



**KAJIAN DOSIS OPTIMAL KOPI HITAM
ROBUSTA PADA SEL FIBROBLAS
(Eksperimental In-Vitro)**

SKRIPSI

Oleh

ADNAN RASYID RIFAI

NIM. 131610101053

SKRIPSI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2018



**KAJIAN DOSIS OPTIMAL KOPI HITAM
ROBUSTA PADA SEL FIBROBLAS
(Eksperimental In-Vitro)**

SKRIPSI

Oleh

ADNAN RASYID RIFAI

NIM. 131610101053

SKRIPSI

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

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2018

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Kajian dosis optimal kopi hitam robusta pada viabilitas sel fibroblas (Eksperimental In-Vitro)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi pada:

Hari, tanggal : 5 Juni 2018

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua

Penguji Anggota

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

Rendra Chriestedy P. drg., MDSc.
NIP. 198305312008011003

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

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

Melok Aris W. drg., M. Kes, Sp. Perio
NIP.197104092005012002

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

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

RINGKASAN

Rifai, Adnan Rasyid. 2018. *KAJIAN DOSIS OPTIMAL KOPI HITAM ROBUSTA PADA VIABILITAS SEL FIBROBLAS (An Experimental Research in-Vitro).*

Kopi hitam robusta memiliki berbagai zat antara lain asam klorogenik, trigonelin, kahweol dan kafein. Kandungan tersebut diperkirakan dapat mempengaruhi masa hidup sel fibroblas khususnya pada rongga mulut (Tai *et al.*, 2010; Digby *et al.*, 2010; Yorinta *et al.*, 2013). Fibroblas adalah sel yang sangat penting dan paling banyak pada tubuh khususnya rongga mulut. Sel ini berperan penting pada saat sintesis matriks ekstraseluler, kolagen, dan kerangka struktural. Fungsi utama fibroblas adalah menjaga integritas jaringan pendukung dengan cara mengatur perubahan umur matriks ekstraseluler secara berkesinambungan. Sel fibroblas adalah sel yang mudah melekat pada sel sekitar dan memiliki kecepatan proliferasi yang tinggi terutama fibroblas gingiva (Newman *et al.*, 2011). Penelitian tentang bagaimana efek dari kopi hitam robusta serta berapa dosis optimal konsumsi kopi belum banyak dilakukan. Maka, perlu dilakukan uji viabilitas sel fibroblas terhadap kopi hitam robusta perlu dilakukan.

Pada penelitian ini dilakukan dengan rancangan *post only grup desain* dengan 6 kelompok konsentrasi setiap kelompok 3 sampel. Data diuji *One Way ANOVA* dengan batas signifikansi ($p < 0,05$) menghasilkan $p = 0,064$. Pada penelitian ini diperoleh data normal dan homogen tetapi pada uji *One-Way Annova* tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan dari konsentrasi 0,0375 mg/ml hingga konsentrasi 1,2 mg/ml.

Hal ini dapat diartikan bahwa pada setiap kelompok konsentrasi memiliki pengaruh yang hampir sama terhadap viabilitas sel fibroblas yaitu mempertahankan dan meningkatkan viabilitas sel fibroblas. Viabilitas terendah pada penelitian ini pada konsentrasi 0,15 mg/ml dengan rata-rata viabilitas sel kelompok sebesar 113%. Hal ini dimungkinkan karena pada konsentrasi 0,15 mg/ml sifat absorbansi antioksidan terhadap radikal bebas mengalami stagnansi atau penurunan. Maka dapat disimpulkan bahwa dosis optimal kopi hitam robusta adalah 0,15 mg/ml.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Adnan Rasyid Rifai

NIM : 131610101053

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul : ” Kajian Dosis Optimal Kopi Hitam Robusta pada Viabilitas Sel fibroblas Eksperimental In-Vitro)” 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 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,

Adnan Rasyid Rifai

NIM. 131610101053

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ibu saya Dian damayanti dan Ayah saya Muhlasin, semoga beliau diberikan kesehatan dan segala sesuatunya menjadi berkah, beliaulah yang selalu memberi saya semangat, membesarkan saya dari kecil hingga saat ini, pendidikan, doa, dan dukungan moral maupun materiil;
2. Adik saya Arinal yang selalu mendukung hobi saya, membantu saya ketika dalam kesulitan, semoga Allah memberimu jalan hidup yang terbaik ;
3. Dosen-dosen saya yang telah mengajarkan ilmu untuk saya selama menjalani pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk kemaslahatan umat;
4. Guru-guru saya yang telah mengajarkan ilmu agama maupun dunia, semoga beliau diberi kesehatan dan keberkahan dalam hidupnya;
5. Almamater saya Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;

MOTTO

“lainsyakartum laazidannakum walainkafartum inna ‘adabii lasyadid”

Jika kalian bersyukur pasti akan Aku tambah nikmat-Ku tetapi jika kalian kufur sesungguhnya adzab-Ku amat pedih”

(Q. S. Ibrahim:7)



*) Departemen Agama RI. 2009. Al-Qur'an Bayan. Depok. Penerbit: Bayan

Qur'an

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, karunia dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Kajian dosis optimal kopi hitam robusta pada viabilitas sel fibroblas (Eksperimental In-Vitro)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Dr. Zahreni Hamzah drg., MS selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah menyempatkan waktunya membimbing penulis menyelesaikan Skripsi ini.
2. Melok Aris W. drg., M. Kes, Sp. Perio selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah menyempatkan waktunya membimbing penulis menyelesaikan Skripsi ini.
3. Niken P., drg., M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah banyak memberikan nasihat, saran, dan motivasi;
6. Ibunda tercinta Dian Damayanti dan Ayahanda tercinta Muhlasin., yang telah membesarkan, mendidik, melatih, dan menyekolahkan saya hingga saat ini, semoga beliau selalu diberi kesehatan;
7. Adikku tercinta Arinal semoga lekas selesai kuliahnya;
8. Teman-teman Lapas Stain Alvin, Ilham, Cenggih, Randa, Iga, Tajul, Jerry, Reiyan, Mas Dede, Pedot, Om Gozali, Mas Angga,dan Riko.
9. Semua pihak yang terlibat secara langsung maupun tidak langsung yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, terima kasih kalian semua.

Penulis menyadari masih ada ketidaksempurnaan dalam penulisan skripsi ini sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi kesempurnaan penulisan selanjutnya.

Jember, Juni 2018
Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|--|------|
| COVER | i |
| PENGSAHAN | ii |
| RINGKASAN | iii |
| PERNYATAAN | iv |
| PERSEMBAHAN | v |
| MOTTO | vi |
| PRAKATA | vii |
| DAFTAR ISI | viii |
| BAB 1 PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah..... | 2 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 2 |
| 1.3.1 Tujuan Umum..... | 2 |
| 1.3.2 Tujuan Khusus..... | 2 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 2 |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA | 3 |
| 2.1 Kopi..... | 3 |
| 2.1.1 Jenis Kopi..... | 3 |
| 2.2 Kopi Robusta..... | 4 |
| 2.2.1 Klasifikasi Kopi Robusta..... | 4 |
| 2.2.2 Kandungan Kopi Robusta..... | 5 |
| 2.3 Antiksidan..... | 8 |
| 2.3.1 Antikoksidan Endogen..... | 8 |
| 2.3.2 Antioksidan Eksogen..... | 8 |
| 2.4 Radikal Bebas..... | 9 |
| 2.5 Sel Fibroblas..... | 10 |
| 2.6 Bioavailabilitas/Kelangsungan Hidup Sel..... | 10 |
| 2.7 MTT assay..... | 11 |
| 2.8 Apoptosis..... | 12 |
| 2.9 Kerangka Konseptual..... | 15 |

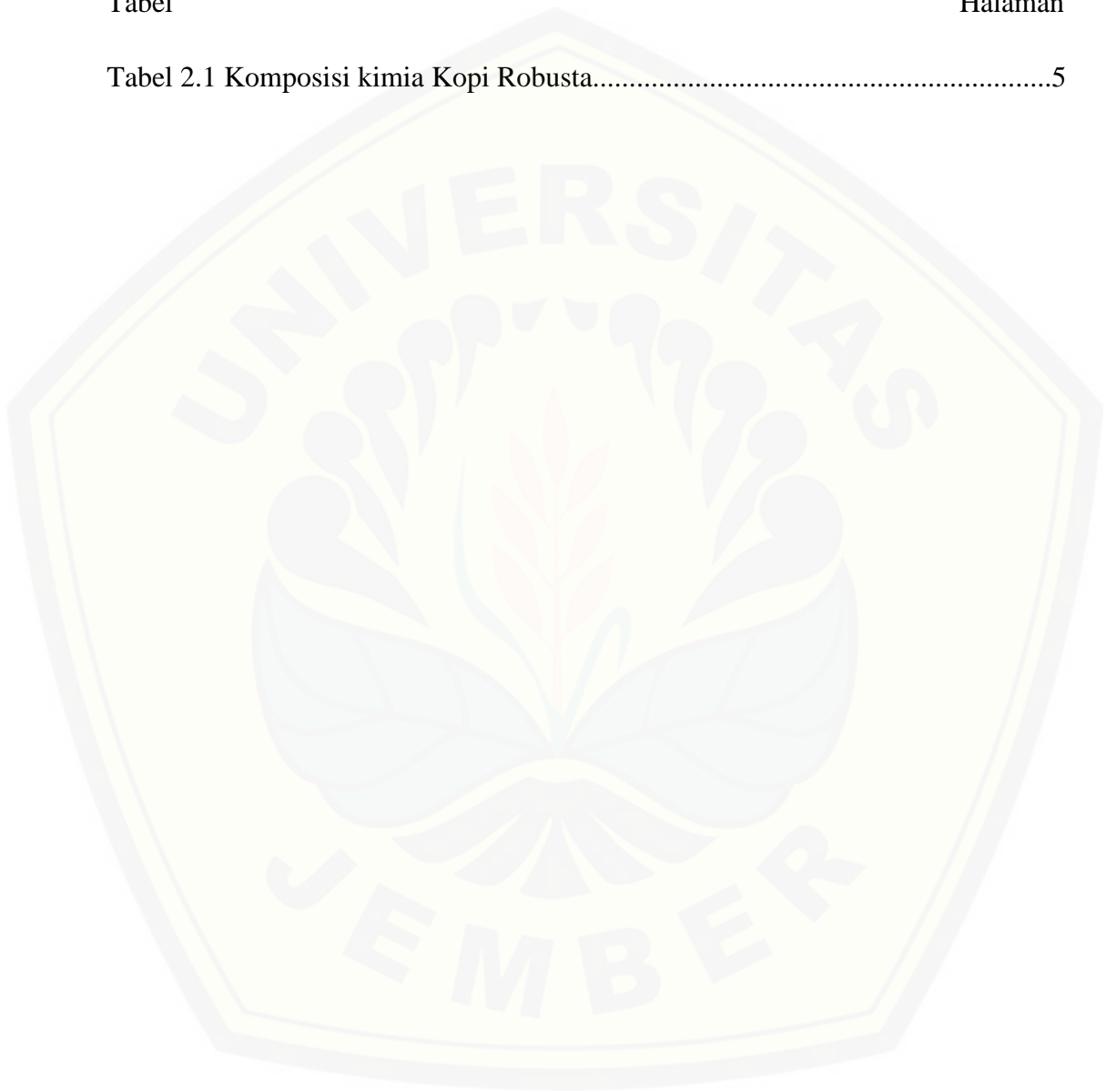
| | |
|---|-----------|
| 2.9.1 Hipotesis..... | 15 |
| BAB 3 METODE PENELITIAN..... | 16 |
| 3.1 Jenis Penelitian..... | 16 |
| 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian..... | 16 |
| 3.3 Identifikasi Variabel Penelitian..... | 16 |
| 3.3.1 Variabel Bebas..... | 16 |
| 3.3.2 Variabel Terikat..... | 16 |
| 3.3.3 Variabel Terkendali..... | 16 |
| 3.4 Sampel penelitian..... | 17 |
| 3.4.1 Sampel Penelitian..... | 17 |
| 3.4.2 besar sampel..... | 17 |
| 3.5 Alat dan Bahan..... | 17 |
| 3.5.1 Alat dan Bahan..... | 17 |
| 3.5.1 Definisi oprasional..... | 18 |
| 3.6 Prosedur Penelitian..... | 19 |
| 3.6.1 Tahap Persiapan..... | 19 |
| 3.6.2 Pelaksanaan penelitian..... | 19 |
| 3.5.1 Pengamatan..... | 20 |
| 3.7 Analisa Data..... | 20 |
| 3.8 Alur Peneltian..... | 21 |
| 3.8 Alur Peneltian..... | 21 |
| BAB 4 PEMBAHASAN..... | 22 |
| BAB 5 KESIMPULAN dan SARAN..... | 27 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 28 |
| Lampiran..... | 32 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|---|---------|
| Gambar 2.1 Kopi Robusta..... | 4 |
| Gambar 2.2 Rumus Bangun Kafein | 7 |
| Gambar 2.3 Rumus Bangun Asam Klorogenat..... | 7 |
| Gambar 2.4 Rumus Bangun Polifenol | 8 |
| Gambar 2.5 <i>Superoxide dismutate</i> (SOD)..... | 9 |
| Gambar 2.6 Gambaran Histologi Sel Fibroblas | 11 |
| Gambar 2.7 Reaksi MTT assay | 12 |
| Gambar 4.1 Diagram Batang Viabilitas Sel Fibroblas..... | 24 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|---|---------|
| Tabel 2.1 Komposisi kimia Kopi Robusta..... | 5 |



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi hitam merupakan minuman yang digemari berbagai kalangan masyarakat. Penikmat kopi di Indonesia kebanyakan menyukai kopi robusta untuk memberi energi lebih ketika bekerja terutama saat malam. Hal ini dipengaruhi oleh tingginya kandungan kafein pada kopi. Selain itu, masyarakat menyukai kopi hitam robusta rasa pahit yang telah sesuai dengan selera lidah masyarakat. Konsumen kopi hitam di Indonesia meningkat banyak hingga mencapai 255 juta pada tahun 2017. Konsumen kopi hitam tersebut sangat banyak dari kaum anak-anak maupun dewasa (AEKI, 2017).

Kopi hitam robusta memiliki berbagai macam khasiat salah satunya antioksidan. Sifat antioksidan dari kopi dikarenakan kandungan bahan aktif diantaranya seperti polifenol yang sangat bermanfaat sebagai antioksidan (Nardini *et al.*, 2002). Kandungan antioksidan lain dalam kopi antara lain asam klorogenik, trigonelin, kahweol dan kafein (Tai *et al.*, 2010; Digby *et al.*, 2010). Kandungan tersebut diperkirakan dapat memperpanjang masa hidup sel fibroblas khususnya pada rongga mulut (Yorinta *et al.*, 2013).

Fibroblas adalah sel yang sangat penting dan paling banyak pada tubuh khususnya rongga mulut. Sel ini berperan penting pada saat sintesis matriks ekstraseluler, kolagen, dan kerangka struktural. Fungsi utama fibroblas adalah menjaga integritas jaringan pendukung dengan cara mengatur perubahan umur matriks ekstraseluler secara berkesinambungan. Sel fibroblas adalah sel yang mudah melekat pada sel sekitar dan memiliki kecepatan proliferasi yang tinggi terutama fibroblas gingiva (Newman *et al.*, 2011; M. Davood, 2016). Perjalanan hidup sel fibroblas selalu melakukan metabolisme. Hasil sisa dari metabolisme adalah O_2 yang menjadi radikal bebas. Pemberian kopi hitam robusta diduga memiliki pengaruh positif terhadap kelangsungan hidup sel fibroblas. Maka perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi optimal untuk memperoleh efek positif kopi hitam robusta.

Penelitian kopi sebelumnya telah meneliti tentang uji toksisitas kopi pada sel osteoblas (Asep *et al.*, 2011), proses penyembuhan pada *post* perawatan bedah periodontal (Yorinta, 2013). Penelitian lain adalah pengaruh ekstrak kopi terhadap ekspresi *caspase-3* sel $\kappa\beta$ yang menggunakan konsentrasi 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4mg/ml (hutomo *et al.*, 2012). Penelitian tentang dosis optimal untuk memperoleh efek positif konsumsi kopi pada fibroblas gingiva manusia belum dilakukan. Oleh karena itu, penelitian dosis optimal kopi hitam robusta pada sel fibroblas gingiva manusia menggunakan konsentrasi 0,0375 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,15mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1,2 mg/ml perlu dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan sebelumnya, maka rumusan masalah penelitian ini adalah :

Berapa dosis/konsentrasi optimal untuk mempertahankan kelangsungan hidup fibroblas gingiva manusia?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimal minuman kopi hitam robusta untuk mempertahankan kehidupan sel fibroblas.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui ketahanan hidup sel fibroblas gingiva manusia pada beberapa konsentrasi kopi hitam robusta.
2. Menetapkan dosis/konsentrasi optimal kopi hitam robusta yang bermanfaat untuk mempertahankan kelangsungan hidup sel fibroblas gingiva manusia.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Meningkatkan pengetahuan tentang efek kopi hitam robusta terhadap kelangsungan hidup sel khususnya sel fibroblas gingiva manusia.
2. Sebagai landasan ilmiah untuk penelitian selanjutnya agar dapat berfungsi sebagai bahan periodontal *pack* sebagai pemercepat penyembuhan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kopi

Kopi banyak dikonsumsi oleh masyarakat di Indonesia dari muda hingga yang tua. Kopi biasa digunakan sebagai bahan minuman untuk menunjang kinerja ketika terjadi kantuk pada masyarakat. Kopi digemari karena banyak dibudidayakan di Indonesia. Kopi yang banyak dibudidayakan di Indonesia sebagian besar adalah kopi robusta karena jenis kopi ini lebih tahan dari serangan hama. Kopi robusta di Indonesia adalah kopi yang paling diterima karena rasa pahit dan sedikit rasa asam. Kopi selain sebagai minuman memiliki manfaat yang sangat baik bagi tubuh salah satunya antioksidan (Nardini *et al.*, 2002).

Sebagai antioksidan kopi dapat menangkap radikal bebas pada tubuh. Kopi memiliki berbagai kandungan antara lain mengandung kafein yang merupakan *alkoloid xantin* dan asam klorogenat yang tergolong polifenol yang memiliki manfaat antioksidan. Secangkir kopi memiliki efek antioksidan yang cukup tinggi dibandingkan dengan zat lain. kopi memiliki aktivitas antioksidan 26% dengan β -karoten 0,1%, tokoferol 0,3% dan vit. C 8,5% (F. Ana *et al.*, 2013).

2.1.1 Jenis Kopi

Kopi memiliki beberapa jenis di dunia saat ini kopi dibagi menjadi tiga golongan yaitu kopi robusta, kopi arabika, dan kopi liberika. Di Indonesia sebagian besar menanam kopi robusta, kopi arabika hanya mencapai 10% dalam produksinya. Besarnya produksi ini disebabkan kopi robusta lebih mudah ditanam pada dataran rendah maupun tinggi dan kopi robusta lebih tahan dari serangan hama. Kopi liberika ataupun kopi arabika memiliki kecenderungan mudah diserang hama dan hanya bisa ditanam pada dataran tinggi saja.

2.2 Kopi Robusta

2.2.1 Klasifikasi Kopi Robusta

Kopi merupakan buah berwarna hijau dan merah ketika sudah siap panen dengan buah yang menempel pada batang (gambar 2.1). Kopi adalah minuman yang digemari masyarakat khususnya di Indonesia. Kopi memiliki kandungan flavanoid, asam kuanin, asam klorogenik, kafein, dll yang dapat bekerja sebagai antioksidan. Selain itu, Senyawa flavanoid merupakan antioksidan yang diharapkan dapat menetralkan radikal bebas. Konsumsi kopi ini diduga memiliki pengaruh terhadap viabilitas sel fibroblas.

Sel fibroblas dalam melaksanakan aktifitas hidupnya melakukan proses metabolisme. Hasil dari metabolisme karbohidrat, protein dan lemak untuk menghasilkan energi menyisakan oksidan (O^2). Senyawa oksidan (O^2) dapat menjadi senyawa radikal atau radikal bebas yang menghambat kelangsungan hidup sel. Maka, Kopi diberikan pada sel untuk mengetahui bagaimana efeknya terhadap viabilitas sel fibroblas. Pemberian kopi dilakukan dengan konsentrasi 0,0375 g/ml, 0,075 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1,2 mg/ml dengan tujuan mengetahui berapa kadar optimal yang dapat memberikan efek positif kopi terhadap sel fibroblas. Dalam taksonomi tumbuhan, kopi robusta (*Coffea robusta*) diklasifikasikan sebagai berikut (Tanaman Obat, 2008):

| | |
|--------------|---|
| 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> |



Gambar 2.1 Kopi Robusta
(Sumber: AEIKI, 2017)

2.2.2 Kandungan Kopi Robusta

Kopi robusta merupakan minuman yang memiliki berbagai khasiat. Hal ini karena adanya berbagai zat aktif yang terkandung didalam kopi. Kopi memiliki berbagai kandungan seperti mineral, kafein, trigonelin, lemak, asam klorogenik, dan lain-lain (tabel 2.1).

Tabel 2.1 Komposisi kimia Kopi Robusta

| Kandungan | % Kopi Hitam Robusta |
|-----------------|----------------------|
| Mineral | 4,6-5,0 |
| Kafein | 2,0 |
| Trigonelin | 0,3-0,6 |
| Lemak | 11,0-16,0 |
| Asam Alifatis | 1,0-1,5 |
| Protein | 13,0-15,0 |
| Asam Humik | 16,0-17,0 |
| Asam Amino | - |
| Asam Klorogenik | 3,9-6 |

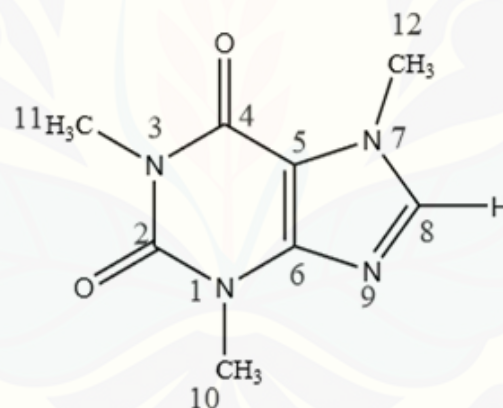
(Sumber: Clarke dan Marcræ, 1987)

Kandungan kopi memiliki berbagai karakter antara lain :

1. Kafein

Kafein yang memiliki rumus kimia $C_8H_{10}N_4O_2$, (gambar 2.2) merupakan salah satu senyawa alkaloid yang sangat penting yang terdapat di dalam biji kopi dan dimanfaatkan dalam bentuk obat maupun dalam bentuk makanan atau minuman sehari-hari yang bisa didapatkan dengan mudah (Widyotomo dan Mulato, 2014).

Tahun 2004, Badan POM mengeluarkan Surat Keputusan Kepala Badan POM No. *HK.00.05.23.3644* tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan. Keputusan ini disebutkan bahwa batas konsumsi kafein maksimum adalah 150 mg/hari dibagi minimal dalam 3 dosis. Kopi dapat mengandung 50-200 mg kafein per cangkir. Kadar *letal* kafein 100-200mg/kg berat badan. Kafein memiliki sifat antioksidan dalam tubuh akan tetapi kadar kafein yang terlalu tinggi memiliki efek apoptosis bagi sel. Uji toksikitas yang telah dilakukan, kafein pada kadar 100 µg/ml, 200 µg/ml, dan 400 µg/ml dapat mengakibatkan induksi *caspase-3* pada sel Kβ. Hari pertama dan ketiga ekspresi *caspase-3* pada konsentrasi 100 µg/ml, 200 µg/ml. Konsentrasi 400 µg/ml ekspresi *caspase-3* hanya dapat dilihat dihari pertama saja. *Caspase 3* adalah enzim yang mengatur kematian sel (Hutomo *et al.*, 2015).



Gambar 2.2 Rumus bangun kafein
(Sumber: Asep *et al.*, 2011)

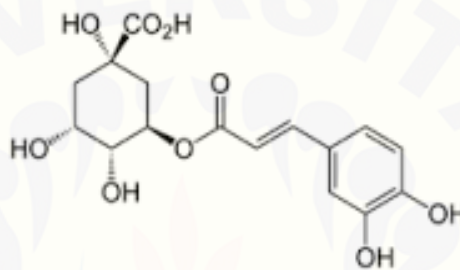
2. Asam Klorogenat

Asam klorogenat merupakan golongan ester yang dibentuk oleh asam quinat dan asam tran-sianamat. Asam klorogenat ini merupakan senyawa golongan fenil propanoid yang terdapat pada kopi dengan konsentrasi tinggi (Mahendradatta, 2007). Zat ini dibanding kafein memiliki efek fisiologis yang lebih rendah. Asam klorogenat memiliki rumus bangun $C_{16}H_{18}O_9$ (gambar 2.3).

Secangkir kopi mengandung berkisar 70-350 mg asam klorogenat. Asam klorogenat memiliki efek antioksidan yang dapat melawan ROS (*Reaktif Oksidatif*

Spesies) sehingga dapat mempertahankan struktur normal sel dan fungsinya. Penelitian sebelumnya yaitu uji aktifitas antioksidan asam klorogenat mendapatkan hasil asam klorogenat cukup baik dalam menanggulangi radikal bebas (Fe^{3+}) (Zong *et al.*, 2014).

Asam klorogenat mampu melawan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dengan cara mempertahankan struktur normal sel dan fungsinya. Asam klorogenat bekerja dengan cara masuk ke dalam agen asing dan merusak struktur dinding agen asing tersebut (Zong *et al.*, 2014).



Gambar 2.3 Rumus bangun asam klorogenat
(Sumber: Olthof *et al.*, 2001)

3. Polifenol

Polifenol merupakan antioksidan yang paling sering dibahas dalam berbagai penelitian tentang makanan dan minuman. Kandungan polifenol dalam kopi antara lain flavanoid dan tannin. Polifenol dalam sehari dikonsumsi hingga 1 gram. Sifat antioksidan dari polifenol 10 kali lebih tinggi dibandingkan vit C dan hingga 100 kali dibandingkan vit E (Pellegrini *et al.*, 2003). Polifenol sebagai antioksidan telah terbukti dalam uji aktivitas antioksidan. Polifenol terbukti dapat menanggulangi oksidan hingga berkisar 30% (Kusuma *et al.*, 2013).

4. Trigonelin

Trigonelin merupakan senyawa yang terdapat pada kopi. Trigonelin merupakan senyawa alkaloid dengan golongan *piridina*. Kandungan trigonelin pada kopi berguna sebagai anti bakteri, karena sifat trigonelin yang dapat menghambat tumbuh bakteri. Trigonelin selain sebagai antibakteri juga memiliki sifat antioksidan. Penelitian sebelumnya, senyawa alkaloid dari kopi salah satunya trigonelin dapat menjadi penghambat dari oksidan bebas.

5. Cafestol dan Kahwehol

Cafestol dan kahwehol merupakan senyawa yang terdapat pada kopi. Senyawa ini ditemui di biji kopi hingga 0,2 % - 0,6 % dari berat kopi. Senyawa ini sulit diekstrak tersendiri karena bersifat tidak stabil ketika telah terekstrak. Senyawa ini bersifat reaktif terhadap panas. Selain sifat-sifat diatas, cafestol dan kahwehol (C dan K) ini memiliki sifat antioksidan yang sangat tinggi.

Penelitian sebelumnya, sifat antioksidan dari cafestol dan kahwehol menunjukkan dapat menghambat ROS. Penghambatan ROS yang dilakukan dengan cara *in vivo* pada hewan coba tikus ini ditunjukkan dengan penghambatan COX-2 (*cyclooxygenase-2*) dan *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dengan menginduksi inhibitor *B-kompleks kinase* untuk menghambat *nuclear factor-kB* (Kyung-Ae *et al.*, 2012).

2.3 Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidansi dalam tubuh. Oksidansi merupakan reaksi kimia dari radikal bebas yang dapat memicu reaksi berantai yang dapat merusak sel. Antioksidan dapat dibagi menjadi dua golongan yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen (Abdi, 2010).

2.3.1 Antioksidan Endogen

Antioksidan endogen merupakan antioksidan yang diproduksi tubuh. Tubuh memiliki beberapa antioksidan endogen (*superoxide dismutate*) antara lain *iron superoxide dismutate* (*Fe SOD*), *manganese superoxide dismutate* (*Mn SOD*), dan *copper-zinc superoxide dismutate* (*Cu-Zn SOD*) (Eni, 2015).

2.3.2 Antioksidan Eksogen

Antioksidan eksogen merupakan antioksidan yang didapat dari luar tubuh. Antioksidan eksogen dapat diperoleh melalui berbagai cara. Antioksidan eksogen terdapat pada berbagai bahan alami ataupun buatan. Antioksidan eksogen alami antara lain minuman kopi. Kopi sebagai minuman memiliki efek antioksidan

karena memiliki kandungan asam klorogenik, flavanoid, kahweol, dan cafestol sebagai antioksidan (Eni, 2015).

2.3.3 Mekanisme Kerja Antioksidan

Antioksidan merupakan molekul yang dapat mempertahankan integritas dan fungsi sel. Hal ini disebabkan sifat antioksidan yang mudah teroksidasi oleh radikal bebas (ROS). Sifat mudah teroksidasi oleh ROS sangat berfungsi untuk menetralkan elektron bebas (kelebihan elektron) yang dimiliki oleh ROS sehingga ROS akan bersifat elektron stabil. Kekurangan antioksidan pada tubuh yang berbanding terbalik dengan banyaknya ROS dapat mengakibatkan kerusakan integritas ataupun fungsi sel. ROS di dalam tubuh dapat berfungsi sebagai molekul inisiasi dari proses apoptosis (Asri, 2014).

2.4 Radikal Bebas

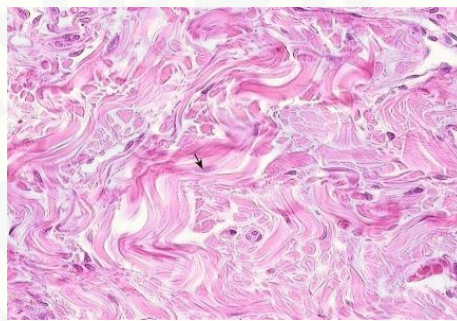
Radikal bebas adalah senyawa atau unsur yang memiliki kekurangan atau kelebihan elektron pada kulit terluarnya. Radikal bebas bersifat sangat reaktif sehingga selalu mengambil elektron dari unsur lain untuk mendapatkan kestabilan elektron untuk unsur atau molekul itu sendiri. Radikal bebas dapat berasal dari dalam maupun dari luar tubuh. Peningkatan radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya suatu keadaan oksigen reaktif atau radikal bebas yang toksik melebihi pertahanan tubuh yaitu antioksidan endogen yang mengakibatkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat mengganggu membran sel terutama yang mengandung lipid. Kerusakan membran sel mengakibatkan aktivitas biokimia dalam sel terganggu, sehingga sel tidak mampu mempertahankan kehidupannya dan lisis (Eni, 2015).

2.5 Sel Fibroblas

Fibroblas merupakan sel yang banyak didapat pada jaringan ikat terutama pada kulit dan rongga mulut. Sel fibroblas terlibat secara aktif dalam pembentukan serat terutama serat kolagen dan matriks amorf ekstraseluler. Fibroblas sangat berperan penting dalam pertumbuhan normal, proses penyembuhan luka dan aktifitas fisiologis dari tiap jaringan. Pada rongga mulut fibroblas sangat penting untuk menjaga mukosa, jaringan penyangga gigi, dan lain-lain. Fungsi utama fibroblas adalah menjaga integritas jaringan pendukung

dengan cara mengatur perubahan umur matriks ekstraseluler secara berkesinambungan. Sel fibroblas mudah untuk dikultur karena memiliki kemampuan tumbuh dan melekat yang tinggi pada sel sekitar dan regenerasi cepat (Freshney RI, 2005).

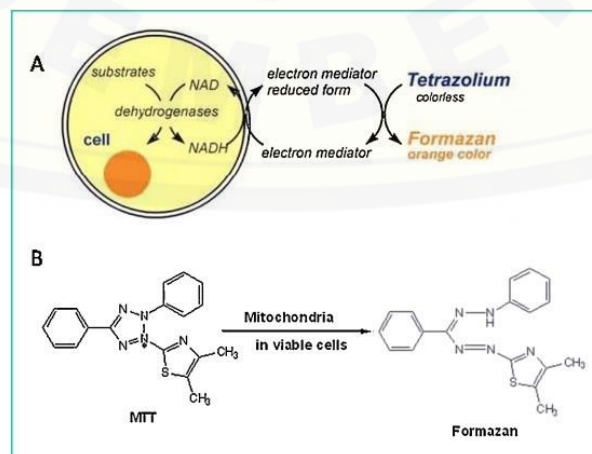
Fibroblas merupakan sel yang memiliki inti sebagai pedoman perhitungan jumlah sel. Pada saat proses *MTT assay* setiap sel fibroblas akan mengalami krisalisasi setiap intinya, sehingga dapat terhitung pada proses perhitungan menggunakan *Ellisa reader* (Crcc, 2013)



Gambar 2.4 Gambaran histologi sel fibroblas
(Sumber: Leson, 1996)

2.6 *MTT assay*

MTT assay merupakan metode dalam penelitian mengenai agen antikanker. Metode ini juga digunakan untuk melakukan uji sitotoksitas sampel atau suatu bahan penelitian pada kultur sel. Kultur sel penelitian ini yang digunakan adalah sel fibroblas. Prinsip metode *MTT assay* adalah reaksi redoks yang terjadi di dalam sel (gambar 2.5).



Gambar 2.5 Reaksi *MTT assay*

Sumber: sinedirect

Bahan MTT assay (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) direduksi menjadi garam formazan (kristal formazan) oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat di dalam mitokondria sel hidup. Reaksi dibiarkan terjadi selama 2-4 jam kemudian ditambahkan reagen stopper. Reagen stopper tersebut akan melisis membran sel sehingga garam formazan dapat keluar dari sel, serta melarutkan garam formazan tersebut. Garam formazan yang terbentuk dikuantifikasi dengan spektrofotometer dan diukur dalam bentuk absorbansi menggunakan *ELISA reader*. Semakin tinggi absorbansi, semakin banyak sel yang hidup (viabilitas sel tinggi) (CRCC, 2009).

2.7 Bioaviabilitas / Kelangsungan Hidup Sel

Sel dalam menjaga kelangsung hidup selalu melakukan proliferasi atau pembelahan sel. Siklus pembelahan sel terbagi menjadi dua fase fungsional yaitu interfase dan mitosis. Interfase adalah fase dimana sel tumbuh dan bersiap untuk membelah. Interfase adalah fase istirahat atau jeda panjang antar satu mitosis dengan yang lain. Fase ini terbagi menjadi tiga fase, yaitu G1, S dan G2 (Andreeff, 2010):

1. Transisi G0 ke G1

Fasa transisi dari fase G0 ke fase G1 disebut fase prima atau fase kompetensi replikatif, fase prima dipicu oleh sekresi sitokina IL-6 dan TNF- α oleh sel Kupffer yang menyebabkan hepatosit kehilangan sebagian massanya. Potensi proliferasi hepatosit setelah kehilangan sebagian massanya. Berbagai protein disintesis pada fase G1 setelah sel meninggalkan fase G0, beberapa ribosom baru dibuat untuk mempercepat sintesis protein. Protein diantara dihasilkan berupa enzim untuk mengembalikan fungsi metabolik yang hilang saat sel berada pada fase G0, seperti enzim yang dibutuhkan untuk sintesis isoprenoid, zat yang diperlukan untuk aktivitas onkogen Ras dan sintesis poliamina, yang mempunyai banyak fungsi termasuk menyediakan ikatan ionik dengan asam nukleat. Onkogen Ras disintesis sebagai protein prekursor dan membutuhkan proses paska-translasi sebelum dapat menjadi aktif dan melakukan transformasi sel. Enzim lain yang berperan dalam

sintesis DNA, seperti timidina kinase, DNA polimerase dan histon juga dihasilkan ribosom pada fase G1.

2. Transisi ke fase S

Transisi ke fase S dari fase G1 dikendalikan oleh dua buah cekpoin, yaitu "kompetensi" dan "restriksi" yang terletak sekitar 12 dan 2 jam sebelum fase S dimulai. Paling tidak diperlukan tiga faktor pertumbuhan untuk melewati dua cekpoin ini, yaitu PDGF, EGF dan IGF-1.

Pengenal faktor pertumbuhan merupakan protein kompleks yang terbentuk seluas membran sel dengan domain yang dapat mengenali faktor pertumbuhan di dalam periplasma dengan sangat khusus. Ligasi yang terjadi dengan ligan akan menginduksi transmisi sinyal ke dalam sitoplasma melalui aktivasi enzim tirosina kinase. Sinyal sitoplasmik yang disebut *second messenger* "kurir sekunder", dapat berupa berbagai protein yang telah mengalami fosforilasi oleh enzim kinase, seperti molekul kecil inositol fosfatase dan AMP; atau ion, seperti Ca^{2+} , H^+ , dan Zn^{2+} ; kemudian diteruskan oleh menuju inti sel. Di dalam inti sel, gen kemudian teraktivasi sebagai respon terhadap "kurir sekunder" ini.

3. Fase S

Pada fase S beberapa aktivator (bahasa Inggris: multiple points of origin) diperlukan sebagai persiapan untuk memasuki fase S guna melakukan replikasi DNA, pada prokariota, hanya terdapat aktivator tunggal. Fasa S dimulai dengan terjadinya paparan pulsa (bahasa Inggris: pulse exposure) dengan $[^3\text{H}]$.timidina pada sel, kemudian terjadi paparan lanjutan (bahasa Inggris: chase procedure) nonradioaktif dengan timidina "dingin". Kedua prosedur tersebut menghasilkan beberapa titik replikasi yang mulai tampak terjadi pada beberapa kromosom pada rantai ganda DNA.

Rantai ganda DNA memisahkan diri menjadi dua untai tunggal, sehingga tampak seperti garpu. Sintesis untai DNA yang baru terjadi, dengan dimulai oleh molekul primer, atau molekul oligonukleotida pendek, dan diikuti oleh molekulmolekul lain dengan enzim DNA polimerase, membentuk rantai ganda

DNA yang baru. Molekul primer itu disebut RNA primer, yang disintesis dengan enzim RNA polimerase atau dikenal sebagai enzim primase, dari RNA tertentu yang bersifat komplemen dengan salah satu area kromosom pada untai DNA. Primosom merupakan sebutan bagi seluruh kompleks yang berikatan dengan RNA primer. Polimerisasi untai DNA yang baru bergerak dari tiap-tiap primosom pada titik 5' untai baru ke titik 3' untai baru.

Untai baru yang bergerak dengan arah dari titik 3' untai induk ke 5' untai induk disebut untai awal, sedang untai baru yang bergerak sebaliknya disebut untai akhir. Untaian DNA baru dari RNA primer hingga tepat sebelum RNA primer berikutnya disebut fragmen Okazaki, sesuai nama ilmuwan Reiji Okazaki yang pertama kali berhasil mengamati proses polimerasi pada replikasi DNA. Saat polimerasi untai DNA yang baru menyentuh RNA primer pada fragmen Okazaki berikutnya, aktivitas eksonuklease enzim DNA

polimerase akan menghancurkan RNA primer pada fragmen tersebut untuk meneruskan untai polimernya hingga menyentuh untai polimer berikutnya, setelah itu enzim DNA ligase akan menyambung kedua untai polimer itu menjadi satu. Titik 5' merupakan letak gugus 5' fosfat, sedang titik 3' merupakan letak gugus 3' OH dari molekul gula deoksiribosa. Ikatan yang terjadi antara kedua gugus ini disebut ikatan fosfodiester. Polimerasi untai DNA yang baru terhenti hingga bagian ujung kromosom yang disebut telomer. Enzim telomerase akan menyambung untaian tersebut dengan deretan molekul RNA sebagai penanda antar kromosom. Pada manusia, berkas yang disisipkan antar kromosom adalah TTAGGG. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa rentang telomer pada manusia lambat laun menjadi lebih pendek dengan pertambahan usia, pengamatan ini membuahkan teori penuaan telomer yang masih diteliti hingga saat ini.

4. Fasa Mitosis (M)

Interval waktu fase M kurang lebih 1 jam. Tahap di mana terjadi pembelahan sel (baik pembelahan biner atau pembentukan tunas). Pada mitosis, sel membelah dirinya membentuk dua sel anak yang terpisah. Dalam fase M terjadi beberapa jenjang fase, yaitu:

1. Profase: Penebalan kromosom
2. Prometafase: Kromatid pindah ke ekuator
3. Metafase: Kromosom berbaris di bidang tengah sel
4. Anafase: Kromosom tertarik ke kutub yang berbeda
5. Telofase: membran inti dan sitoplasma terbentuk kembali dan sel mulai membelah

Kelangsungan hidup sel adalah bagaimana sel dapat bertahan hidup pada kondisi tertentu biasanya dilihat dari perbandingan jumlah sel yang mati dan hidup ataupun kecepatan sel berproliferasi. Sel secara fisiologi selain membelah diri (proliferasi) sel juga melakukan metabolisme sel untuk memenuhi energi yang dibutuhkan sel untuk beraktifitas, mempertahankan hidup, atau berproliferasi hasil dari metabolisme glukosa adalah sebagai berikut:

- a) Anaerobik : $\text{Glukosa} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} + 2\text{NAD}^+ \longrightarrow 2 \text{ piruvat} + 5 \text{ O}_2$
(ROS) + 2 ATP + NADH + 2 H⁺ (ROS) + 2 H₂O
- b) Aerobik : $2 \text{ piruvat} + 5 \text{ O}_2$ (ROS) + 2 ATP + NADH + 2 H⁺ + 2 H₂O
 $\longrightarrow 6 \text{ CO}_2 + 30 \text{ ATP} + 34 \text{ H}_2\text{O}$

Hasil sisa yang terdapat pada proses metabolisme menyebabkan ROS. Tubuh juga mempertahankan keadaan dari ROS menggunakan SOD (*superoxide dismutate*). SOD sangat berfungsi bagi tubuh sehingga tubuh dapat mempertahankan keutuhan sel dari ROS (Eni, 2015). Kelangsungan hidup sel dapat dipengaruhi zat-zat dari luar tubuh. Zat dari luar tubuh dikatakan aman bagi kelangsungan hidup sel apabila sel hidup yang dihitung melebihi IC₅₀ (*inhibitory concentration 50%*) atau sel hidup lebih dari 50% dibandingkan kontrol. IC₅₀ adalah istilah yang dipakai dalam bidang penelitian obat atau penelitian *in-vivo* yang dihidung menggunakan regresi persentase viabilitas sel dan diteliti menggunakan MTT assay (Ulfah, 2013).

Viabilitas sel dapat dipengaruhi faktor internal dan eksternal. Faktor internal yang berpengaruh antara lain sifat ketahanan hidup sel terhadap zat dari luar sel maupun sisa metabolisme sel, kemampuan sel untuk berproliferasi dipengaruhi

growth factor, dan kemampuan untuk mematikan diri atau apoptosis. Faktor eksternal yang mempengaruhi antara lain zat-zat yang diberikan ada kultur sel fibroblas (Hilma, 2017). Pada siklus hidup normal sel perlu melakukan apoptosis hal ini dilakukan untuk menjaga jumlah sel tidak terjadi pertumbuhan yang berlebih.

2.8 Apoptosis

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel yang terprogram dan merupakan proses penting dalam fenomena biologis. Apoptosis yang terlalu banyak dapat menyebabkan sel mengalami kekacauan dan terlalu sedikit apoptosis juga menyebabkan proliferasi sel yang tidak terkontrol (hiperplasia). Apoptosis bisa terjadi melalui mekanisme yang kompleks. Menurut Restu *et al* (2011) mekanisme apoptosis secara garis besar dapat dibagi menjadi 4 tahap, antara lain:

1. Signal penginduksi apoptosis.

Proses apoptosis tidak memerlukan proses translasi ataupun transkripsi. *Molecular machine* yang dibutuhkan untuk kematian sel dianggap mengalami dormansi dan hanya memerlukan aktivasi yang cepat. Signal yang menginduksi apoptosis bisa berasal dari intraseluler. Signal intraseluler misalnya radiasi ionisasi, kerusakan karena oksidansi radikal bebas (ROS), dan gangguan pada siklus sel. Signal ini direspon sel dan mengaktifkan caspase.

2. Tahap integrasi atau regulator apoptosis.

Regulator molekuler dari signal apoptosis merupakan pelaksanaan apoptosis oleh tahap integrasi atau pengaturan molekul regulator positif atau negatif yang dapat menghambat, memacu, mencegah apoptosis sehingga menentukan apakah sel tetap hidup atau mengalami apoptosis.

Regulator apoptosis diperantarai oleh famili protease yang disebut caspase, yang diaktifkan melalui proteolisis dari bentuk prekursor inaktifnya (zymogen). Caspase merupakan endoprotease yang memiliki sisi aktif Cys (C) dan membelah pada terminal C pada residu Asp. (*Asparatatespesific*), oleh karena itu dikenal sebagai Caspases (*Cysteine-containing Asp. specific protease*).

Perubahan dalam apoptosis terjadi ketika caspase membelah protein, protein yang dibelah adalah protein yang berfungsi pemeliharaan morfologi sel. Protein yang dibelah membelah actin filamen di dalam sel. Proses apoptosis memerlukan protein lain, yaitu suatu kinase yang disebut *p21-activated kinase 2* (PAK-2). Kinase ini diaktifkan oleh caspase-3.

3. Tahap pelaksanaan apoptosis.

Perubahan gradien proton terjadi dan menyebabkan oksidasi dan fosforilasi di mitokondria perubahan kekuatan ion menyebabkan pembekakan matriks. Hal ini menyebabkan rusaknya dinding sel, sehingga sitokrom c dan Apaf-1 keluar masuk sitoplasma. Jalur ini biasa diaktifkan dalam respon stimulus letal yang lain seperti pengrusakan DNA, stress oksidatif, dan hipoksia.

Faktor proapoptosis seperti sitokrom c dan AIF (*apoptosis inducing factors*) pada mitokondria. Faktor ini ketika dilepaskan oleh mitokondria akan mengaktifasi caspase. Sitokrom c adalah protein heme yang berperan sebagai pembawa elektron yang larut dalam air dalam fosforilasi oksidatif mitokondria yang menyebabkan adanya gelombang matriks. Saat membran dalam mitokondria memiliki permukaan yang lebih luas dibanding membran luar maka gelombang matriks menyebabkan *nonspecific inner membrane permeability transition pore* terbuka sehingga sitokrom c keluar ke sitoplasma kemudian berikatan dengan Apaf-1 membentuk CARD (Caspase Recruitment domain). Hal ini mengakibatkan teraktifasinya Caspase.

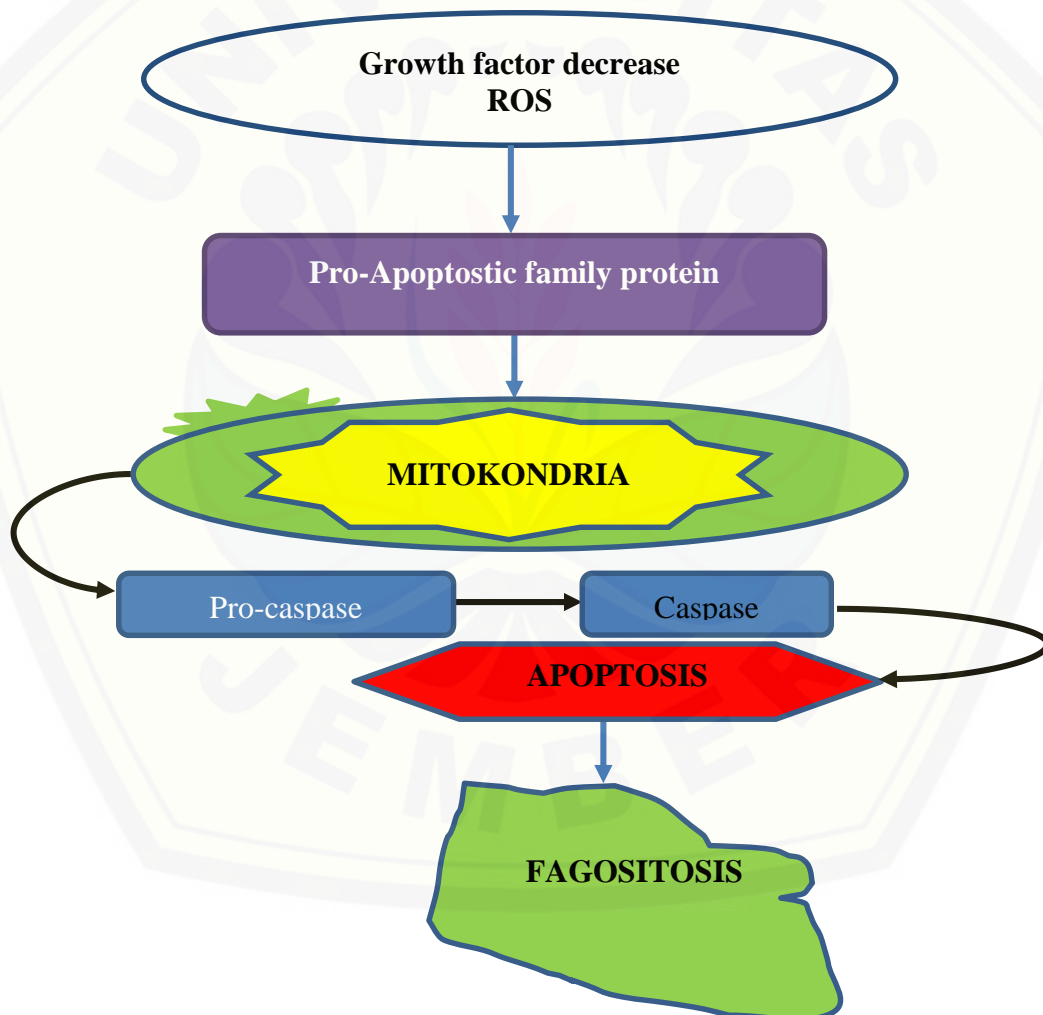
Caspase memecah protein menyebabkan inti sel pecah. Protein yang merupakan target caspase biasanya terikat dengan protein lain, yaitu sebuah DNA endonuklease. Saat protein pecah, DNase bebas bermigrasi ke nukleus dan memecahnya. Perubahan membran terjadi saat caspase 3 memecah gelsolin, suatu protein yang terlibat dalam pemeliharaan morfologi sel. Gelsolin yang terpecah akan membelah filamen aktin di dalam sel. Caspase 3 juga mengaktifasi kinase yang disebut *p21-activated kinase 2* (PAK 2) melalui proteolisis. PAK2 termasuk protein yang dibutuhkan dalam membentuk apoptotic body.

4. Fagosit.

Proses fagosit sel yang terfragmentasi menjadi apoptotic body mengeluarkan signal “eat me” yang dikenali oleh fagosit. Ada 2 macam fagosit, yaitu :

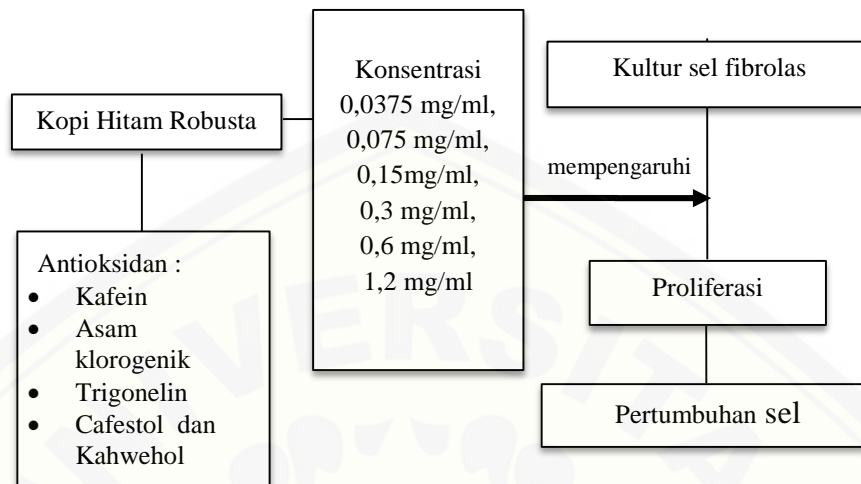
- a. Fagosit professional, contohnya sel makrofag.
- b. Fagosit semiprofesional, sel tetangga dari sel yang mengalami apoptosis.

Sel-sel fagosit ini dapat menjamin tidak timbulnya respon inflamasi setelah terjadinya apoptosis. Sel fagosit juga harus dihilangkan setelah aktif bekerja. Sel imun aktif mulai mengekspresikan Fas beberapa hari setelah aktivasi, mentargetkannya untuk eliminasi.



Gambar 2.6 Mekanisme Apoptosis
Sumber CCRC 2009

2.9 Kerangka Konseptual



Gambar 2.6 Kerangka Konseptual

2.10.1 Hipotesis

Proliferasi pada konsentrasi yang lebih tinggi akan lebih tinggi proliferasi sel fibroblasnya dibanding konsentrasi lainnya.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimen laboratoris dengan rancangan pengamatan *Experimental Laboratoris Post-test Control Group Design* yaitu mengambil data sehari setelah perlakuan. Dengan pengujian uji beda hasil perlakuannya dibandingkan dengan kontrol.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada untuk proses kultur jaringan fibroblas, pemberian kopi hitam robusta, dan perlakuan *MTT assay*.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2017.

3.3 Identifikasi Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah kopi hitam robusta dari PTPN XII Jember dengan konsentrasi 0,0375 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,15mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1,2 mg/ml.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah viabilitas yang dilihat dari proliferasi sel fibroblas.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dari penelitian ini adalah :

1. Alat dan bahan
2. Media
3. Pemberian Kopi Hitam Robusta sebanyak 1ml pada konsentrasi yang telah ditentukan dengan frekuensi satu kali sehari selama 1hari.
4. Lingkungan yang sama antar media dan kultur.

5. Pemanenan yang sesuai dengan metode yang ditentukan yaitu hari pertama. Dilakukan bersamaan antara kultur satu dan lainnya.

3.4 Sampel Penelitian

3.4.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian memiliki kriteria sebagai berikut :

1. Kriteria Inklusi

Asal sel fibroblas manusia dari gingiva manusia dan tidak mengalami diferensiasi serta tidak terkontaminasi. Menggunakan bahan (media, bahan uji, dan lingkungan) yang sesuai dengan ketetapan.

2. Kriteria Eksklusi

Media terkontaminasi oleh bahan lain, perlakuan tidak sesuai prosedur yang telah ditentukan, dan waktu pemanenan kultur yang berbeda.

3.4.2 Besar Sampel

Besar sampel pada penelitian ini diambil menurut rumus:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

n = Besar sampel tiap kelompok

σ = Standar deviasi sampel

d = Kesalahan yang masih dapat ditolerir

z = Nilai pada tingkat kesalahan tertentu, jika $\alpha = 0,05$ maka $z = 1,732$ dengan asumsi $\sigma = d$ maka:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan : $n = z^2$

$$n = (1,732)^2$$

$$n = 2,9999824 \approx 3 \text{ (Daniel, 2005)}$$

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat dan Bahan Penelitian

- a. Alat pemindahan kultur fibroblas ke dalam *96-well plate*

Gunting, *syringe*, *petridish*, gelas preparat, inkubator CO₂ atau *anaerobic gas pack* 5%, mikroskop *Inverted*, tabung sentrifugasi, *conical tube*, counter, Flask kultur.

b. Alat dan bahan untuk tahap *MTT assay* dan penghitungan sampel.

Mikropipet 200 dan 1000 µl, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, *96-well plate*, *conical tube*, pinset, gelas preparat, alat tulis, *yellow tip* dan *blue tip*, *ELISA reader*.

c. Bahan Penelitian

1. Bahan kultur fibroblas

Sel fibroblas dari potongan gingiva manusia yang menempel pada pencabutan gigi.

2. Bahan untuk tahap *MTT assay* dan penghitungan sampel.

Aquades steril, *phosphat buffer saline* (PBS) sebagai media kultur, DMEM (*dulbecco's modified eagle medium*), DMSO (dimetil sulfoksidan), 5mg/ml larutan *solvent* (50 mg *MTT assay* dan 10 ml PBS), SDS 10% (*Sodium Dodecyl Sulphate*) dalam 0,1 N HCl, *Tissue*, aluminium foil.

3.5.2 Definisi Operasional

1. Kopi

Kopi yang digunakan adalah kopi yang merupakan bahan dasar minuman yang berupa bubuk dari produksi PTPN XII Jember. Kopi ini dicampur dengan bahan PBS dan dilakukan peneteskan pada kultur fibroblas dengan dosis 1 ml kadar 0,0375 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,150 mg/ml, 0,30 mg/ml, 0,60 mg/ml, 1,2 mg/ml. Kopi diberikan sekali pada hari pertama.

2. Kultur sel fibroblas

Jaringan fibroblas yang diambil dari jaringan gingiva fibroblas sisa pencabutan gigi yang telah dikultur pada media yang telah dikalibrasi sesuai laboratorium parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada. Kultur sel dipanen pada satu hari setelah perlakuan.

3. Viabilitas sel

Viabilitas sel merupakan kemampuan sel yang dapat bertahan hidup terhadap suatu bahan. dilihat dari jumlah sel atau proliferasinya dibandingkan dengan kontrol.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Tahap Persiapan

1. Tahap Pemindahan Kultur Sel fibroblast kedalam *96-well plate*

Kultur sel fibroblas diperoleh dari laboratorium parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada. Panen dilakukan setelah 80% konfluen. Sel fibroblas diambil dari inkubator CO₂ setelah itu media dibuang dengan menggunakan mikropipet pada *petridish*, cuci dengan PBS steril, dan ditambahkan tripsin 0,25% sebanyak 1ml secara merata untuk melepaskan sel dan kemudian diinkubasi dalam inkubator CO 5%, pada suhu 37°C selama 3-5 menit. Selanjutnya, media kultur dimasukan sebanyak $\pm 2-3$ ml untuk menginaktif tripsin. Sel diresuspensi dengan pipet sampai semua terlepas satu-satu (tidak menggerombol). Sel diamati keadaanya dibawah mikroskop (resuspensi kembali jika ada sel menggrombol). Sel ditransfer kedalam *conical cube* baru. DMEM ditambahkan sebanyak $\pm 2-3$ ml. Sel diresuspensi kembali. Panenan sel diambil 10 μ l dan dipipetkan di hemasitometer. Sel dihitung pada mikroskop *inverted* dengan *counter*. Jumlah sel yang dihitung per ml didapatkan melalui rumus (CCRC, 2009).

2. Tahap Persiapan kopi

Kopi yang digunakan adalah kopi robusta dari PTPN XII Jember. Kopi dicampur PBS sebagai media tanam dan perlakuan kultur sel fibroblas. Kopi dicampur hingga mendapat konsentrasi sebagai berikut 0,0375 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1,2 mg/ml.

3.6.2 Pelaksanaan Penelitian

Teknik Perlakuan sel fibroblas yang telah ditanam pada media yang ditentukan lalu diberi label sesuai perlakuan masing-masing. Kemudian dilakukan pemberian kopi hitam robusta sesuai perlakuan yang sebelumnya ditentukan sejumlah 1 ml. Dilakukan pemberian perlakuan pada hari pertama. Pengambilan sel

dilakukan pada hari pertama setelah perlakuan untuk dapat dilihat ketahanan hidup sel fibroblas.

3.6.3 Pengamatan

Pengamatan dilakukan menggunakan metode *MTT assay* (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) yang telah distandarisasi oleh laboratorium parasitologi UGM. Pertama sel diambil dari inkubator CO₂, kondisi sel fibroblas diamati apakah telah memenuhi syarat panen. Panen sel dan hitung jumlah sel dan buat pengenceran sel dengan media kultur sesuai kebutuhan. Sel dipindahkan ke dalam sumuran, masing-masing 100 µl. Tiga sumuran kosong disisakan tidak diisi sel. Keadaan sel diamati dengan mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel apakah telah merata. Sel diinkubasi pada inkubator CO₂ selama semalam (agar sel pulih kembali setelah panen) dan untuk memastikan sel dalam keadaan hidup sebelum perlakuan.

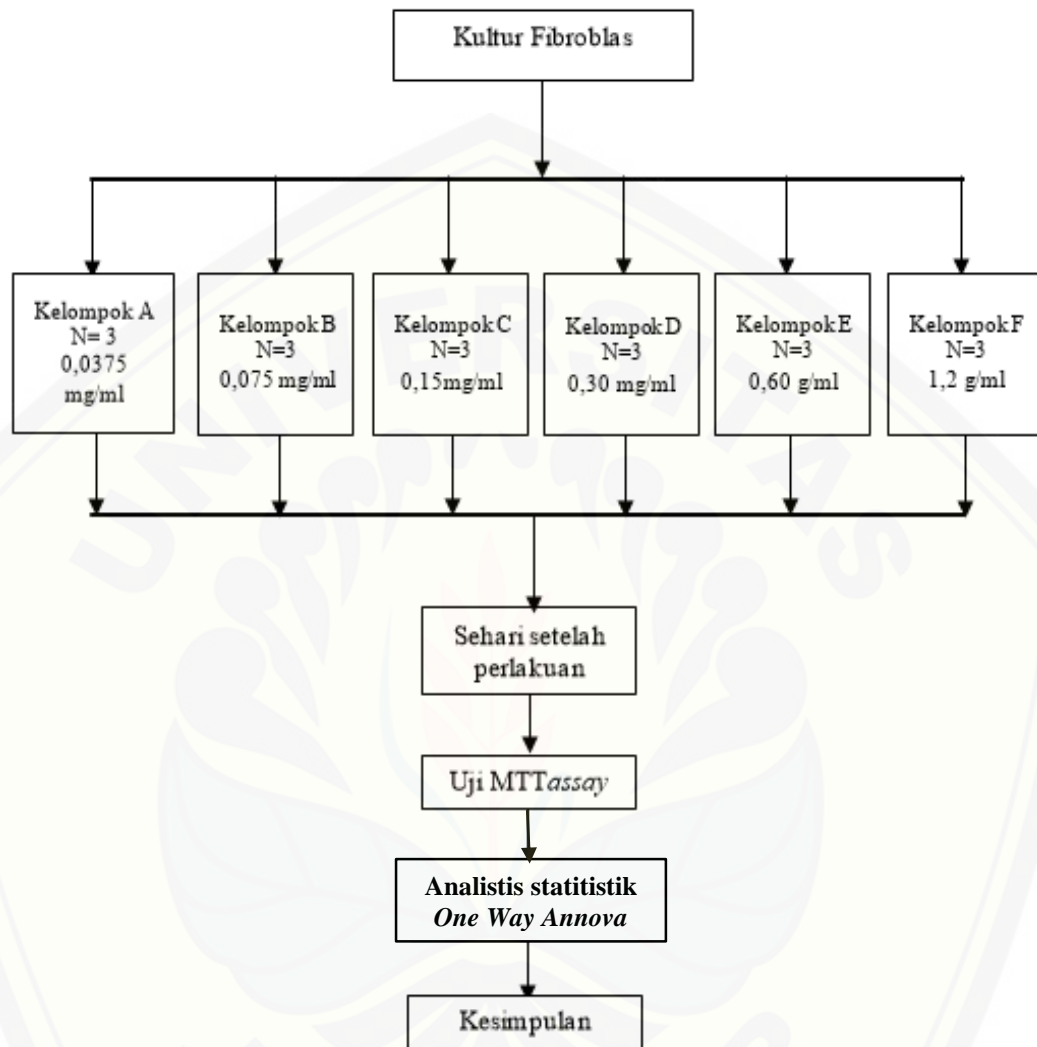
Sel yang telah siap diberi perlakuan sesuai kriteria konsentrasi sampel yang telah ditentukan. Sel selanjutnya diinkubasi selama 24 jam setelah perlakuan. Setelah perlakuan, *96-well plate* yang telah berisi sel diambil dari inkubator CO₂. Buang media sel (balikkan plate 180°) di atas tempat buangan dengan jarak 15 cm, kemudian tekan *96-well plate* secara perlahan di atas tissue untuk meniriskan sisa cairan. Masukkan 100 µl PBS ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian buang PBS dengan cara membalik plate. Cairan sisa dilakukan penirisan dengan tisu. Menjelang akhir waktu inkubasi, dokumentasikan kondisi sel untuk setiap perlakuan. *MTT assay reagen* disiapkan untuk perlakuan (0,5 mg/ml) dengan cara ambil 1 ml stok *MTT assay* dalam PBS (5 mg/ml) dan diencerkan menggunakan media kultur 10 ml. Media sel dibilas PBS dengan cara seperti cara sebelumnya, dan ditambahkan reagen *MTT assay* 100 µl ke setiap sumuran, termasuk media (tanpa sel). Sel diinkubasi selama 2-4 jam di dalam inkubator CO₂. Periksa kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan *stopper* 100 µl (SDS 10% dalam 0,1 N HCl).

3.7 Analisa Data

Penelitian ini menghasilkan data kuantitatif berupa hasil jumlah dan presentase sel hidup dan sel mati. Analisis dalam penelitian ini menggunakan metode uji normalitas *Kolmogorof smirnov*, homogenitas *levene Test* dan dilanjutkan uji beda *One-way Annova*.



3.8 Alur Penelitian



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

2.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan tentang bioviabilitas sel fibroblas diperoleh dosis optimal kopi hitam robusta adalah 0,15 mg/ml dengan viabilitas sel 113%.

2.2 Saran

Dari hasil penelitian disarankan bahwa:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang antioksidan terhadap viabilitas sel fibroblas.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh kopi hitam robusta dengan berberapa toleransi waktu.\
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh kopi hitam robusta terhadap viabilitas sel menggunakan penanda pada sel utama perlakuan untuk mengetahui apakah umur sel dapat diperpanjang oleh kopi hitam robusta.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kopi hitam robusta dapat mempercepat penyembuhan.

Daftar Pustaka

- Astuti S. 2013. *Kadar peroksidan lipid dan aktivitas superoksidan dismutase (SOD) testis tikus yang diberi tepung kedelai kaya isoflavon, seng (Zn), dan vitamin E*. Bandung.
- ABDI. 2010. *Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif Dan Peranannya Dalam Sistem Biologis*. Jurnal Belian Vol. 9 No. 2. Pontianak.
- AEKI [Asosiasi Eksportir Kopi Indonesia]. 2017. *Konsumsi Kopi di Indonesia*. www.aekiaice.org/page/konsumsi-kopi-domestik/id.
- Al-Farabi, Makhyan Jibril. 2013. *Antibodi terhadap Advanced Glycation End Pro – Cara Mutakhir Pencegahan Komplikasi Diabetes Melitus*. Jurnal CDK-210/vol.40 no.11. Malang: Universitas Brawijaya – Fakultas Kedokteran – Rumah Sakit Syaiful Anwar.
- Amin, Rejo. 2013. *Karakteristik Mutu Biji Kopi Pada Proses Dekafeinisasi*. Vol. 5. Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya, Palembang.
- BPOM. 2004. *Surat Keputusan BPOM HK.00.05.24.3644*. Jakarta.
- Chatarina *et al.* 2017. *Aktifitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Pandan dan Fraksi-fraksinya*. Yogyakarta.
- Chaudhry, Shazia S., Cain, Stuart A., Morgan, Amanda., Dallas, Sarah L., Shuttleworth, C Adrian., Kielty, Cay M. 2016. *Fibrilin-1 Regulates the Bioavailability of TGFβ1*. Jurnal. Manchester: University of Manchester.
- Deshpande NN, Sorescu D, Seshiah P. 2014. *Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle*. *Antioxid Redox Signal*. 4:845–854.
- Doyle, A., dan Griffiths, J.B. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. John Wiley & Sons, Chichester. UK.
- Eni Widayati. 2015. *Oxidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioksidan*. Semarang.
- Farah, Adriana., Paulis, Tomas De., Trugo, Luiz C., Martin, Peter R. 2014. *Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee*. *Jurnal Agricultural and Food Chemistry*.
- Fawcett, Don W. *Buku Ajar Histologi Ed.12*. Alih bahasa oleh Jan Tambayong. 2002. Jakarta: EGC.

- Freshney RI. 2010. *Culture of animal cells: a manual of basic tehniqe*. 7th ed. Willeyand Son, Inc.
- Filberta., Koleangana, Harry S J., Runtuwenea, Max R J., Kamua, Vanda S. 2016. *Penentuan Aktivitas Antioksidan Berdasarkan Nilai IC50 Ekstrak Metanol dan Fraksi Hasil Partisinya pada Kulit Biji Pinang Yaki (Areca Vestiaria Giseke)*. Jurnal MIPA UNSRAT.
- Higgins, Larry G., Cavin, Christophe., Itoh, Ken., Tamamoto, Masayuki. Hayes, John D. 2007. *Induction of Cancer Chemopreventive Enzymes by Coffee is Mediated by Transcription Factor Nrf2 – Evidence that the Coffee-Specific Diterpenes Cafestol and Kahweol Confer Protection Against Acrolein*. Jurnal *Toxicology and Applied Pharmacology*.
- Hutomo, Suryani., Suryanto, Yanti Ivana., Susilowati, Heni., Phym, Agustinus Rudolf., Mahaswara, Devi Chrestella. 2016. *Ekspresi Caspase-3 pada Sel Epitel Rongga Mulut (KB Cell Line) setelah Paparan Ekstrak Kopi*. Jurnal. Yogyakarta: Universitas Kristen Duta Wacana – Fakultas Kedokteran.
- Kanokwan Kiattisin, Thananya Nantarat and Pimporn Leelapornpisid. 2016. *Green tea extract and epigallocatechin 3-gallate reduced labile iron pool and protected oxidative stress in iron-loaded cultured hepatocytes*. Thailand.
- Kawano. 2011. *Kafein dalam Meningkatkan Efek anti-Tumor Cisplatin pada Human Hepatocellular Carcinoma Cells*.
- Kenisa, Yorinta Putri., Istiati., J, Wisnu Setyari. 2013. *Effect of Robusta Coffee Beans Ointment on Full Thickness Wound Healing*. Jurnal Dental Journal vol.45 No.1. Surabaya: Universitas Airlangga – Fakultas Kedokteran Gigi.
- Kurniawan, B. 2013. *Berbagai Macam Kopi di Dunia*. Makalah. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Kurniawati, Yuli., Adi, Sudigdo., Achadiyani., Suwarsa, Oki., Erlangga, Dimas., Putri, Tenny. 2015. *Kultur Primer Fibroblas: Penelitian Pendahuluan*. Jurnal MKA Volume 38 Nomor 1. Diakses online di <http://jurnalmka.fk.unand.ac.id>
- Leeson. 1996. *Buku Ajar Histologi*. Jakarta: EGC.
- Mangiwa, Septiani., Futwembun, Alowisya., Awak, Puteri M. 2016. *Kadar Asam Klorogenat (CGA) dalam Biji Kopi Arabika (Coffea Arabica) Asal Wamena Papua*. Jurnal Ilmiah Pendidikan Kimia “Hydrogen” Vol.3 No.2 ISSN 2338-6480. Papua: Universitas Cenderawasih.

- Nakazato T, Ito K, Miyakawa Y, Kinjo K, Yamada T, Hozumi N, Ikeda Y, Kizaki M. 2005. *Catechin, a green tea component, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells via modulation of reactive oxygen species production in vitro and inhibits tumor growth in vivo*. The hematology Journal. 90(3): 317–25
- Nardini (2002). *Absorption of Phenolic Acids in Humans After Coffee Consumption*. *J Agric Food Chem.*,50: 5735–5741.
- Natalia, Fransiska. 2016. *Efek Hepatoproteksi Kopi*. Jurnal CDK-239/vol.43 no.4. Jakarta: Universitas Indonesia – Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Ochoa, Gloria M Agudelo., Zapata, Isabel C Pulgarin., Rodriguez, Claudia M Velasquez., Ramires, Mauricio Duque., Cano, Mauricio Naranjo., Ortiz, Monica M Quintero., Guzman, Oscar J Lara., Durango, Katalina Munoz. 2016. *Coffee Consumption Increases the Antioxidant Capacity of Plasma and Has No Effect on the Lipid Profile or Vascular Function in Healthy Adults in a Randomized Controlled Trial*. Jurnal *The Journal of Nutrition*.
- Prasetya, Harka. Isradji, Israhmanto., Suparmi., Hardec, Adrian., Fahryzal, Muhammad., Azizah, Laili Durotul., Ashar, Dita Ferwina Utari. *Perbandingan Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas antara Drop Vitamin A dari Karotenoid Kulit Pisang Ambon dan B-Karoten*. Jurnal pISSN: 0126-074X eISSN: 2338-6223. Diakses online di <http://dx.doi.org/10.15395/mkb.v49n1.981>.
- Sukohar A, dan Sastramihardja HS. *Antioksidan Ekstrak Air Biji Kopi Robusta Lampung dalam Menghambat Degenerasi Sel Hati Tikus Model Hepatitis yang Diinduksi CCL4*. MKB. 2012; 44(3) :127-32.
- Sumbayak, Erma Mexcorry. 2016. *Fibroblas: Struktur dan Peranannya dalam Penyembuhan Luka*. Jurnal. Jakarta: Ukrida - Fakultas Kedokteran.
- Tanaman Obat. 2008. *Kopi (Coffea robusta L)*. [Serial Online]. <http://tanamanobat.org/496/kopi-coffea-robusta-l/>.
- Tai, J., cheung, s., Chan, E., 1991 cell mediated cytotoxin Against U937 cell by human ovarioan Cancer cell in vitro nutrition and cancerm 62(8):203-209
- Ulfah *et al.*. 2013. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Keong Bakau (Telescopium telescopium) dengan Pelarut yang Berbeda terhadap Metode DPPH (Diphenyl Picril Hidrazil)*. Volume 2, Nomor 4, Tahun 2013, Halaman 36-45. Semarang: Universitas Diponegoro
- Widyotomo, S. dan Sri, M. 2014. *Ekstraksi Kafein Dari Dalam Biji Kopi*.

Yaqin, Muhammad Ainul Yaqin., Nurmilawati, Mumun. 2016. *Pengaruh Ekstak Kopi Robusta (Coffea Robusta) sebagai Inhibitors of Growth Staphylococcus Aureus.*

Yorinta Putri Kenisa, Istiati, and Wisnu Setyari. 2013. *Effect of Robusta coffee beans ointment on full thickness wound healing.* Vol. 45. No. 1. Surabaya: UNAIR



Lampiran 1 Hasil Penelitian**a. Hasil perhitungan viabilitas sel**

| Konsentrasi | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Ulangan 3 | Kontrol sel | Viabilitas Sel |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-------------|----------------|
| 0,0375mg/ml | 128% | 114% | 108% | 100% | 117% |
| 0,075mg/ml | 130% | 133% | 116% | 100% | 126% |
| 0,15mg/ml | 119% | 108% | 112% | 100% | 113% |
| 0,3mg/ml | 119% | 144% | 124% | 100% | 129% |
| 0,6mg/ml | 114% | 158% | 139% | 100% | 137% |
| 1,2mg/ml | 131% | 163% | 155% | 100% | 150% |

Lampiran 2 Hasil Pengolahan Data menggunakan Spss

a. Uji homogenitas

Uji Levene test

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 3,542 | 2 | 15 | ,055 |

b. Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | Konsentrasi |
|----------------------------------|----------------|-------------|
| N | | 18 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | ,20939 |
| | Std. Deviation | ,016191 |
| | Absolute | ,163 |
| Most Extreme Differences | Positive | ,163 |
| | Negative | -,116 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | ,693 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | ,722 |

*Test distribution is Normal.

c. Uji Beda

ANOVA

Viabilitas

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | ,272 | 5 | ,054 | 2,844 | ,064 |
| Within Groups | ,229 | 12 | ,019 | | |
| Total | ,501 | 17 | | | |

*The means different sig. if less than 0,5

Lampiran 3 Alat dan Bahan



Media kultur (DMEM)



Timbangan Digital



Culture dish



Inkubator



ELISA Reader



Microwell plate



Spatula



Mikro pipet



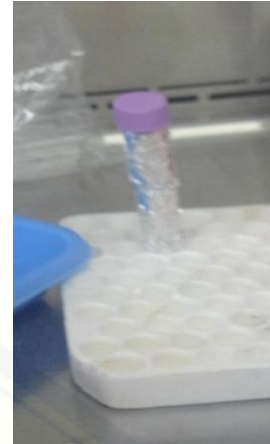
Conical tube



Mikroskop *inverted*



Tabung *ependorf*



Larutan *stopper*(SDS)



Blue tip and yellow tip

Lampiran 4 SURAT etichal clearance

| | |
|---|---|
|  | KOMISI ETIKA PENELITIAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta Telp. 081239447900 |
|---|---|

KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN
("ETHICAL CLEARANCE")
No.001184KKEP/FGK-UGM/EC/2017

Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:

Judul : KAJIAN DOSIS OPTIMAL KOPI HITAM ROBUSTA PADA SEL FIBROBLAS (Penelitian Eksperimental In-Vitro)

Peneliti Utama : Adnan Rasyid Rifai

Penanggung Jawab Medis : Dr. drg. Zahreni Hamzah, MS

Unit/Lembaga : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Lokasi Penelitian : Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM

Waktu Penelitian : Agustus 2017 – Selesai

Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.

Yogyakarta, 24 Agustus 2017

Wakil Dekan Bidang Penelitian, Pengabdian
Kepada Masyarakat dan Kerjasama

Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM


drg. Trianna Wahyu Utami , MDSc., Ph.D


Prof. Dr.drg. Pinandi Sri Pudyani, SU., Sp.Ort(K)

Lampiran 5 Perhitungan Rasio Kopi

Menurut *Specialty Coffee Association* ratio kopi perseduhan adalah 1:6,5

$$\frac{1}{6,5} = \text{gram kopi}$$

$$\text{gram kopi} = 0,1538 \text{ mg/ml} \cong > \mathbf{0,15 \text{ mg/ml}}$$

