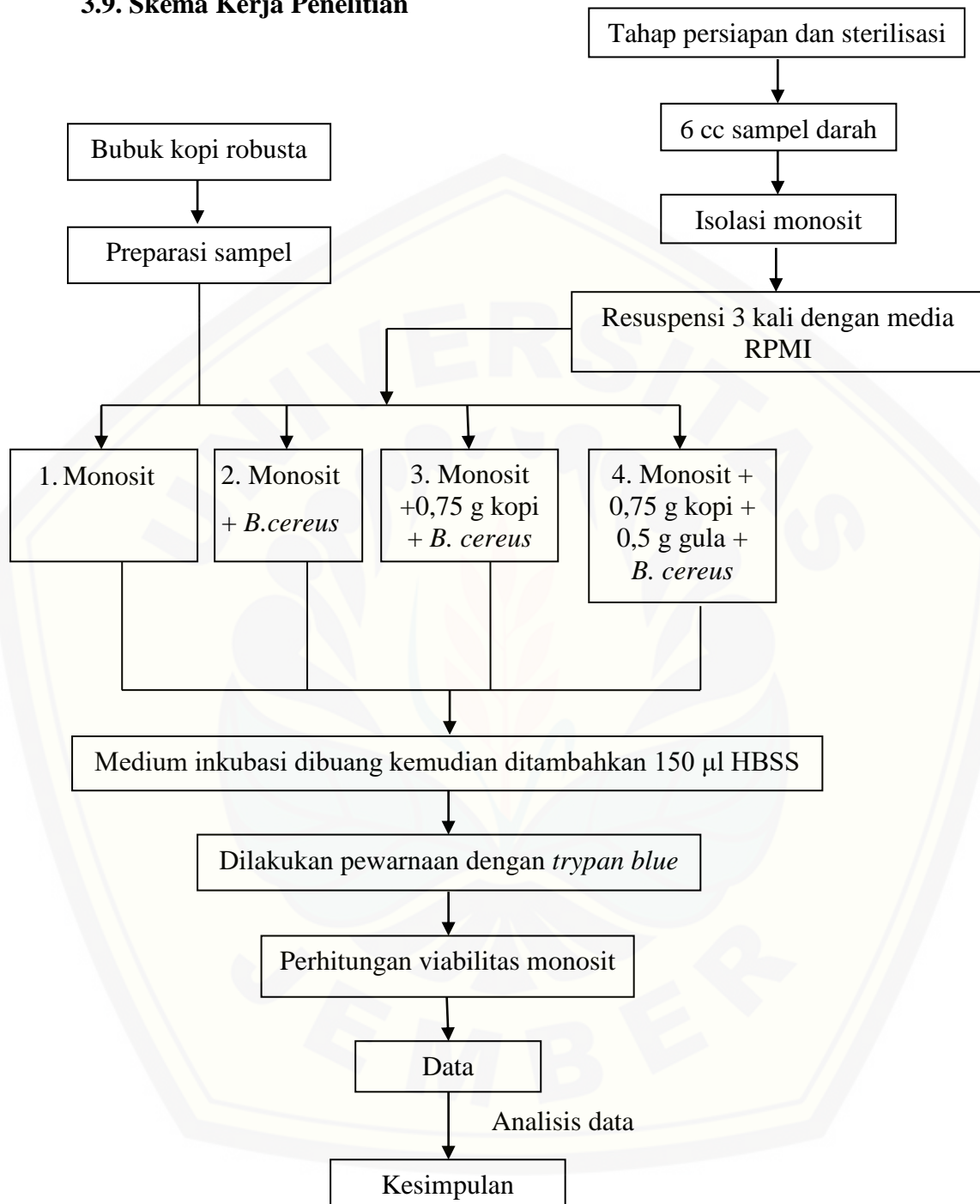
Perhitungan viabilitas monosit dilakukan secara manual menggunakan 4 lapang pandang yang diperoleh dari hasil pengamatan menggunakan mikroskop *inverted*. Persentase viabilitas monosit diperoleh dengan membagi jumlah sel yang *viable* (hidup) dengan jumlah sel monosit seluruhnya (monosit yang menyerap dan tidak menyerap *trypan blue*). Persentase viabilitas sel monosit dapat dihitung menggunakan rumus dibawah ini (Ardiny dkk., 2014):

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{Jumlah sel monosit yang viable}}{\text{Jumlah monosit seluruhnya}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

3.8. Analisis Data

Dalam penelitian ini, data yang didapatkan dianalisis menggunakan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Lavene test*. Data yang diperoleh normal dan homogen karena hasil menunjukkan nilai *p-value* > 0,05. Selanjutnya dilakukan uji statistik parametrik menggunakan *one way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna. Data dikatakan memiliki perbedaan yang bermakna jika nilai *p-value* < 0,05. Hasil yang diperoleh memiliki perbedaan bermakna sehingga dilanjutkan dengan *post hoc test* menggunakan *LSD (Least Significance Difference)*.

3.9. Skema Kerja Penelitian



BAB 5. PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini yaitu:

1. Seduhan kopi robusta dengan dan tanpa gula dapat meningkatkan viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus*. Hasil rata-rata viabilitas sel monosit yang diinkubasi dengan seduhan kopi dengan gula sebesar $66,65\% \pm 1,52\%$ dan rata-rata viabilitas sel monosit yang diinkubasi dengan seduhan kopi tanpa gula sebesar $56,42\% \pm 5,93\%$.
2. Potensi seduhan kopi robusta dengan gula terhadap viabilitas sel monosit yang dipapar *B. cereus* lebih tinggi dibandingkan dengan seduhan kopi robusta tanpa gula. Hasil dari uji *one way anova* dan $LSD < 0,05$ menunjukkan bahwa antara seduhan kopi robusta dengan gula dan kopi robsuta tanpa gula memiliki perbedaan yang signifikan.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh penambahan gula pada seduhan kopi robusta terhadap mekanisme viabilitas monosit.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya mengenai pengaruh intensitas konsumsi kopi per hari terhadap viabilitas monosit.

DAFTAR PUSTAKA

- Afonso, R. C. L., A. P. L. Voytena, S. Fanan, H. Pitz, D. S. Coelho, A. L. Horstmann, A. Pereira, V. G. Uarrota, M. C. Hillmann, L. A. C. Varela, R. M. Ribeiro-do-Valle, dan M. Maraschin. 2016. Phitochemical composition, antioxidant activity, and the effect of the aqueous extract of coffee (*coffea arabica l.*) bean residual press cake on the skin wound healing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1–10.
- Albert, D., A. Marie, B. B. Bruce, dan D. E. Haines. 2012. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. Edisi 32. United states: Elsevier Saunder.
- Alburuda, F. 2012. Viabilitas Monosit yang Dipapar *Streptococcus mutans* dan Diinkubasi dengan Bawang Putih (*Allium sativum*). *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Ardiny, K., S. Subiyantoro, K. Gigi, F. K. Gigi, dan U. Jember. 2014. Jumlah sel pada isolat monosit setelah paparan tunggal radiasi sinar x dari radiografi periapikal (the total of cells on the isolated monocytes after single exposure of x-ray radiation from periapical radiography). *e-jurnal Pustaka Kesehatan*. 2(3):563–569.
- Arzumanyan, V. G. dan I. M. Ozhovan. 2002. Modified method for evaluation of plasma membrane integrity in eukaryotic cell. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 134(1):103–105.
- Asti, S. I. P. 2015. Pengaruh Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Monosit (Penelitian Eksperimental Laboratoris In-vitro). *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2015. Peraturan kepala badan pengawas obat dan makanan republik indonesia nomor 1 tahun 2015 tentang kategori pangan. *Jdih BPOM RI*. 2015:1–16.
- Baharom, F., S. Thomas, G. Rankin, R. Lepzien, J. Pourazar, A. F. Behndig, C. Ahlm, A. Blomberg, dan A. Smed-Sørensen. 2016. Dendritic cells and monocytes with distinct inflammatory responses reside in lung mucosa of healthy humans. *The Journal of Immunology*. 196(11):4498–4509.
- Baratawidjaja, K. G., I. Rengganis, dan Irnun. 2014. *Imunologi Dasar*. Jakarta:

Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

- Bonardo, B., H. Christina, C. Fransisca, K. Kristin, dan J. Sudiono. 2015. Peran monosit (makrofag) pada proses angiogenesis dan fibrosis. *Seminar Nasional Cendekiawan*. 254–259.
- Bottone, E. J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 23(2):382–398.
- Brooks, G. F., K. C. Carroll, J. Butel, S. A. Morse, dan T. Mietzner. 2013. *Medical Microbiology*. Edisi 26. New York: Mc Graw Hill Lange.
- Budirahardjo, R. 2009. Peningkatan viabilitas monosit oleh biji kopi robusta terhadap *Streptococcus mutans*. *Pedodonsia*. 8–11.
- Choiron, M. 2010. Penerapan gmp pada penanganan pasca panen kopi rakyat untuk menurunkan okratoksin produk kopi. *Agrointek*. 4:114–120.
- Cisewski, S. E., L. Zhang, J. Kuo, G. J. Wright, Y. Wu, M. J. Kern, dan H. Yao. 2016. The effects of oxygen level and glucose concentration on the metabolism of porcine tmj disc cells. *HHS Public Access*. 70(12):773–779.
- Collado, A. D. A. M., F. G. Dupuy, R. D. Morero, dan C. Minahk. 2016. Cholesterol induces surface localization of polyphenols in model membranes thus enhancing vesicle stability against lysozyme, but reduces protection of distant double bonds from reactive-oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1858(7):1479–1487.
- Dachliani, D. M. 2006. Impor Gula Tahun 1980 – 2003. *Skripsi*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Dahlan, M. S. 2011. *Statistik Untuk Kedokteran Dan Kesehatan Deskriptif, Bivariat, Dan Multivariat Dilengkapi Aplikasi Dengan Menggunakan SPSS*. Edisi 3. Jakarta: Salemba Medika.
- Delita, Y. N. 2012. Viabilitas Monosit yang Dipapar *Streptococcus viridans* dan Diinkubasi dengan Minyak Zaitun (*Oleum olivae*). *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Furth, R. Van. 1992. *Mononuclear Phagocytes Biology of Monocytes and Macrophages*. Netherland: Springer-Science+Business Media, B.V.

- Ginhoux, F. dan S. Jung. 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology*. 14(6):392–404.
- Grievink, H. W., T. Luisman, C. Kluft, M. and Moerland, dan K. E. Malone. 2016. Comparison of three isolation techniques for human peripheral blood mononuclear cells: cell recovery and viability, population composition, and cell functionality. *Biopreservation and Biobanking*. 14(5):410–415.
- Healthcare, G. 2007. *Isolation of mononuclear cells*. Sweden: Imagination at work.
- Hutabarat, B. 2004. Kondisi pasar dunia dan dampaknya terhadap kinerja industri perkopian nasional. *Jurnal Agro Ekonomi*. 22(2):147–167.
- Ingólfsson, H. I., M. N. Melo, F. J. Van Eerden, C. Arnarez, C. A. López, T. A. Wassenaar, X. Periole, A. H. De Vries, D. P. Tieleman, dan S. J. Marrink. 2014. Lipid organization of the plasma membrane lipid organization of the plasma membrane. *Journal of the American Chemical Society*. 136(41):14554–14559.
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System). 2010. *Bacillus cereus* Frankland and Frankland. <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt#null> [Diakses pada 17 Februari 2018].
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System). 2011. *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner. <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt#null> [Diakses pada 16 Februari 2018].
- Jeszka-Skowron, M., A. Zgoła-Grześkowiak, dan T. Grześkowiak. 2014. Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. *European Food Research and Technology*. 240(1):19–31.
- Kang, J., Y. Liu, M. Xie, S. Li, M. Jiang, dan Y. Wang. 2004. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1674:205–214.
- Kaushansky, K., M. Lichtman, J. Prchal, M. M. Levi, O. Press, L. Burns, dan M. Caligiuri. 2016. *Williams Hematology*. Edisi 9. New York: Mc Graw Hill education.

- Kilcullen, K., A. Teunis, T. G. Popova, dan S. G. Popov. 2016. Cytotoxic potential of *Bacillus cereus* strains atcc 11778 and 14579 against human lung epithelial cells under microaerobic growth conditions. *Frontiers in Microbiology*. 7(FEB):1–12.
- Korn, E. D. 1998. Structure and function of the plasma membrane : a biochemical perspective. *The Journal of general physiology*. 52(1):257–278.
- Laluce, C., J. O. Tognolli, K. F. De Oliveira, C. S. Souza, dan M. R. Morais. 2009. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83(4):627–637.
- Liang, N. dan D. D. Kitts. 2015. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*. 8(1):1–20.
- Lim, J. J., S. Grinstein, dan Z. Roth. 2017. Diversity and versatility of phagocytosis: roles in innate immunity, tissue remodeling, and homeostasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7(May):1–12.
- Locca, D., P. Brookman, dan A. Mathur. 2009. Ficoll-paque TM versus lymphoprep TM: a comparative study of two density gradient media for therapeutic bone marrow mononuclear cell preparations research article. *Future Medicine*. 4(5):689–696.
- Lonza, A. C. 2012. Technical reference guide protocol for performing a trypan blue viability test. *BioResearch*. 2–3.
- Loos, H., B. Blok-Schut, R. van Doorn, R. H. Riviere, A. Ia, Aarf Brutel de, dan L. Meerhof. 2015. A method for the recognition and separation of human blood monocytes on density gradients. *Blood Journal*. 57(5)
- Malian, A. H. 2004. Kebijakan perdagangan internasional komoditas pertanian indonesia. *Akademi Keperawatan Pamenang*. 2(2):135–156.
- Munasir, Z. 2001. Respons imun terhadap infeksi bakteri. *Sari Pediatri*. 2(4):193–197.
- Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes, dan V. W. Rodwell. 2003. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Edisi 26. New York: McGraw-Hill.
- Mussatto, S. I., E. M. S. Machado, S. Martins, dan J. A. Teixeira. 2011. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues.

Food and Bioprocess Technology. 4(5):661–672.

Oestreich-Janzen, S. 2013. *Chemistry of Coffee*. Elsevier Inc. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*.

Oteiza, P. I., A. G. Erlejman, S. V. Verstraeten, C. L. Keen, dan C. G. Fraga. 2005. Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface. *Clinical and Developmental Immunology*. 12(1):19–25.

Panggabean, E. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: Agro Media Pustaka.

Paramita, D. A. dan V. I. S. Pinasti. 2016. Nongkrong di warung kopi sebagai gaya hidup mahasiswa di mato kopi yogyakarta. *Jurnal Pendidikan Sosiologi*. (1):1–12.

Phan, H. T. T., T. Yoda, B. Chahal, M. Morita, M. Takagi, dan M. C. Vestergaard. 2014. Structure-dependent interactions of polyphenols with a biomimetic membrane system. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1838(10):2670–2677.

Prastowo, B., E. Karmawati, S. Rubijo, C. Indrawanto, dan S. J. Munarso. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi [Cultivation and Post Harvest Coffee]*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.

Price, C. A. 1982. *Centrifugation in Density Gradients*. New York: Academic Express.

Pruchnik, H., D. Bonarska-Kujawa, dan H. Kleszczyńska. 2014. Effect of chlorogenic acid on the phase transition in phospholipid and phospholipid/cholesterol membranes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 118(2):943–950.

Putri, R. R. 2017. Penetapan Kadar Polifenol dan Uji Aktivitas Antioksidan pada Aneka Sajian Minuman Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Menggunakan Metode DPPH. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.

Ramarao, N. dan V. Sanchis. 2013. A review : the pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*. *Toxins*. 5(6):1119–1139.

Sigma Aldrich. 2006. Giemsa stain (procedure no. gs-10). *Cold Spring Harbor Protocols*. (7)

- Siregar, N. S. 2014. Karbohidrat. *Jurnal Ilmu Keolahragaan*. 13(2):38–44.
- Sudja, A. 2017. Studi perbandingan jumlah parasit malaria menggunakan variasi waktu pewarnaan pada konsentrasi giemsa 3 % di laboratorium rsud dr. h. chasan boesoerie ternate. *Jurnal Riset Kesehatan*. 5(2):23–27.
- Tran, S. L., A. Puhar, M. Ngo-Camus, dan N. Ramarao. 2011. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin hlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE*. 6(9):2–6.
- Triyanti, D. R. 2016. *Outlook Kopi Komoditas Pertanian Subsektor Perkebunan*. Jakarta: Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian Sekretariat Jenderal - Kementerian Pertanian.
- Upadhyay, R. dan L. J. M. Rao. 2013. An outlook on chlorogenic acids-occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53(9):968–984.
- Vignoli, J. A., M. C. Viegas, D. G. Bassoli, dan M. de T. Benassi. 2014. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *Food Research International*. 61:279–285.
- Wang, Y. dan C. T. Ho. 2009. Polyphenols chemistry of tea and coffee: a century of progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(18):8109–8114.
- Warnasih, S., W. Yulia, B. Yohan, I. . Artika, dan R. . Sasmono. 2016. Isolasi peripheral blood mononuclear cells (pbmcs) dari darah manusia sehat dengan metode sentrifugasi gradien ficoll. *Ekologia*. 16(1):19–23.
- Yusmarini. 2011. Senyawa polifenol pada kopi, pengaruh pengolahan, metabolisme dan hubungannya dengan kesehatan. *Sagu*. 10(2):22–30.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pengenceran Bahan Uji

Lampiran 1.1. Perhitungan konsentrasi untuk seduhan kopi robusta

Sebanyak 0,75 g bubuk kopi robusta diseduh menggunakan 10 ml air.

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi 100\%} &= \frac{0,75 \text{ g}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \\ &= 75 \cdot 10^3 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Pembuatan konsentrasi 10\% (dalam 1 ml air)} &= \frac{10}{100} \times 75 \cdot 10^3 \text{ ppm} \\ &= 7,5 \cdot 10^3 \text{ ppm}\end{aligned}$$

Jumlah seduhan yang dipipet

$$\begin{aligned}\frac{x}{1 \text{ ml}} \times 75 \cdot 10^3 \text{ ppm} &= 7,5 \cdot 10^3 \text{ ppm} \\ x &= 0,1 \text{ ml}\end{aligned}$$

Jadi pembuatan seduhan kopi robusta konsentrasi 10% dilakukan dengan memipet 0,1 ml seduhan kopi robusta kemudian ditambahkan air hingga 1 ml.

Lampiran 1.2. Perhitungan konsentrasi untuk seduhan kopi robusta dengan gula

Sebanyak 0,75 g bubuk kopi robusta + 0,5 g gula diseduh menggunakan 10 ml air.

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi 100\%} &= \frac{1,25 \text{ g}}{10 \text{ ml}} \times 1000 \\ &= 125 \cdot 10^3 \text{ ppm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Pembuatan konsentrasi 10\% (dalam 1 ml air)} &= \frac{10}{100} \times 125 \cdot 10^3 \text{ ppm} \\ &= 12,5 \cdot 10^3 \text{ ppm}\end{aligned}$$

Jumlah seduhan yang dipipet

$$\begin{aligned}\frac{x}{1 \text{ ml}} \times 125 \cdot 10^3 \text{ ppm} &= 12,5 \cdot 10^3 \text{ ppm} \\ x &= 0,1 \text{ ml}\end{aligned}$$

Jadi pembuatan seduhan kopi robusta dengan gula konsentrasi 10% dilakukan dengan memipet 0,1 ml seduhan kopi robusta dengan gula kemudian ditambahkan air hingga 1 ml.

Lampiran 2. Hasil Penelitian**Lampiran 2.1. Hasil perhitungan kelompok I (monosit + media 199)**

Replikasi	Lapang pandang	Sel hidup	Sel mati	Jumlah total sel	Viabilitas sel (%)	Rata-rata (%)
1	1	105	5	110	95,45	92,04
	2	102	7	109	93,58	
	3	100	11	111	90,09	
	4	227	28	255	89,02	
2	1	241	17	258	93,41	93,99
	2	295	21	316	93,35	
	3	302	16	318	94,97	
	4	326	20	346	94,22	
3	1	180	20	200	90,00	91,66
	2	205	21	226	90,71	
	3	223	11	234	95,30	
	4	232	24	256	90,63	
Rata-rata (%)						92,56
Standar deviasi						1,25

Lampiran 2.2. Hasil perhitungan Kelompok II (monosit + *B.cereus*)

Replikasi	Lapang pandang	Sel hidup	Sel mati	Jumlah total sel	Viabilitas sel (%)	Rata-rata (%)
1	1	4	40	44	9,09	8,55
	2	7	37	44	15,91	
	3	7	69	76	9,21	
	4	0	89	89	0,00	
2	1	5	90	95	5,26	8,86
	2	2	127	129	1,55	
	3	12	65	77	15,58	
	4	6	40	46	13,04	
3	1	14	118	132	10,61	8,39
	2	6	89	95	6,32	
	3	0	109	109	0,00	
	4	13	65	78	16,67	
Rata-rata (%)						8,60
Standar deviasi						0,24

Lampiran 2.3. Hasil perhitungan Kelompok III (monosit + kopi + *B.cereus*)

Replikasi	Lapang pandang	Sel hidup	Sel mati	Jumlah total sel	Viabilitas sel (%)	Rata-rata (%)
1	1	113	46	159	71,07	50,95
	2	76	65	141	53,90	
	3	54	81	135	40,00	
	4	47	74	121	38,84	
2	1	112	56	168	66,67	62,73
	2	105	51	156	67,31	
	3	115	52	167	68,86	
	4	88	95	183	48,09	
3	1	63	40	103	61,17	55,56
	2	31	30	61	50,82	
	3	51	43	94	54,26	
	4	70	55	125	56,00	
Rata-rata (%)						56,41
Standar deviasi						5,94

Lampiran 2.4. Hasil perhitungan Kelompok IV (monosit + kopi + gula + *B.cereus*)

Replikasi	Lapang pandang	Sel hidup	Sel mati	Jumlah total sel	Viabilitas sel (%)	Rata-rata (%)
1	1	22	49	71	30,99	65,30
	2	66	15	81	81,48	
	3	44	14	58	75,86	
	4	43	16	59	72,88	
2	1	58	12	70	82,86	68,31
	2	61	11	72	84,72	
	3	51	37	88	57,95	
	4	31	34	65	47,69	
3	1	103	56	159	64,78	66,35
	2	31	4	35	88,57	
	3	100	50	150	66,67	
	4	61	74	135	45,19	
Rata-rata (%)						66,65
Standar deviasi						1,52

Lampiran 3. Analisis Data**Lampiran 3.1. Uji normalitas *Saphiro Wilk*****Case Processing Summary**

Kelompok	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Viabilitas MNC + Media	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
MNC + B.C	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
MNC + Kopi + B.C	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%
MNC + Kopi + Gula + B.C	3	100.0%	0	.0%	3	100.0%

Descriptives

Kelompok	Statistic	Std. Error
Viabilitas MNC + Media	Mean	92.5633
	95% Confidence Interval for Lower Bound	89.4580
	Mean	Upper Bound
	95.6686	
	5% Trimmed Mean	.
	Median	92.0400
	Variance	1.563
	Std. Deviation	1.25005
	Minimum	91.66
	Maximum	93.99
	Range	2.33
	Interquartile Range	.
	Skewness	1.554
	Kurtosis	1.225
MNC + B.C	Mean	8.6033
		.13544

	95% Confidence Interval for Lower Bound	8.0206	
	Mean		
	Upper Bound	9.1861	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	8.5500	
	Variance	.055	
	Std. Deviation	.23459	
	Minimum	8.40	
	Maximum	8.86	
	Range	.46	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	.970	1.225
	Kurtosis	.	.
<hr/>			
MNC + Kopi + Mean		56.4233	3.42602
B.C	95% Confidence Interval for Lower Bound	41.6823	
	Mean		
	Upper Bound	71.1643	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	55.5900	
	Variance	35.213	
	Std. Deviation	5.93405	
	Minimum	50.95	
	Maximum	62.73	
	Range	11.78	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	.619	1.225
	Kurtosis	.	.
<hr/>			
MNC + Kopi + Mean		66.6533	.88205

Gula + B.C	95% Confidence Interval for Lower Bound	62.8582	
	Mean		
	Upper Bound	70.4485	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	66.3500	
	Variance	2.334	
	Std. Deviation	1.52775	
	Minimum	65.30	
	Maximum	68.31	
	Range	3.01	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	.858	1.225
	Kurtosis	.	.

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Viabilitas MNC + Media	.329	3	.	.869	3	.291
MNC + B.C	.257	3	.	.961	3	.622
MNC + Kopi + B.C	.223	3	.	.985	3	.767
MNC + Kopi + Gula + B.C	.245	3	.	.970	3	.670

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 3.2. Uji homogenitas *Lavene Test*

Descriptives								
Viabilitas								
					95% Confidence Interval for Mean			
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Min.	Max.
MNC + Media	3	92.5633	1.25005	.72172	89.4580	95.6686	91.66	93.99
MNC + B.C	3	8.6033	.23459	.13544	8.0206	9.1861	8.40	8.86
MNC + Kopi + B.C	3	56.4233	5.93405	3.42602	41.6823	71.1643	50.95	62.73
MNC + Kopi + Gula + B.C	3	66.6533	1.52775	.88205	62.8582	70.4485	65.30	68.31
Total	12	56.0608	31.86515	9.19868	35.8147	76.3070	8.40	93.99

Test of Homogeneity of Variances

Viabilitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.031	3	8	.051

Lampiran 3.3. Uji *One way ANOVA*

ANOVA					
Viabilitas					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11090.938	3	3696.979	377.583	.000
Within Groups	78.329	8	9.791		
Total	11169.267	11			

Lampiran 3.4. Uji *post hoc* LSD

Multiple Comparisons

Viabilitas

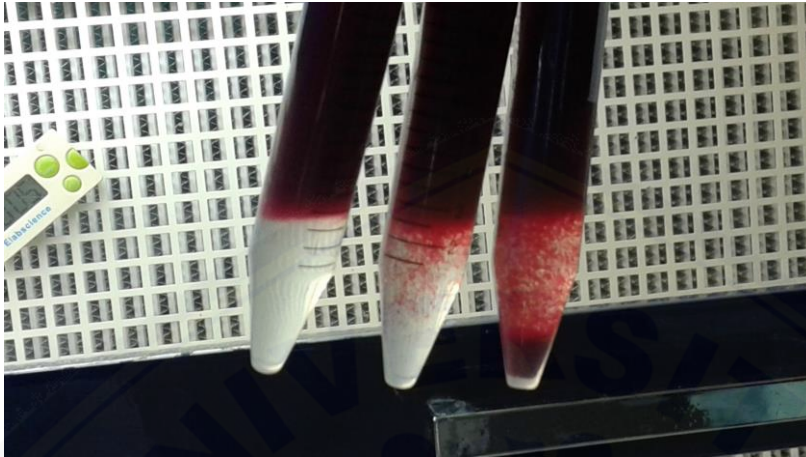
LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
MNC + Media	MNC + B.C	83.96000*	2.55489	.000	78.0684	89.8516
	MNC + Kopi + B.C	36.14000*	2.55489	.000	30.2484	42.0316
	MNC + Kopi + Gula + B.C	25.91000*	2.55489	.000	20.0184	31.8016
MNC + B.C	MNC + Media	-83.96000*	2.55489	.000	-89.8516	-78.0684
	MNC + Kopi + B.C	-47.82000*	2.55489	.000	-53.7116	-41.9284
	MNC + Kopi + Gula + B.C	-58.05000*	2.55489	.000	-63.9416	-52.1584
MNC + Kopi + B.C	MNC + Media	-36.14000*	2.55489	.000	-42.0316	-30.2484
	MNC + B.C	47.82000*	2.55489	.000	41.9284	53.7116
	MNC + Kopi + Gula + B.C	-10.23000*	2.55489	.004	-16.1216	-4.3384
MNC + Kopi + Gula + B.C	MNC + Media	-25.91000*	2.55489	.000	-31.8016	-20.0184
	MNC + B.C	58.05000*	2.55489	.000	52.1584	63.9416
	MNC + Kopi + B.C	10.23000*	2.55489	.004	4.3384	16.1216

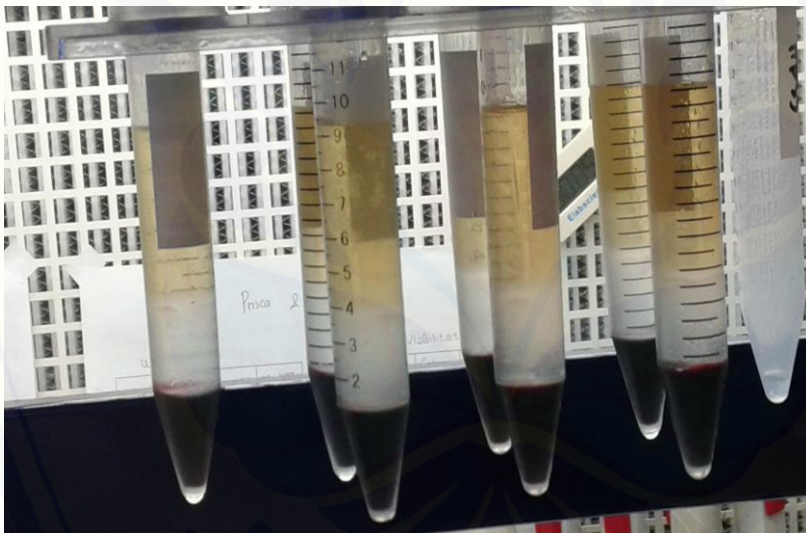
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

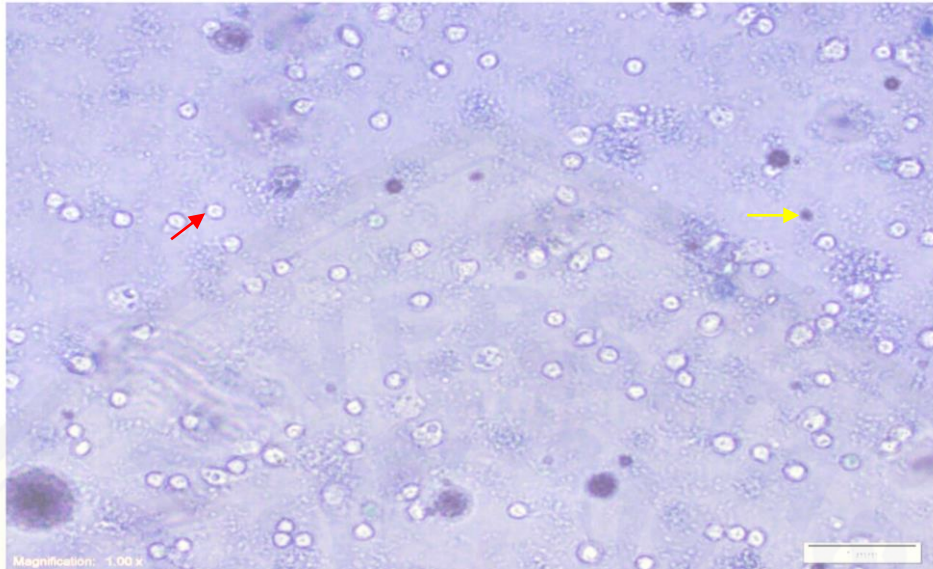
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

Lampiran 4.1. Gambar sebelum dilakukan proses isolasi (sentrifugasi)



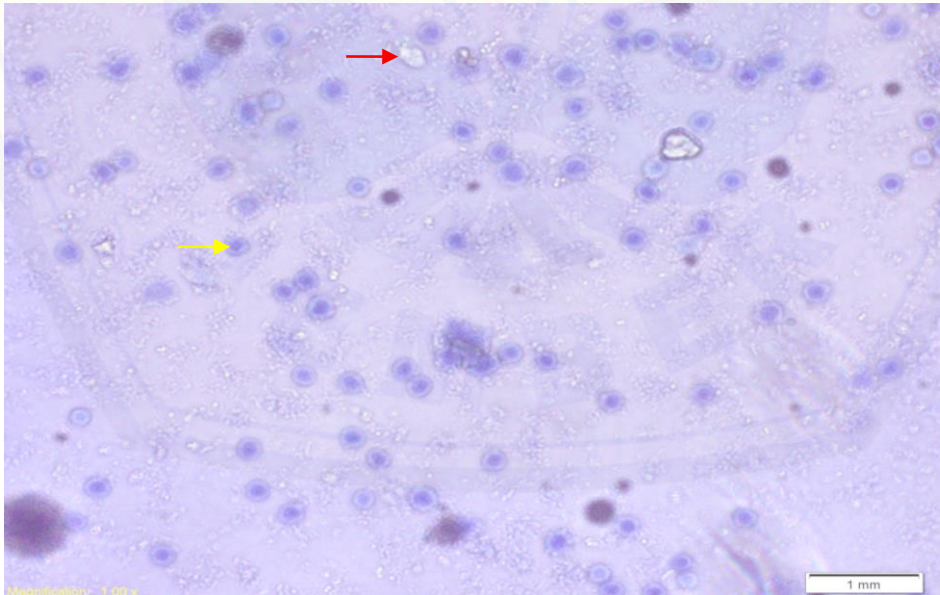
Lampiran 4.2. Hasil Pemisahan Sel Monosit



Lampiran 5. Foto Hasil Penelitian**Lampiran 5.1. Kelompok 1 (Monosit + Media 199)**

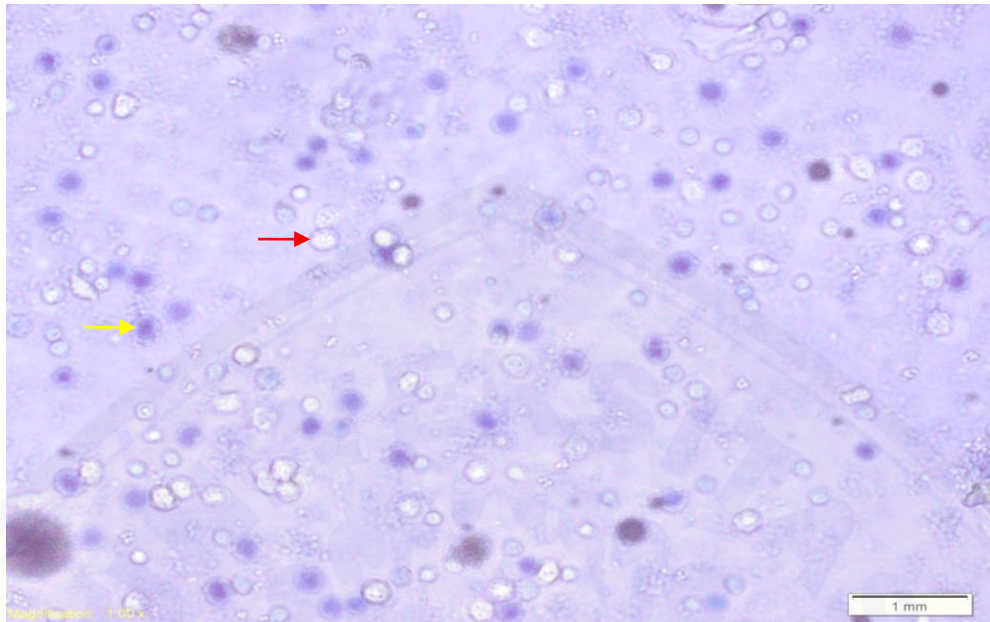
Gambar a. Kelompok 1 (mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400x)

Keterangan : → Sel yang hidup (*viable*)
→ Sel yang mati

Lampiran 5.2. Kelompok 2 (Monosit + *B.cereus*)

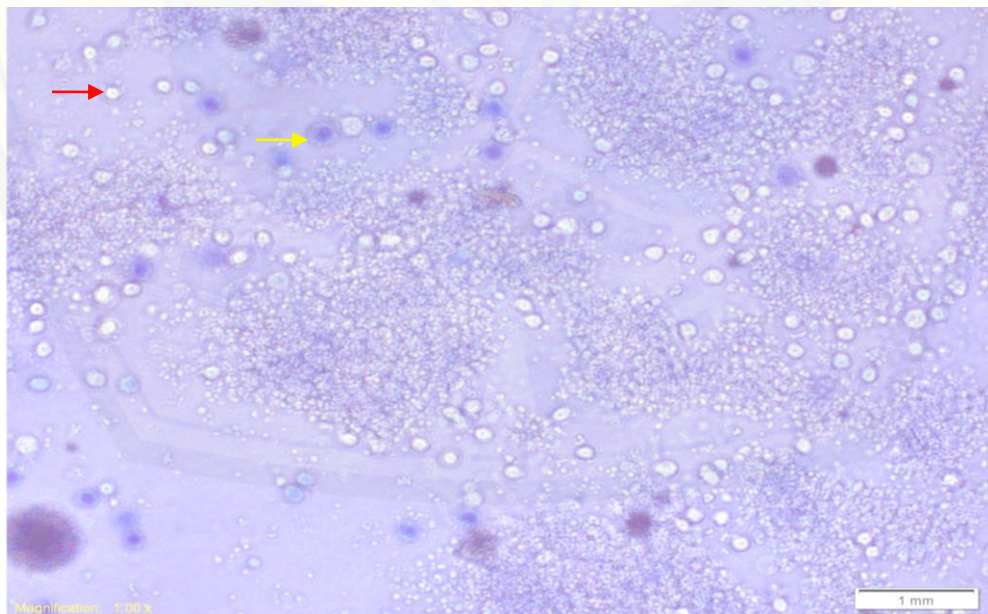
Gambar b. Kelompok 2 (mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400x)

Keterangan : → Sel yang hidup (*viable*)
→ Sel yang mati

Lampiran 5.3. Kelompok 3 (Monosit + Kopi + *B.cereus*)

Gambar c. Kelompok 3 (mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400x)

Keterangan : → Sel yang hidup (*viable*)
→ Sel yang mati

Lampiran 5.4. Kelompok 4 (Monosit + Kopi + Gula + *B.cereus*)

Gambar d. Kelompok 4 (mikroskop *inverted* dengan perbesaran 400x)

Keterangan : → Sel yang hidup (*viable*)
→ Sel yang mati