



**INHIBISI SEDUHAN KOPI ROBUSTA *SPRAY DRIED* TERHADAP
PRODUKSI RADIKAL SUPEROKSIDA MONOSIT YANG DIPAPAR
EKSOTOKSIN *Streptococcus mutans* *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh

Asmaradita Nourisha Isth

NIM 151610101093

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2019



**INHIBISI SEDUHAN KOPI ROBUSTA *SPRAY DRIED* TERHADAP
PRODUKSI RADIKAL SUPEROKSIDA MONOSIT YANG DIPAPAR
EKSOTOKSIN *Streptococcus mutans* *IN VITRO***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat-syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Asmaradita Nourisha Isth

NIM 151610101093

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2019

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, karena atas rahmat-Nya saya dapat menyelesaikan tugas akhir ini;
2. Orangtua tercinta, Yusuf Effendi dan Yohanna Mudji Utami, karena segala dukungan dan doa yang diberikan;
3. Dosen pembimbing saya Dr. drg I Dewa Ayu Susilawati, M. Kes dan drg. Pujiana Endah Lestari, M. Kes. yang telah dengan sabar membimbing dan mengarahkan sehingga tugas akhir ini dapat selesai dengan baik;
4. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTTO

الدُّوَاءُ يَلِدُ وَنَدَعُمُ اللّٰهُ حَسْبِنَا

“Cukuplah Allah sebaik-baiknya penolong dan pelindung kami.”

حَسْبُهُ فُهِوُ اللّٰهُ عَلٰى يَتَوَكَّلْ وَمَنْ يَحْتَسِبْ لَا حَيْثُ مِنْ وَيَرْزُقُهُ (٢) مَخْرَجًا لَهُ يَجْعَلُ اللّٰهُ يَتَّقِي وَمَنْ

“Barangsiapa bertakwa kepada Allah niscaya Dia akan mengadakan baginya jalan keluar, dan memberinya rezki dari arah yang tiada disangka-sangkanya dan barangsiapa yang bertawakkal kepada Allah niscaya Allah akan mencukupkan (keperluan)nya.”

(Q.S. At-Tholaq: 2-3)*)

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2013. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*

Bandung: Diponegoro

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Asmaradita Nourisha Isthi

NIM : 151610101093

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi saya yang berjudul “Inhibisi Seduhan Kopi Robusta *Spray Dried* terhadap Produksi Radikal Superoksida Monosit yang Dipapar Eksotoksin *Streptococcus mutans In Vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 20 Juni 2019

Yang menyatakan,

Asmaradita N. I.

NIM 151610101093

SKRIPSI

**INHIBISI SEDUHAN KOPI ROBUSTA *SPRAY DRIED* TERHADAP
PRODUKSI RADIKAL SUPEROKSIDA MONOSIT YANG DIPAPAR
EKSOTOKSIN *Streptococcus mutans* *IN VITRO***

Oleh

Asmaradita Nourisha Isth

NIM 151610101093

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M. Kes

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Pujiana Endah Lestari, M. Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Inhibisi Seduhan Kopi Robusta *Spray Dried* terhadap Produksi Radikal Superoksida Monosit yang Dipapar Eksotoksin *Streptococcus mutans In Vitro*” karya Asmaradita Nourisha Isthi telah diuji dan disahkan pada:

hari,tanggal : Kamis, 20 Juni 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Utama

Dosen Penguji Anggota

drg. Dessy Rachmawati, M.Kes., Ph.D
NIP. 197612232005012002

Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M. Si.
NIP. 196705021997022001

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001

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

Mengesahkan

Dekan,

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

RINGKASAN

Inhibisi Seduhan Kopi Robusta *Spray Dried* terhadap Produksi Radikal Superoksida Monosit yang Dipapar Eksotoksin *Streptococcus mutans In Vitro*; Asmaradita Nourisha Isth, 151610101093; 2019; 57 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Radikal merupakan senyawa yang sangat reaktif dan berpotensi merusak molekul-molekul jaringan. Secara alamiah radikal bebas dihasilkan oleh tubuh selama proses metabolisme. Radikal bebas dapat dinetralkan selama terdapat antioksidan yang memadai. Potensi radikal bebas dalam merusak jaringan terjadi pada kondisi inflamasi karena peningkatan produksi radikal bebas. Monosit yang dipapar eksotoksin *Streptococcus mutans* dapat mengaktifkan NADPH oksidase (NOX) pada membran yang memicu adanya ledakan oksidatif akibat produksi radikal bebas dalam jumlah besar. Radikal yang dihasilkan adalah produk *Reactive Oxygen Species* (ROS) berupa radikal superoksida sebagai yang pertama dan paling banyak dihasilkan oleh monosit.

Antioksidan secara alami dapat ditemukan pada kopi. Antioksidan yang terkandung dalam kopi merupakan yang paling tinggi bila dibandingkan dengan teh, coklat dan *wine* dalam sekali seduh. Kopi melalui berbagai proses pengolahan sebelum dapat dikonsumsi. Pengolahan kopi robusta berpengaruh terhadap kandungan antioksidannya. Kopi robusta *spray dried* memiliki kandungan antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kopi bubuk robusta biasa. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji potensi seduhan kopi bubuk robusta *spray dried* terhadap inhibisi produksi radikal superoksida monosit yang dipapar eksotoksin *S. mutans in vitro*.

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories in vitro* dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Obyek penelitian adalah isolat monosit vena perifer orang sehat. Penelitian dilakukan pada bulan September-Desember 2018 di Laboratorium *Bioscience* RSGM Universitas Jember. Terdapat 3 kelompok pada penelitian ini, kelompok kontrol (monosit dan eksotoksin), kelompok perlakuan I(monosit, seduhan kopi bubuk biasa, dan

eksotoksin), dan perlakuan II(monosit, seduhan kopi bubuk *spray dried*, dan eksotoksin). Metode isolasi monosit menggunakan teknik *single ficoll-paque density gradient centrifugation*. Seduhan kopi didapatkan dengan melarutkan 3 gram kopi bubuk dalam 200 ml air. Potensi inhibisi dilihat dari penurunan jumlah monosit yang memproduksi radikal superoksida dengan *Nitro Blue Tetrazolium*. Sel yang memproduksi warna formazan ungu kebiruan dianggap memproduksi radikal superoksida. Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah menghitung persentase jumlah monosit yang memproduksi radikal superoksida dengan jumlah seluruh sel monosit. Hasil perhitungan dilakukan uji analisis statistik. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas menggunakan *Levene Test* dengan hasil $p>0,05$. Uji selanjutnya adalah uji parametri *One-Way Anova* dengan hasil $p<0,05$ dan *Least Significant Difference*.

Hasil analisis data statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada seluruh kelompok. Hasil analisis statistik lanjutan menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok monosit + kopi *spray dried* + eksotoksin. Hasil menunjukkan kelompok yang memproduksi radikal tertinggi adalah kelompok monosit + eksotoksin. Hal ini terjadi karena produksi radikal superoksida intrasel meningkat akibat paparan eksotoksin *S. mutans*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai radikal ekstra sel yang terbentuk. Kelompok monosit + kopi *spray dried* + eksotoksin memperlihatkan jumlah monosit yang memproduksi radikal superoksida lebih sedikit dibandingkan kelompok monosit + kopi bubuk biasa + eksotoksin. Hal ini menunjukkan bahwa seduhan kopi bubuk *spray dried* dengan konsentrasi 1,5% dapat menurunkan produksi radikal superoksida monosit sedangkan kandungan antioksidan pada kelompok monosit + kopi bubuk biasa + eksotoksin dengan konsentrasi 1,5% kurang mampu meredam produksi radikal superoksida monosit.

Kesimpulan penelitian ini adalah seduhan bubuk kopi robusta *spray dried* dapat menghambat produksi radikal superoksida monosit yang dipapar eksotoksin *Streptococcus mutans* secara *in vitro*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai konsentrasi lain yang dapat menghambat produksi radikal superoksida monosit serta penelitian serupa secara *in vivo*.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Inhibisi Seduhan Kopi Robusta *Spray Dried* terhadap Produksi Radikal Superoksida Monosit yang Dipapar *Streptococcus mutans In Vitro*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga dalam memberikan bimbingan, saran, dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
3. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga dalam memberikan bimbingan, saran, dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
4. drg. Dessy Rachmawati M.Kes., Ph.D. selaku Dosen Penguji Ketua yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga dalam memberikan saran, dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
5. Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M. Si. selaku Dosen Penguji Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga dalam memberikan saran, dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
6. Prof. drg. Mei Syafriadi, M.DSc., Ph.D., Sp.PMM(K) yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga dalam memberikan saran pada skripsi ini;
7. drg. Sri Lestari, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan saran dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;

8. Seluruh dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah mendidik dan memberikan bekal ilmu selama penulis menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
9. Teknisi Laboratorium Bioscience RSGM FKG Universitas Jember yang telah banyak membantu dalam proses penelitian;
10. Orangtua tercinta, Yusuf Effendi dan Yohanna Mudji Utami, serta seluruh keluarga besar yang senantiasa mendidik, mendukung, memberikan kasih sayang, pengorbanan, dan doa sehingga membantu saya menjadi manusia yang lebih baik dan kuat menghadapi segala sesuatu;
11. Teman-teman *miss complain* saya, Fiftiani Syarah, Laila Fakhriyah, Sita Amelia, dan Kiki Rahmi yang selalu memberi bantuan dan semangat dalam penyelesaian tugas akhir ini;
12. Teman-teman Ikiwawa, Rizqy Apriliani, Qhorie Azra, dan Hillary Ingrid yang selalu memberi bantuan dan semangat dalam penyelesaian tugas akhir ini;
13. Semua pihak yang terlibat secara langsung maupun tidak langsung yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, saya mengucapkan terima kasih banyak atas bantuan serta dukungannya.

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

Jember, Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

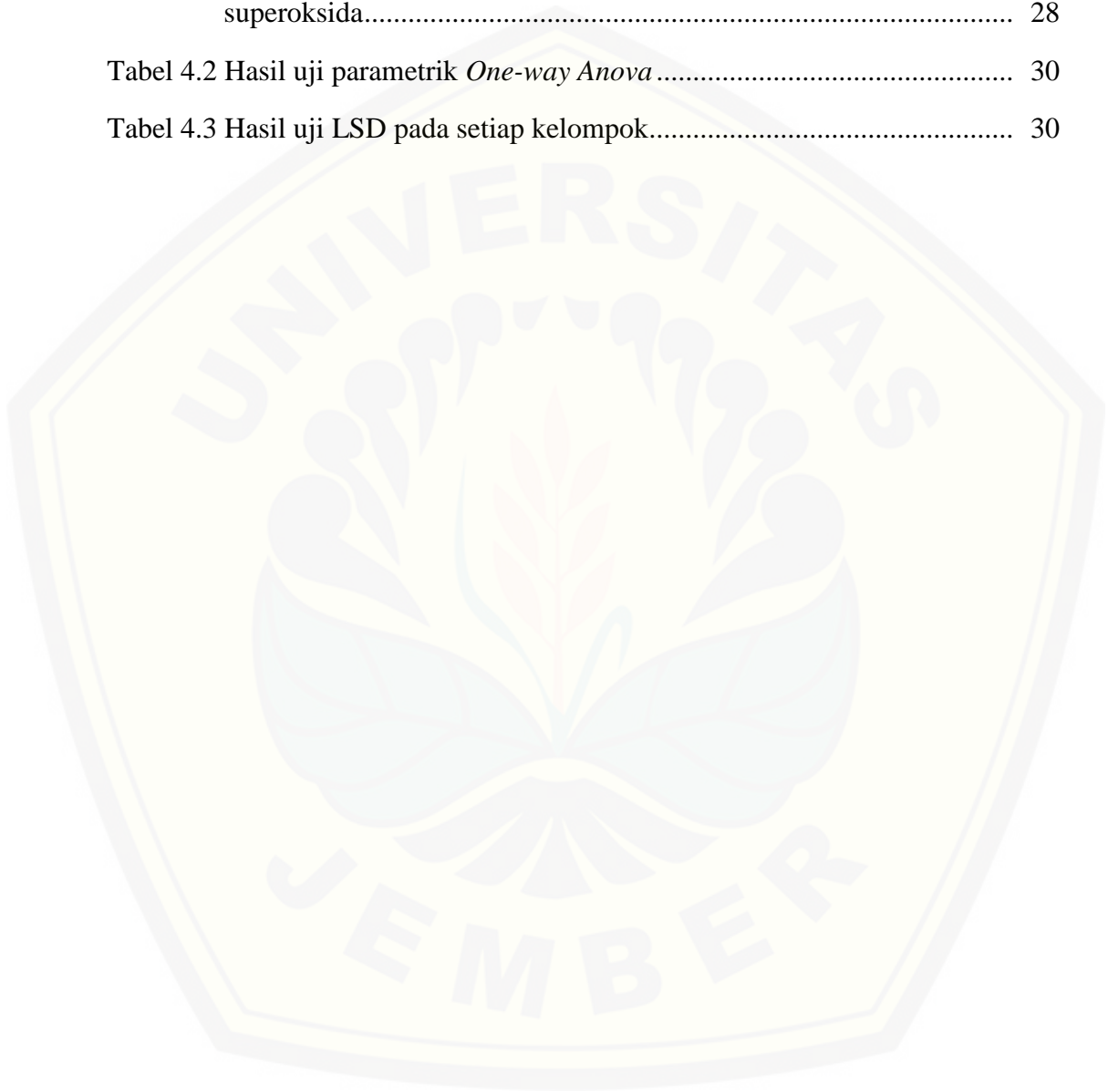
	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
PERSEMBAHAN	iii
MOTTO	iv
PERNYATAAN	v
PEMBIMBINGAN	vi
PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Radikal Bebas	4
2.2 Antioksidan	5
2.3 Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	6
2.3.1 Klasifikasi Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	6
2.3.2 Morfologi	7
2.3.3 Proses Pengolahan	8

2.3.4 <i>Spray Drying</i>	9
2.3.5 Kandungan Antioksidan pada Kopi	10
2.4 Monosit	11
2.4.1 Morfologi	12
2.4.2 Peran Monosit/Makrofag dalam Respon Imun	12
2.5 <i>Streptococcus mutans</i>	13
2.6 Aktivitas Antioksidan terhadap Produksi Radikal Superoksida	14
2.7 Kerangka Konsep Penelitian	15
2.8 Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian	16
2.9 Hipotesis	16
BAB 3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	17
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3.3 Variabel Penelitian	17
3.3.1 Variabel Bebas	18
3.3.2 Variabel Terikat	18
3.3.3 Variabel Terkendali	18
3.4 Sampel dan Kelompok Penelitian	19
3.4.1 Kriteria Sampel Penelitian	19
3.4.2 Kelompok Penelitian.....	19
3.4.3 Besar Sampel Penelitian	20
3.5 Alat dan Bahan Penelitian	21
3.5.1 Alat Penelitian.....	21
3.5.2 Bahan Penelitian	22
3.6 Prosedur Penelitian	23
3.6.1 Pengurusan Surat Izin Penelitian dan <i>Ethical Clearance</i>	23
3.6.2 Pembuatan Kopi Bubuk <i>Spray Dried</i>	23
3.6.3 Sterilisasi Alat.....	23

3.6.4 Pembuatan Eksotoksin <i>Streptococcus mutans</i>	23
3.6.5 Prosedur Pembuatan Seduhan Kopi	24
3.6.6 Pengambilan Sampel Darah	24
3.6.7 Prosedur Isolasi Monosit	24
3.6.8 Inkubasi Monosit dengan Sediaan Kopi	25
3.6.9 Pemaparan Eksotoksin <i>S. mutans</i>	26
3.6.10 Uji Pengukuran Produksi Radikal Superoksida	27
3.7 Analisis Data	27
3.8 Alur Penelitian	27
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Hasil Penelitian	28
4.1.1 Hasil Pengukuran Produksi Radikal Superoksida	28
4.1.2 Analisa Data	30
4.2 Pembahasan	31
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil persentase jumlah monosit yang memproduksi radikal superoksida.....	28
Tabel 4.2 Hasil uji parametrik <i>One-way Anova</i>	30
Tabel 4.3 Hasil uji LSD pada setiap kelompok.....	30



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 NADPH <i>oksidase</i> merubah oksigen (O_2) menjadi (O_2^-).....	4
Gambar 2.2 Reaksi kimia perubahan superoksida menjadi hidrogen peroksida oleh SOD.....	5
Gambar 2.3 Reaksi kimia perubahan radikal bebas menjadi oksigen dan air....	6
Gambar 2.4 Bunga kopi	7
Gambar 2.5 Buah kopi	8
Gambar 2.6 Diagram alur proses pengolahan biji kopi.....	9
Gambar 2.7 Struktur kimia molekul asam klorogenat	9
Gambar 2.8 Struktur kimia molekul kafein.....	10
Gambar 2.9 Tetrazolium dan warna formazan.....	14
Gambar 3.1 Skema kelompok penelitian	20
Gambar 3.2 Alur pembacaan lapang pandang	26
Gambar 4.1 Grafik presentase jumlah monosit yang memproduksi radikal superoksida.....	29
Gambar 4.2 Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida.....	29
Gambar 4.3 Mekanisme peredaman radikal bebas oleh fenol	32
Gambar 4.4 Aktivasi NADPH <i>oksidase</i> menyebabkan terbentuknya ROS.....	33
Gambar 4.5 Reaksi rantai oksidasi radikal bebas.....	33

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Surat Izin Penelitian.....	41
Lampiran B. <i>Ethical Clearance</i>	42
Lampiran C. Surat Identifikasi Bakteri	43
Lampiran D. <i>Informed Consent</i>	44
Lampiran E. Gambar Alat dan Bahan Penelitian	45
Lampiran F. Prosedur Penelitian.....	48
Lampiran G. Gambar Hasil Isolasi Monosit	50
Lampiran H. Gambaran Hasil Pengecatan Gram Bakteri	51
Lampiran I. Gambaran Mikroskopis Monosit yang Memproduksi Radikal Superoksida.....	52
Lampiran J. Tabel Persentase Perhitungan Jumlah Monosit	54
Lampiran K. Analisis Data.....	56

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Senyawa antioksidan bermanfaat untuk mengatasi dampak negatif radikal bebas. Secara alamiah, tubuh manusia mampu memproduksi antioksidan endogen yang dapat merubah radikal bebas reaktif menjadi senyawa non-radikal yang stabil. Namun demikian, antioksidan alami yang diproduksi tubuh terkadang tidak mencukupi untuk meredam reaksi radikal bebas pada kondisi inflamasi (Werdhasari, 2014).

Tahap awal reaksi inflamasi adalah terjadinya *respiratory burst* oleh sel inflamasi. Selama melakukan pertahanan tubuh, monosit mengaktifkan Nicotine Adenine Dinucleotide Phospat (NADPH) *oksidase* yang memicu adanya *respiratory burst* akibat produksi radikal bebas dalam jumlah besar. Radikal yang dihasilkan adalah produk *Reactive Oxygen Species* (ROS) berupa radikal superoksida sebagai yang pertama dan paling banyak dihasilkan oleh monosit untuk membunuh bakteri (Birben dkk., 2012; Yuslianti, 2018). *Respiratory burst* yang terjadi tanpa diimbangi adanya antioksidan mengakibatkan terbentuknya *chain reaction*. Rantai oksidan yang tidak terputus dapat menyebabkan stres oksidatif yaitu ketidakseimbangan jumlah radikal dan antioksidan dalam tubuh (Oliveira dkk., 2010).

Salah satu pemicu adanya *respiratory burst* adalah eksotoksin *Streptococcus mutans*. Bakteri berantai ini merupakan bakteri utama penyebab kerusakan gigi dan bahkan sebagai salah satu bakteri yang diduga dapat menyebabkan rusaknya kolagen vaskular yang memicu trombosis (Forssten dkk., 2010; Purwanto dan Susilawati, 2014). Hal ini memungkinkan adanya perlawanan monosit saat inflamasi terjadi pada jaringan lunak gigi seperti pulpa karena karies yang dalam (Eslami dkk., 2016).

Radikal bebas dapat memicu timbulnya beberapa penyakit degeneratif seperti jantung, diabetes melitus, kanker, dan gangguan ginjal (Dewo, 2013; Winarno dkk., 2015). Penyakit degeneratif membutuhkan konsumsi obat-obatan

yang relatif mahal dan berisiko menimbulkan komplikasi penyakit lain akibat bahan kimia yang terkandung dalam obat. Kopi bubuk *spray dried* dengan kandungan antioksidan dalam jumlah besar sebagai senyawa pendonor elektron yang mudah teroksidasi diduga dapat menjadi alternatif penangkal radikal bebas (Werdhasari, 2014; Dupas dkk., 2006).

Kopi merupakan minuman berkhasiat yang memiliki beragam manfaat dengan rasa dan aroma yang khas (Fattah, 2016). Beberapa kandungan dalam kopi yang berkhasiat bagi tubuh antara lain *trigonelline* yang dapat mencegah kerusakan pada gigi dan *dicafeoylquinic acid* yang berfungsi sebagai antioksidan (Hamdan dan Aries, 2018). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kopi merupakan jenis minuman yang hingga saat ini memiliki antioksidan paling tinggi dibandingkan jenis minuman lain seperti teh, coklat, serta *wine* dalam rerata satu kali konsumsi dan jenis kopi robusta memiliki kandungan antioksidan yang lebih tinggi daripada kopi arabika (Yashin dkk., 2013; Farah, 2012). Menurut hasil Survei Sosial Ekonomi Nasional (SUSENAS) oleh Badan Pusat Statistik, permintaan kopi untuk konsumsi rumah tangga cenderung mengalami penurunan setiap tahunnya meskipun produksi kopi robusta di berbagai provinsi melimpah (Kementerian Pertanian, 2016). Hal ini diduga terjadi karena minimnya pengetahuan masyarakat tentang manfaat kopi bagi kesehatan (Olivia, 2014).

Antioksidan dalam kopi dapat dipengaruhi oleh proses pengolahan berupa pengeringan (*drying*) (Yashin dkk., 2013). Pengeringan *spray* merupakan salah satu proses dalam pembuatan kopi instan yang praktis dan tidak menyisakan ampas setelah penyeduhan sehingga memaksimalkan kandungan zat yang berguna bagi tubuh untuk dikonsumsi tanpa terbuang (Mizfar dan Aldon, 2015; Afriliana, 2018). *Purchasing dan Marketing manager* PT Taman Delta Indonesia Moelyono Soesilo mengatakan total konsumsi kopi sekitar 4,5-5 juta kantong per tahun dengan jenis yang paling banyak dikonsumsi adalah kopi tubruk dan 3 in 1 *white coffee*. Pengeringan dilakukan dengan mengeleminasi kandungan air dengan paparan suhu yang tinggi. Produk akan memiliki massa jenis yang rendah, daya larut yang tinggi dan senyawa polifenol dalam jumlah besar (Musatto dkk., 2011; Niseteo dkk., 2012). Penelitian fitokimia yang dilakukan oleh Susilawati pada

tahun 2018 juga menunjukkan bahwa kandungan antioksidan, kafein, dan protein pada kopi robusta yang melalui proses pengeringan *spray* mengalami peningkatan tetapi penelitian tentang efek kopi tersebut bagi tubuh belum banyak dilakukan.

Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian untuk mengkaji potensi inhibisi pada kopi bubuk robusta tanpa ampas dengan proses pengeringan *spray* dalam menghambat produksi radikal superoksida monosit yang dipapar eksotoksin *S. mutans* dibandingkan dengan kopi bubuk biasa.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka masalah yang timbul adalah apakah seduhan kopi bubuk robusta *spray dried* memiliki potensi inhibisi terhadap produksi radikal superoksida monosit yang dipapar eksotoksin *S. mutans* secara in vitro?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengkaji potensi seduhan kopi bubuk robusta *spray dried* terhadap inhibisi produksi radikal superoksida monosit yang dipapar eksotoksin *S. mutans* secara in vitro.

1.4 Manfaat Penelitian

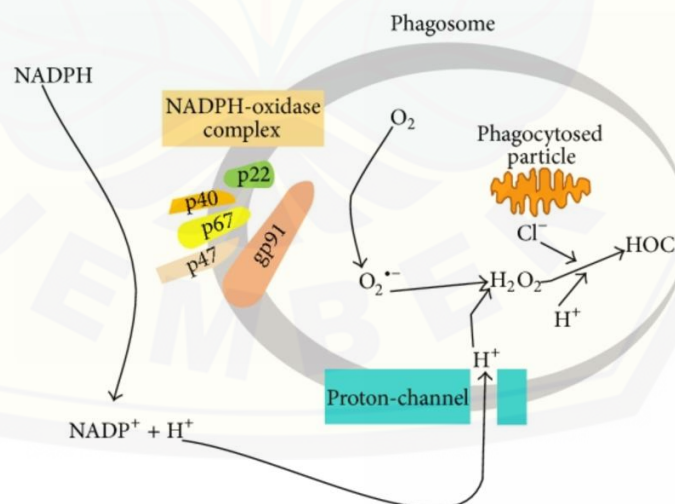
Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi ilmiah tentang pemanfaatan kopi *spray dried* sebagai salah satu antioksidan yang dapat mengurangi produksi radikal superoksida.
2. Tambahan informasi pemanfaatan kopi secara maksimal dengan teknologi pengolahan pengeringan *spray*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu atom, gugus, molekul atau senyawa yang dapat berdiri sendiri yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit paling luar. Molekul tersebut diantaranya atom hidrogen dan oksigen. Keberadaan satu elektron yang tidak berpasangan menyebabkan molekul mudah tertarik dan menyebabkan molekul sangat reaktif. Pelepasan elektron dari suatu senyawa disebabkan karena adanya proses oksidasi. Sumber radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh melewati autodaksi, oksidasi enzimatik, fagositosis dalam respirasi, dan transpor elektron di mitokondria maupun dari luar tubuh seperti sinar ultraviolet, asap rokok, dan radiasi (Yuslianti, 2018). Radikal bebas dapat merusak protein, DNA, dan membran sel dengan cara mengambil elektron yang mereka butuhkan sebagai molekul reaktif. Proses pengambilan elektron ini disebut oksidasi (Liou, 2011). Gambar 2.1 menunjukkan proses oksidasi pembentukan radikal bebas akibat adanya NADPH *oksidase* yang berfungsi merubah oksigen menjadi anion superoksida.



Gambar 2.1 NADPH *oksidase* mengubah oksigen (O_2) menjadi ($O_2^{\cdot-}$)
(Sumber: Maruf dan O'Brien, 2014)

Salah satu radikal bebas yang dikenal bersifat toksik pada sel hidup adalah superoksida dan radikal hidroksil. Spesies oksigen reaktif (ROS) yang diproduksi

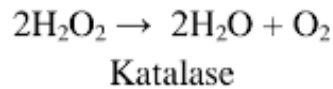
dalam proses metabolisme dan fisiologis tidak menutup kemungkinan menjadi oksidan yang berbahaya bagi tubuh. Hal ini terjadi apabila peningkatan oksidan terjadi tanpa diimbangi adanya jumlah antioksidan yang seimbang (stres oksidatif). Radikal hidroksil (OH^\cdot) merupakan ROS paling berbahaya yang bertanggung jawab atas terjadinya kerusakan oksidatif. Hidrogen peroksida dan molekul superoksida tidak dapat langsung mengoksidasi lemak, asam nukleat, dan gula melainkan dengan cara memproduksi OH^\cdot . Molekul yang telah teroksidasi akan membentuk radikal bebas baru yang mengarah ke terjadinya reaksi berantai radikal (*chain reaction*) apabila tidak dihentikan oleh antioksidan (Erel, 2003). Stres oksidatif terjadi akibat ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dengan antioksidan dapat meningkatkan transkripsi berbagai gen inflamasi, merusak fungsi membran, serta mempercepat penuaan (Samuel, 2018). Radikal bebas juga merupakan penyebab berbagai keadaan patologis seperti penyakit lever, jantung koroner, katarak, dan penyakit hati (Handajani dkk., 2010).

2.2 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah proses oksidasi. Hal ini memungkinkan antioksidan untuk mencegah terjadinya reaksi oksidasi dari radikal bebas. Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi menjadi dua macam yaitu antioksidan dalam tubuh (antioksidan enzimatik) serta antioksidan non-enzimatik yang merupakan antioksidan dari alam sekitar dan antioksidan dari reaksi kimia. Antioksidan enzimatik dibentuk oleh tubuh berupa enzim seperti *superoksida dismutase* (SOD), *peroxidase*, dan katalase sedangkan antioksidan non-enzimatik dapat diperoleh melalui makanan maupun molekul senyawa dari suatu proses pengolahan (Yuslianti, 2018).



Gambar 2.2 Reaksi kimia perubahan superoksida menjadi hidrogen peroksida oleh SOD (Sumber: Nimse dan Pal, 2015)



Gambar 2.3 Reaksi kimia perubahan radikal bebas menjadi oksigen dan air
(Sumber: Yuslianti, 2018)

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dibagi menjadi 3 kelompok yang berbeda yaitu antioksidan primer, antioksidan sekunder, dan antioksidan tersier. Sistem pemutusan reaksi radikal berantai dilakukan oleh antioksidan primer yang meliputi enzim-enzim seperti SOD yang mengkatalis dismutase superoksia menjadi hidrogen peroksida dan oksigen (Gambar 2.2) dan katalase yang mengkatalis hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Gambar 2.3). Antioksidan sekunder merupakan sistem pertahanan preventif yang menghambat pembentukan radikal bebas. Antioksidan sekunder berupa antioksidan alami yang banyak diperoleh dari konsumsi makanan. Antioksidan terakhir yaitu antioksidan tersier meliputi sistem enzim *DNA-repair*. Enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat radikal bebas (Winarsi, 2007).

2.3 Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kopi robusta pertama kali ditemukan di akhir abad ke-19 di Kongo Belgia. Kopi jenis ini dulunya kurang diminati karena diambil dari pohon yang tumbuh secara liar sehingga rasa yang dihasilkan terlalu kuat. Citra kopi robusta di mata masyarakat saat itu sangat buruk karena kualitas rasanya yang bahkan tidak sebanding dengan kopi arabika kualitas rendah. Namun harga minim inilah yang akhirnya menarik produsen minuman kopi Eropa untuk mengembangkan pengolahan seperti pemanggangan (*roasting*) dan penggilingan menjadi bubuk (*grounding*) sehingga merubah baik rasa maupun kandungan dalam kopi (Hoffman, 2014).

2.3.1 Klasifikasi Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Klasifikasi tanaman kopi robusta adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Subkingdom	: <i>Viridiplantae</i>
Infrakingdom	: <i>Streptophyta</i>
Super divisi	: <i>Embryophyta</i>
Divisi	: <i>Treacheaophyta</i>
Sub divisi	: <i>Spermatophytina</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Super ordo	: <i>Asteranae</i>
Ordo	: <i>Gentianales</i>
Famili	: <i>Rubiaceae</i>
Genus	: <i>Coffea L.</i>
Spesies	: <i>Coffea canephora L.</i> (ITIS, 2011)

2.3.2 Morfologi

Tanaman kopi memerlukan waktu sekitar 3 tahun untuk menjadi tanaman berbunga yang dapat menghasilkan buah kopi. Semua spesies kopi memiliki bunga berwarna putih berbau harum yang muncul di ketiak daun (Gambar 2.4). Buah yang terbentuk dari bunga tersebut akan matang selama 7 sampai 12 bulan (Gambar 2.5). Buah kopi tersusun dari 3 lapisan yaitu kulit buah (*epicarp*), daging buah (*mesocarp*) atau biasa disebut *pulp*, dan kulit tanduk (*endocarp*). Satu buah kopi memiliki dua biji kopi yang memiliki alur pada bagian datarnya dan terbungkus di dalam kulit tanduk. Kopi robusta memiliki akar yang tidak terlalu panjang, sekitar 30 cm dari permukaan tanah, sehingga menyebabkan kopi jenis ini lebih cepat kering dibandingkan jenis yang lain (Rahardjo, 2017).



Gambar 2.4 Bunga kopi
(Sumber: Prastowo, 2010)

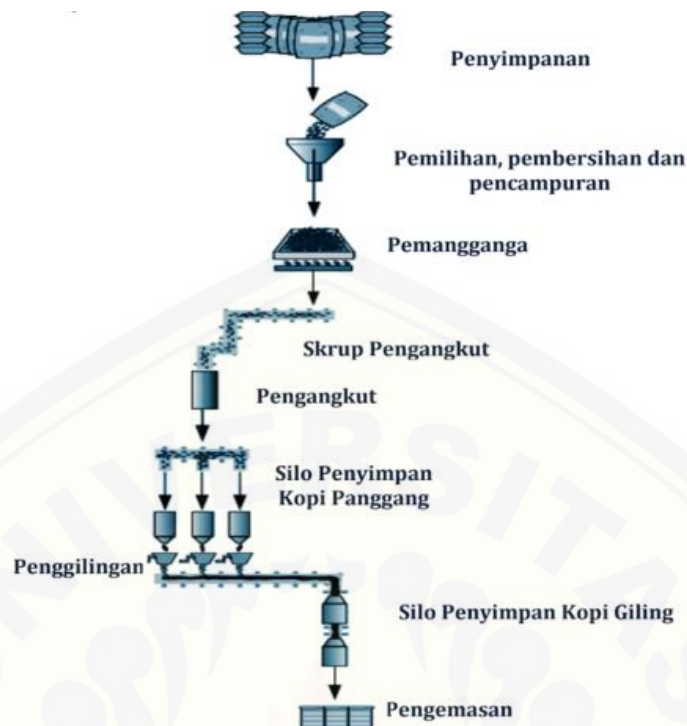


Gambar 2.5 Buah kopi
(Sumber: Prastowo, 2010)

2.3.3 Proses Pengolahan

Kopi robusta yang siap panen dipetik secara manual dan selanjutnya dilakukan seleksi untuk memisahkan buah yang *superior* (masak) dari buah yang *inferior* (cacat). Buah kopi yang segar sebaiknya langsung dilakukan pengolahan seperti pengelupasan kulit buah. Kopi robusta memiliki kulit yang keras sehingga diperlukan air untuk proses ini, fermentasi yang relatif singkat karena kandungan lendir yang sedikit, pencucian, pengeringan dengan bantuan sinar matahari, dan penyimpanan yang tidak lebih dari 3 bulan (Idawanni, 2015; Rahardjo, 2012).

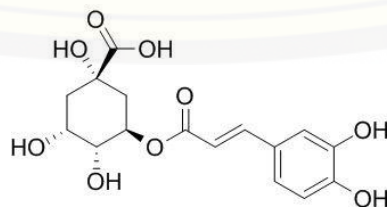
Proses selanjutnya yang dilalui kopi setelah penyimpanan adalah proses pengolahan (Gambar 2.6). Proses pengolahan dapat dilakukan dengan proses pengeringan kering. Kopi akan melalui berbagai proses seperti pemanggangan yang dilakukan dengan alat dengan temperatur dan lama waktu tertentu sehingga biji kopi berwarna kecoklatan dan bahkan bisa dikonsumsi secara langsung serta penggilingan yang mengubah bentuk biji menjadi bubuk sehingga dapat dilakukan penyeduhan (Yuwono dkk., 2017).



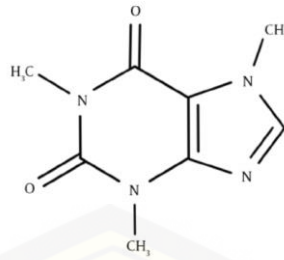
Gambar 2.6 Diagram alir proses pengolahan biji kopi
(Sumber : Franson, 2016 dalam Yuwono dkk., 2017)

2.3.4 *Spray Drying*

Teknologi saat ini memungkinkan produksi kopi tanpa meninggalkan ampas saat diseduh yang biasa disebut *soluble coffee*. Hal ini dikarenakan adanya proses pengeringan (*drying*) pada proses pembuatan bubuk seperti pengeringan *spray*. Proses ini menjadi salah satu teknik yang banyak dipilih untuk membuat *soluble coffee*/kopi instan dan dapat menghasilkan senyawa polifenol seperti asam klorogenat (Gambar 2.7) dan kafein (Gambar 2.8) yang merupakan senyawa antioksidan (Desai dan Park, 2005).



Gambar 2.7 Struktur kimia molekul asam klorogenat
(Sumber : Toyama dkk., 2014)



Gambar 2.8 Struktur kimia molekul kafein
(Sumber : Baratloo dkk., 2016)

Kopi *spray dried* tidak menyisakan ampas karena ukuran partikelnya yang kecil. Partikel sebesar 4-5 μm akan larut secara keseluruhan dalam air tanpa menyisakan ampas yang masih mengandung sejumlah senyawa bioaktif seperti kafein dan fenolik (Ishwarya dan Chinnaswamy, 2014; Juliantari dkk., 2018). Pada proses pengeringan temperatur yang lebih tinggi dari 160 $^{\circ}\text{C}$ terkadang menyebabkan degradasi senyawa polifenol, yang sensitif terhadap suhu panas (Sun-Waterhouse dkk., 2013). Oleh karena itu pada tahun 2015 Belščak-Cvitanović dkk., melakukan penelitian dengan menurunkan suhu menjadi 130 $^{\circ}\text{C}$ sehingga komponen bioaktif dalam kopi tidak terdegradasi.

Proses pengeringan *spray* dapat menghasilkan antioksidan yang lebih tinggi dari teknik pengeringan lainnya untuk menghasilkan kopi larut air tanpa ampas seperti pengeringan *freeze*. Selain senyawa fenolik berupa asam klorogenat, potensi antioksidan yang dihasilkan kopi *spray dried* juga ada pada kandungan kafein, asam hidrosisinat, dan produk reaksi *Maillard* seperti melanoidin (Ghrişan dan Vanile, 2017).

2.3.5 Kandungan Antioksidan pada Kopi

Kopi memiliki beberapa senyawa yang berperan sebagai antioksidan seperti senyawa fenolik (asam klorogenat, asam kafeat) dan kafein (Isnindar, 2017). Polifenol, bentuk senyawa fenolik dalam kopi, merupakan senyawa kimia yang bekerja sebagai antioksidan kuat (Almada, 2009). Kopi mengandung senyawa fenolik berupa asam klorogenat yang berfungsi sebagai antioksidan dapat ditingkatkan dengan mengurangi adanya radikal bebas (Herlinawati, 2016).

Antioksidan adalah senyawa yang memiliki peranan penting dalam menjaga kesehatan karena dapat menangkap molekul spesies oksigen reaktif sehingga menghambat reaksi oksidatif dalam tubuh yang merupakan penyebab berbagai penyakit (Adawiyah dkk., 2015). Penelitian Vicente dkk., pada tahun 2014a menunjukkan bahwa konsumsi kopi robusta dapat meningkatkan kadar SOD yang merupakan antioksidan yang berasal dari dalam tubuh sehingga sel tubuh dapat menghindari adanya stres oksidatif.

Senyawa fenol memiliki kemampuan mendonasikan hidrogen kepada atom yang bersifat reaktif karena kehilangan pasangan elektron menjadi *oxidized resonance-stabilized radicals* yang dapat mencegah stres oksidatif (Vicente dkk., 2014b). Senyawa polifenol pada kopi memiliki beberapa fungsi seperti menangkap radikal bebas, menangkap ion-ion logam, dan memodulasi aktivitas enzim. Selain itu polifenol dapat menghambat reaksi lipoksigenase yang berperan dalam terjadinya inflamasi yang disebabkan oleh agregasi sel inflamatori serta menghambat terjadinya oksidasi vitamin A. Oksidasi vitamin A dapat menurunkan jumlah vitamin A dalam tubuh yang memiliki efek *antiaging* (Yusmarini, 2011; Andriana dan Djauhari, 2017). Asam klorogenat merupakan senyawa polifenol yang dapat untuk memutus reaksi berantai dari radikal bebas dan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi karena gugus hidroksil yang dimiliki berjumlah banyak (Lingga, 2012; Farhaty dan Muchtaridi, 2016).

2.4 Monosit

Monosit merupakan sel inflamasi yang diproduksi dalam sumsum tulang dan berada dalam sirkulasi darah selama satu sampai dua hari. Setelah menerobos dinding vena pascakapiler, monosit sebagai sel prekursor dari sistem fagosit mononuklear akan berdiferensiasi menjadi beberapa bentukan sel seperti makrofag dalam jaringan ikat, mikroglia dalam sistem saraf pusat, dan osteoklas dalam tulang (Mescher, 2011). Monosit berperan sebagai *Antigen Presenting Cell*, mengenal dan menyerang mikroba, memproduksi sitokin, serta mengerahkan

pertahanan sebagai respon terhadap infeksi. Monosit juga berperan dalam *remodeling* dan perbaikan jaringan (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013).

2.4.1 Morfologi

Monosit adalah agranulosit dengan diameter 12 sampai 20 μm . Inti sel besar dan cenderung menjauh dari bagian tengah sel. Bentuk inti sel bervariasi seperti berbentuk lonjong, berbentuk ginjal, maupun berbentuk U. Kromatin kurang padat apabila dibandingkan dengan limfosit. Sitoplasma monosit bersifat *basofilik* dan mengandung granula *azurofilik* yang sangat halus (lisosom). Granula ini tersebar di seluruh sitoplasma dan memberi sel warna abu-abu kebiruan karena sifat basa yang dimiliki dalam sediaan terpulask. Terdapat retikulum endoplasma kasar dan sejumlah mitokondria kecil dalam inti sel dengan pengamatan menggunakan mikroskop elektron (Mescher, 2011).

2.4.2 Peran Monosit/Makrofag dalam Respon Imun

Monosit sebagai sel mononuklear menggantikan netrofil saat tidak lagi dikerahkan pada inflamasi kronis. Monosit berperan dalam mencerna mikroba, debris selular, netrofil yang bergenerasi, serta memodulasi respon imun dan fungsi sel T melalui presentasi antigen dan sekresi sitokin. Monosit-makrofag mempunyai kemampuan menyembuhkan luka dengan hasil akhir berupa struktur jaringan normal maupun fibrosis serta memperbaiki fungsi sel inflamasi melalui sekresi sitokin (Baratawidjaja dan Rengganis, 2013). Sebagian monosit melekat pada jaringan dan tetap melekat selama berbulan-bulan sampai monosit tersebut dipanggil untuk melakukan fungsi pertahanan lokal spesifik serupa dengan makrofag jaringan yang apabila dirangsang dapat menjadi makrofag *mobile*. Gabungan keseluruhan monosit, makrofag jaringan, dan makrofag *mobile* disebut “sistem monosit-makrofag” yang tersebar luas di seluruh jaringan (Guyton dan Hall, 2011).

Sebagian besar efek pembunuhan yang dilakukan oleh sel inflamasi pada inflamasi kronis terjadi dari agen pengoksidasi yang dibentuk oleh enzim dalam membran fagosom atau oleh organel khusus yang disebut peroksisom. Agen

pengoksidasi ini meliputi superoksida (O_2^-), dan ion hidroksil (OH^-) yang merupakan ROS (Guyton dan Hall, 2011). Radikal superoksida terbentuk akibat perubahan O_2 menjadi (O_2^-), oleh NADPH *oksidase* karena dalam mencerna mikroba, monosit menggunakan oksigen dalam jumlah besar yang disebut proses *respiratory burst* (Birben dkk., 2012).

2.5 *Streptococcus mutans*

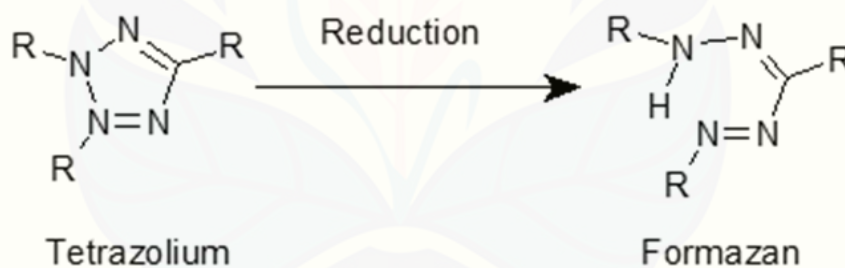
Clarke pada tahun 1924 mengisolasi suatu organisme dari lesi karies dan mengamati sel berbentuk oval tersebut merupakan bentukan mutan dari *streptococcus* hingga sekitar pertengahan tahun 1960 *S. mutans* dikenal sebagai penyebab utama karies gigi (Fatmawati, 2011). Bakteri berantai dua atau lebih ini tidak bergerak secara aktif dan memiliki diameter 0,5-0,7 μm . *S. mutans* memproduksi asam organik dalam jumlah besar dan memiliki kemampuan mensintesis glukosa ekstraseluler dari sukrosa sehingga *S. mutans* dapat menjadikan lingkungan sekitar hidupnya memiliki pH yang sangat rendah di bawah 5,5 (Lemos, 2013; Alfath dkk., 2013).

Pada karies aktif, selain pH yang dapat mencapai angka kurang dari 5, kerusakan pada gigi oleh bakteri dapat terus berlangsung hingga mengenai pulpa (Widayati, 2014). *Streptococcus mutans*, melalui karies gigi yang dalam, sangat mudah berinvasi ke sirkulasi darah. Invasi pada sirkulasi darah dapat merangsang respon inflamasi vaskular berupa rekrutmen serta aktivasi sel pertahanan tubuh untuk melawan *S. mutans* (Purwanto dan Susilawati, 2014; Purnamasari dkk., 2014). Selain polisakarida, *S. mutans* juga memproduksi antigen I/II berupa adesin yang memberikan efek immunomodulator pada sel manusia dan memiliki peran penting dalam menimbulkan gangguan inflamasi serta eksotoksin seperti *streptolysin O* (SLO) yang dapat menginduksi mediator inflamasi seperti TNF- α (Charlier dkk., 2002). *Streptococcus mutans* memiliki peptidoglikan yang dapat menginduksi peradangan dengan tujuan untuk mengeliminasi bakteri. Selain itu, toksin yang dihasilkan *S. mutans* juga dapat menyebabkan kerusakan sel endotel sehingga memicu kebocoran vaskular (hemoragi) yang dapat berlangsung beberapa jam atau berhari-hari. Hemoragi merupakan keadaan darah keluar dari

sistem kardiovaskular, disertai penimbunan dalam jaringan atau keluarnya darah dari tubuh. Infeksi pada stroke hemoragik berhubungan erat dengan infeksi *S. mutans* dan dianggap sebagai faktor risiko potensial pada pendarahan otak. Selain itu, *S. mutans* juga memproduksi mutacin (bakteriocin) untuk membantu kolonisasi pada proses pembentukan biofilm sekaligus dapat menghambat pertumbuhan bakteri lainnya (Basri dkk., 2014).

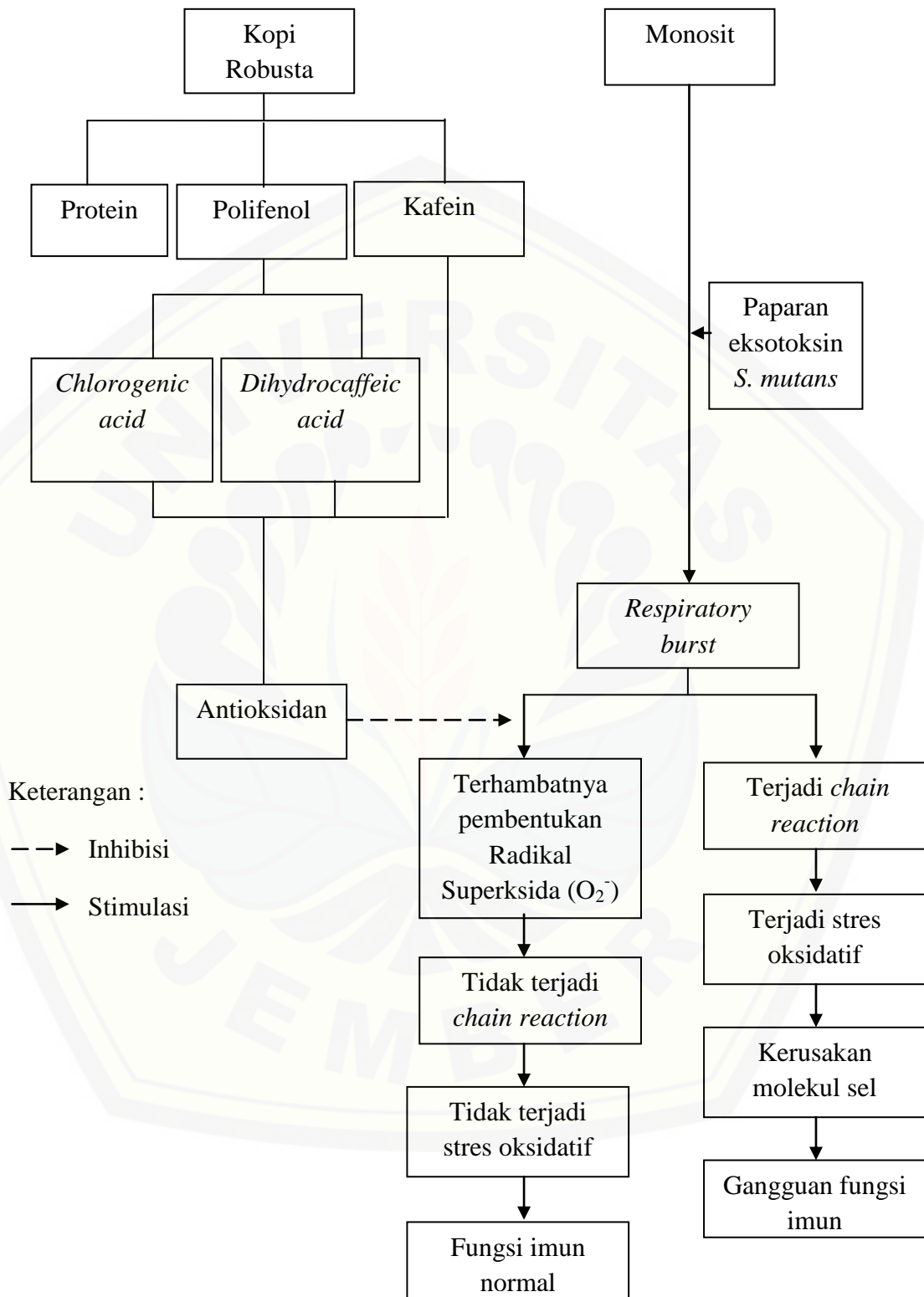
2. 6 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap Produksi Radikal Superoksida

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) yang merupakan bahan untuk melakukan uji teknik konvensional. Teknik ini adalah metoda spektrofotometri dengan menginduksi radikal superoksida yang nantinya akan bereaksi dengan NBT menghasilkan warna *formazan* ungu kebiruan (Rahman dkk., 2012). Gambar 2.9 menunjukkan reaksi NBT yang tereduksi menjadi *formazan* ungu kebiruan.



Gambar 2.9 Tetrazolium dan warna formazan
(Sumber: Kregiel, 2012)

2.7 Kerangka Konsep Penelitian



2.8 Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian

Radikal superoksida dalam tubuh dapat meningkat karena paparan eksotoksin *S. mutans*. Peningkatan radikal superoksida dapat menyebabkan stres oksidatif yaitu keadaan dimana radikal bebas tidak diimbangi dengan antioksidan yang memadai. Kopi *spray dried* tidak akan meninggalkan ampas saat dilakukan penyeduhan sehingga dapat memaksimalkan konsumsi antioksidan yang dapat ditemukan di ampas kopi pada umumnya. Antioksidan dalam kopi inilah yang menangkap radikal superoksida yang dihasilkan oleh aktivitas monosit terhadap eksotoksin *S. mutans* sehingga stres oksidatif yang dapat mengganggu fungsi imun dapat dihindari.

2.9 Hipotesis

Berdasarkan latar belakang dan landasan teori, hipotesis pada penelitian ini adalah seduhan kopi bubuk robusta *spray dried* memiliki potensi inhibisi terhadap produksi radikal superoksida monosit yang dipapar eksotoksin *Streptococcus mutans* secara in vitro.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *experimental laboratories in vitro* pada sel isolat monosit vena peripheral manusia. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post-test only control group design*, yaitu pengukuran terhadap kelompok yang diberi perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoadmodjo, 2010).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September-Desember 2018 di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah seduhan kopi bubuk *spray dried*

a. Definisi Operasional

Seduhan kopi bubuk *spray dried* adalah pelarutan kopi bubuk *spray dried* dalam aquades panas (90-96°C).

b. Metode

Kopi bubuk *spray dried* adalah kopi bubuk robusta yang melalui proses pengeringan menggunakan metode pengeringan *spray* menggunakan alat *spray drier* dalam suhu 140°C selama 6 jam.

c. Parameter

Seduhan kopi bubuk *spray dried* memiliki konsentrasi 1,5% yaitu dengan melarutkan 3 gram bubuk kopi dalam 200 ml air.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah produksi radikal superoksida monosit yang dipapar eksotoksin *S. mutans*

a. Definisi Operasional

Radikal superoksida yang diproduksi monosit (intrasel) setelah dipapar eksotoksin *S. mutans*.

b. Metode

Produksi radikal superoksida diuji dengan *Nitro Blue Tertazolium* (NBT) yang ditunjukkan melalui terbentuknya bercak biru kehitaman pada membran monosit yang merupakan *formazan blue* hasil reduksi nitroblue tetrazolium (Y-NBT) oleh radikal superoksida (O_2^-) (Dewi, 2016). Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan visualisasi menggunakan *optilab*.

c. Parameter

Persentase jumlah monosit yang memproduksi radikal superoksida dibandingkan dengan jumlah monosit secara keseluruhan.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah:

a. Isolat monosit

Monosit diambil dari individu yang sehat dengan teknik isolasi *single ficoll-paque density gradient centrifugation* (Corkum dkk., 2015).

b. Kopi bubuk biasa

Kopi bubuk robusta biasa merupakan kopi Gunung Ijen produksi PTPN XII Jember yang tidak melalui proses pengeringan *spray*.

c. Konsentrasi kopi

Penyeduhan kopi dilakukan dengan mencampurkan bubuk kopi sebesar 3 gram dan aquades panas (90-96°C) 200 ml sehingga konsentrasi yang didapatkan adalah 1,5%. Seduhan akan dimasukkan ke isolat monosit sehingga konsentrasi akhir yang diterima sel adalah 0,15%.

d. Eksotoksin *Streptococcus mutans*

Penelitian ini menggunakan bakteri *S. mutans* dalam media cair *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B) yang diambil eksotoksinnya sebagai *inducer* terjadinya *respiratory burst* pada monosit dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Jember. Eksotoksin didapatkan melalui filtrasi menggunakan *microfilter* 0,2 µm setelah sentrifugasi. Konsentrasi *S. mutans* yang digunakan adalah 1 Mc Farland atau setara dengan 6×10^8 Colony Forming Units/ml (Azarsina dkk., 2013).

d. Prosedur penelitian

Meliputi teknik pemeriksaan monosit dan media kultur monosit.

3.4 Sampel dan Kelompok Penelitian

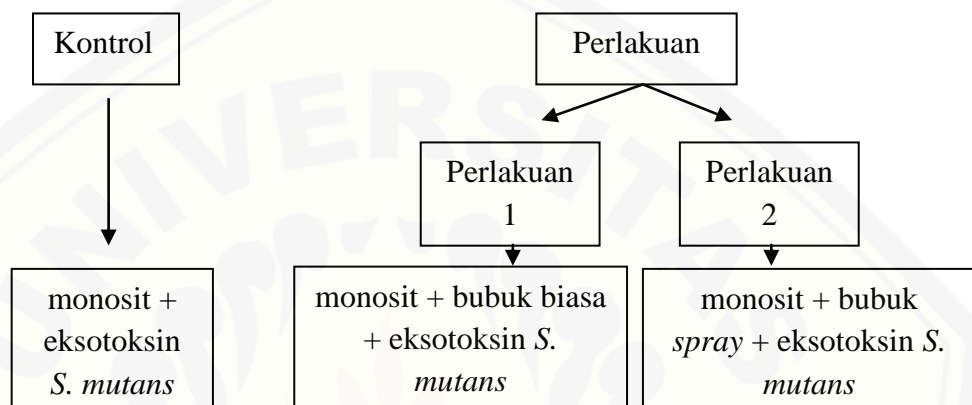
3.4.1 Kriteria Sampel Penelitian

Isolat monosit diambil dari darah vena perifer orang dewasa sehat yang diduga tidak memiliki kelainan sistemik dan tidak memiliki kebiasaan merokok serta bersedia mengisi *informed consent*. Kriteria dewasa sehat yaitu : (i) usia 20-25 tahun, (ii) BMI [tinggi badan (kg)/kuadrat tinggi badan (m)] normal (18,5-22,9), dan (iii) tidak adanya konsumsi obat selama 3 bulan terakhir.

3.4.2 Kelompok Penelitian

Penelitian ini terdapat 3 kelompok percobaan yang terdiri dari kelompok kontrol, kelompok perlakuan I, dan kelompok perlakuan II, sebagai berikut:

- Kelompok kontrol yaitu isolat monosit tanpa diinkubasi dengan seduhan kopi bubuk dan dipapar *S. mutans*.
- Kelompok perlakuan I yaitu isolat monosit yang diinkubasi dengan seduhan kopi bubuk biasa dan dipapar *S. mutans*.
- Kelompok perlakuan II yaitu isolat monosit yang diinkubasi dengan seduhan kopi bubuk *spray dried* dan dipapar *S. mutans*.



Gambar 3.1 Skema kelompok penelitian

3.4.3 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel yang digunakan untuk tiap kelompok dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus Daniel (2009) yaitu:

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

Keterangan :

n = besar sampel tiap kelompok

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

σ = standar deviasi sampel

d = kesalahan yang dapat ditolerir, dengan asumsi $\sigma = d$

Sehingga hasil yang didapat adalah sebagai berikut:

$$n = \frac{(1,96)^2 \sigma^2}{d^2}$$
$$= (1,96)^2$$
$$= 3,84 = 4$$

Jumlah sampel yang dibutuhkan minimal adalah 3 sampel tiap kelompok. Terdapat 4 kelompok pada penelitian ini sehingga total terdapat 12 sampel.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat Penelitian

a. Alat untuk prosedur sterilisasi

1. *UV sterilizer*
2. *autoclave*
3. oven

b. Alat untuk prosedur pembuatan seduhan kopi

1. gelas ukur
2. *hotplate stirrer*
3. tabung *falcon* 15 cc

c. Alat untuk prosedur Pembuatan Eksotoksin *Streptococcus mutans*

1. *erlenmeyer*
2. *sentrifuge*
3. *microfilter* 0,2 μm
4. densicheck

d. Alat untuk prosedur pengambilan darah dan isolasi monosit

1. tabung EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)
2. *blue tip*
3. *yellow tip*
4. *disposable syringe* 10cc

5. rak tabung
 6. *cover slip*
 7. *petridish*
 8. mikropipet
 9. *sentrifuge*
 10. *vortex*
 11. *laminar flow cabinet*
 12. *well plate culture 24*
 13. *incubator shaker*
- e. Alat untuk prosedur uji aktivitas antioksidan
1. *object glass*
 2. mikroskop cahaya
 3. *optilab*

3.5.2 Bahan Penelitian

- a. Bahan untuk prosedur sterilisasi
1. alkohol 70%,
 2. aluminium foil,
- b. Bahan untuk prosedur pembuatan seduhan kopi
1. kopi bubuk biasa
 2. kopi bubuk *spray dried*
 3. akuades steril
- c. Bahan untuk prosedur Pembuatan Eksotoksin *Streptococcus mutans*
1. *Streptococcus mutans*
 2. media BHI-B
- d. Bahan untuk prosedur pengambilan darah dan isolasi monosit
1. darah vena peripheral manusia (*heparinized whole blood*)
 2. media RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (Glico)
 3. *lymphoprep* (Medix)
- e. Bahan untuk prosedur uji aktivitas antioksidan
1. metanol absolut

2. pewarna gram *safranin*
3. *entellan*
4. *Nitro Blue Tetrazolium* (Skytech)

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pengurusan Surat Izin Penelitian dan *Ethical Clearance*

Surat izin penelitian ditujukan kepada Laboratorium *Bioscience* RSGM Universitas Jember dan *ethical clearance* diajukan kepada Komisi Etik FKG Universitas Jember.

3.6.2 Pembuatan Kopi Bubuk *Spray Dried*

Kopi *spray dried* diproses melalui pengeringan menggunakan metode pengeringan *spray* dengan alat *spray drier* dalam suhu 140°C selama 6 jam di Laboratorium Rekayasa Pengolahan Hasil Pertanian (RPHP) Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

3.6.3 Sterilisasi Alat

Semua alat dicuci bersih sebelum disterilkan kemudian alat yang terbuat dari bahan yang tidak tahan panas disterilisasi menggunakan alkohol agar terbebas dari invasi bakteri sedangkan alat yang terbuat dari bahan kaca dan logam seperti tabung *falcon*, tabung *eppendorf*, dibungkus dengan aluminium foil kemudian disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121° C selama 15 menit setelah itu dipindahkan ke oven selama 24 jam.

3.6.4 Pembuatan Eksotoksin *Streptococcus mutans*

Melakukan pencampuran 3,7 gram *Brain Heart Infusion Broth* dengan 100 ml aquades steril dalam *erlenmeyer* kemudian dipanaskan hingga mendidih. Menutup *erlenmeyer* dengan kapas kemudian memasukkan dalam *autoclave* dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Media BHI-B dapat digunakan setelah dimasukkan dalam *incubator* dengan suhu 37 °C selama 24 jam (Safaatin, 2018).

Pembuatan suspensi bakteri *S. mutans* menggunakan 4 ml BHI-B yang dicampurkan dengan 1 ose isolat bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya melakukan pengecatan gram untuk melihat morfologi bakteri dan menentukan konsentrasi bakteri dengan *densicheck* sebesar 1 Mc Farland atau setara dengan 6×10^8 Colony Forming Units/ml (Azarsina dkk., 2013). Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1700 rpm dengan suhu 20 °C selama 5 menit dan penyaringan suspensi dengan mikrofilter ukuran 0,2 µm untuk mendapatkan eksotoksin *Streptococcus mutans* (Sukma, 2018).

3.6.5 Prosedur Pembuatan Seduhan Kopi

a. Seduhan Kopi Bubuk

Pembuatan seduhan dilakukan dengan cara melarutkan 3 gram bubuk kopi biasa dengan 200 ml aquades panas (90-96°C).

b. Seduhan Kopi Bubuk *Spray Dried*

Pembuatan seduhan dilakukan dengan cara melarutkan 3 gram bubuk kopi *spray dried* dengan 200 ml aquades panas (90-96°C).

Masing-masing kelompok dimasukkan ke dalam tabung *falcon* dan digetarkan menggunakan *vortex* agar tercampur merata serta dilakukan penyaringan dengan *syringe filter 0.2µm*.

3.6.6 Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan darah vena periferah pada orang dewasa sehat yang telah mengisi *informed consent* menggunakan *disposable syringe* sebanyak 6 cc secara intravena pada *fosa cubiti*, kemudian memasukkan darah tersebut pada tabung EDTA dan digoyang-goyangkan hingga merata.

3.6.7 Prosedur Isolasi Monosit

1. Memasukkan darah yang telah sebanyak 6 ml diambil dari vena periferah subjek ke dalam tabung EDTA dan digoyang-goyangkan
2. Memasukkan darah ke dalam 2 tabung *falcon*

3. Melapiskan *lymprophep* dengan perbandingan 1:2 dengan darah secara hati-hati yaitu ujung mikro pipet ditempekan pada dinding tabung dan disemprotkan perlahan untuk mencegah pecahnya *ficoll*
4. Sentrifugasi dengan kecepatan 1900 rpm selama 20 menit pada suhu 20°C sehingga terbentuk 4 lapisan yaitu plasma darah, mononuklear, *lymprophep*, dan polimorfonuklear eritrosit
5. Mengambil lapisan kedua yaitu mononuklear dan memasukkan ke tabung *falcon*
6. Menambahkan media RPMI dengan perbandingan 1:1 pada *falcon*
7. Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1700 rpm selama 15 menit pada suhu 20°C
8. Membuang supernatan yang encer di atas dan mencampurkan endapan dengan media RPMI dengan perbandingan 1:1 pada *falcon*
9. Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1700 rpm selama 10 menit pada suhu 20°C
10. Suspensi 100 µl monosit dilapiskan ke *well plate culture 24* yang didasarnya diberi *coverslip* lalu diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 37 °C yang bertujuan untuk melekatkan monosit pada *coverslip*
11. Menambahkan 1 ml RPMI dan diinkubasi selama 30 menit suhu 37 °C
12. Mengamati di bawah mikroskop *inverted* dengan menggoyang secara perlahan untuk memastikan perekatan sel
13. Pencucian dengan RPMI 500 µl sebanyak 2x

3.6.8 Inkubasi Monosit dengan Sediaan Kopi

Isolat monosit diinkubasi dengan seduhan kopi sebanyak 100 µl. Pada kelompok kontrol tidak diberi seduhan kopi bubuk tetapi diberi RPMI untuk mempertahankan kehidupan sel, pada kelompok perlakuan I ditambahkan seduhan kopi bubuk biasa dan pada kelompok perlakuan II ditambahkan seduhan kopi bubuk *spray dried*. Selanjutnya diletakkan pada *incubator shaker* selama 1,5 jam.

3.6.9 Pemaparan Eksotoksin *Streptococcus mutans*

Menambahkan suspensi *S. mutans* sebanyak 100 µl dengan konsentrasi 1 Mc Farland pada masing-masing *well* pada tiga kelompok yang berbeda kemudian dilakukan inkubasi dengan *incubator shaker* selama 1,5 jam pada suhu 37 °C.

3.6.10 Uji Pengukuran Produksi Radikal Superoksida

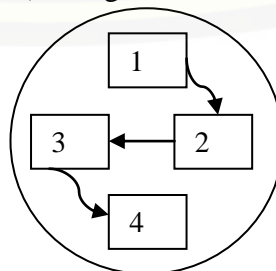
Prinsip kerja: menggunakan metode NBT untuk melihat dan melakukan perhitungan jumlah monosit yang memiliki bercak *formazan* ungu kebiruan pada membran dan sitoplasmanya

1. Menambahkan 250 µl NBT pada masing-masing *well*
2. Membuang medium RPMI pada *well* dan dicuci dengan HBSS 50 µl
3. Meambahkan 100 µl metanol absolut pada masing-masing *well* diratakan memenuhi *coverslip* dan diinkubasi selama 3 menit
4. Mengeringkan *coverslip* pada masing-masing *well*
5. Melakukan pengecatan dengan cat gram *safranin* hingga merata menutupi seluruh bagian *coverslip* selama 15 menit
6. Melakukan pencucian dengan aquades steril sebanyak 2 x
7. Mengeringkan *coverslip* pada masing-masing *well*
8. Menempelkan *coverslip* pada *object glass* dengan *etellan*
9. Melakukan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x dan visualisasi dengan *optilab*

Pengamatan dilakukan oleh 3 orang dengan hasil berupa rata-rata perhitungan.

Produksi radikal superoksida (%) = $\frac{\text{Jumlah monosit yang memproduksi}}{\text{Jumlah monosit seluruhnya}} \times 100\%$

Jumlah monosit seluruhnya
(Preanger dkk., 2016)

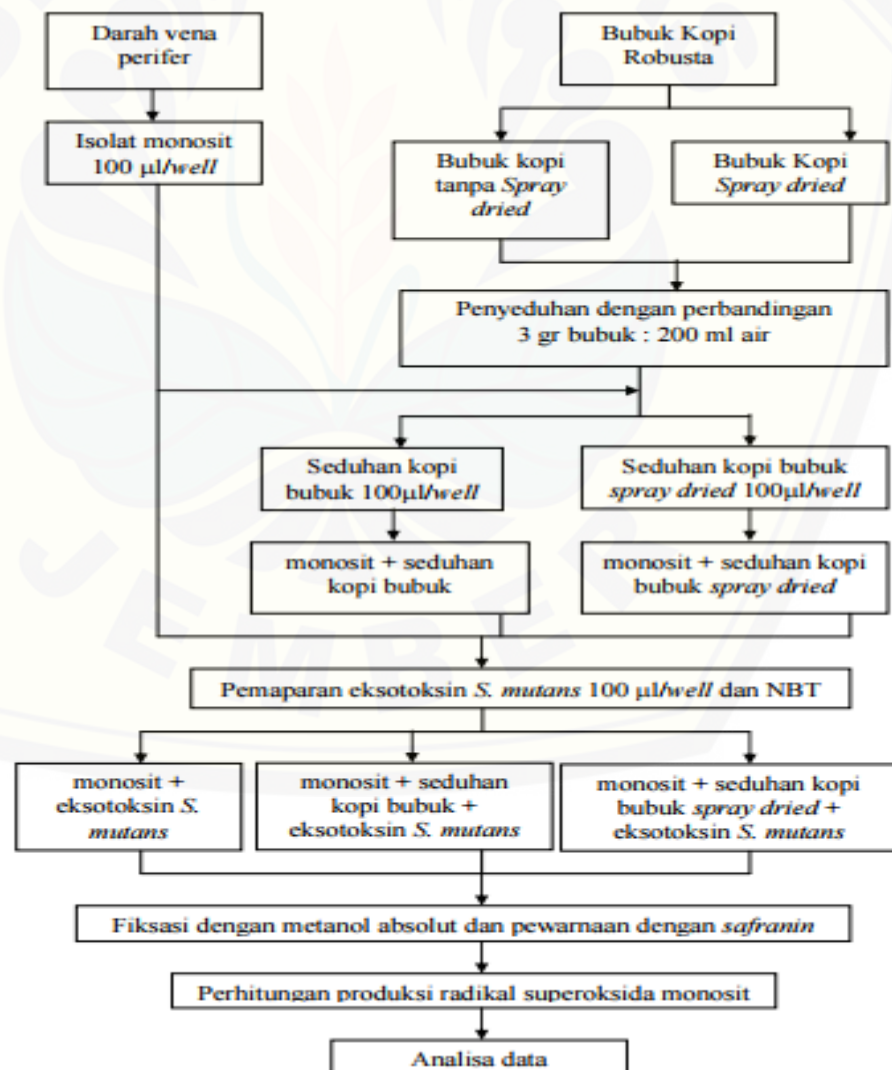


Gambar 3.2 Alur pembacaan lapang pandang

3.7 Analisa Data

Penelitian ini menggunakan uji *Shapiro Wilk* untuk uji normalitas dan uji Levene untuk uji homogenitas pada data yang dihasilkan. Apabila data yang dihasilkan berdistribusi normal ($p > 0,05$) dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *One Way ANOVA* dan uji *LSD (Least Significant Differences)* untuk menilai perbedaan yang bermakna pada setiap kelompok. Jika data yang dihasilkan tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$) maka analisa data menggunakan uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis* dan uji *Mann Whitney* untuk menilai perbedaan yang bermakna pada setiap kelompok.

3.8 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Seduhan bubuk kopi robusta *spray dried* dapat menghambat produksi radikal superoksida monosit yang dipapar eksotoksin *Streptococcus mutans* secara *in vitro*.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya tentang konsentrasi seduhan kopi robusta *spray dried* berbeda yang memiliki potensi inhibisi produksi radikal superoksida monosit.
2. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya mengenai inhibisi seduhan kopi robusta *spray dried* terhadap produksi radikal superoksida monosit yang dipapar eksotoksin *Streptococcus mutans* secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriliana, A. 2018. *Teknologi Pengolahan Kopi Terkini*. Yogyakarta. Deepublish CV Budi Utama.
- Alfath, C.R., Vera Y., dan Sunnati. 2013. Antibacterial Effect of Granati Fructus Cortex Extract on Streptococcus Mutans in Vitro. *Journal of Dentistry Indonesia*, 20: 5-8.
- Almada P. D. 2009. *Pengaruh Perubahan Proses Dekafeinasi Kopi dalam Reaktor Kolom Tunggal Terhadap Mutu Kopi*. Universitas Pertanian Bogor.
- Azarsina, M., S. Kasraei, R. Yousefi-Mashouf, N. Dehghani, M. Shirinzad. 2013. The Antibacterial Properties of Composite Resin Containing Nanosilver against Streptococcus mutans and Lactobacillus. *The Journal of Contemporary Dental Practice* 14(6):1014-1018.
- Baratawidjaja, K. G., dan Rengganis, I. 2013. *Imunologi Dasar Edisi ke-10*. Jakarta. Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Baratloo, A., Mohammad M. F., Mazieh A., Rouhipour A., Saeed S., dan Negida A. 2016. *The Role of Caffeine in Pain Management: A Brief Literature Review*. Anesthesiology and Pain Medicine Inpress.
- Basri, Nasution, A. I., Bachtiae, B. M., Nurtami. 2014. Potensi Mutacin *Streptococcus mutans* Sebagai Inhibitor Collagen Binding Protein Pada Sel Endotel Kaitan dengan Stroke Haemoragik dan Endocarditis. *Laporan Akhir Hibah Penelitian Kerjasama Antar Perguruan Tinggi (Pekerti): 496.a /UN11/S/LK-BOPT/2014*.
- Belščak-Cvitanović, A., S. Lević, A. Kalušević, I. Špoljarić, V. Dorđević, D. Komes, G. Mršić, V. Nedović. 2015. Efficiency Assessment of Natural Biopolymers as Encapsulant of Green tea (*Camellia sinesis* L.) Bioactive Compounds by Spray Drying. *Food Bioproc. Technol.* 8: 2444-2460.
- Daniel, W. 2009. *Biostatistic Foundation for Analysis in The Health Science 9th edition*. United State of America. Wiley.
- Charlier, N. T., Joelle O., Dino M., dan Jean C. 2002. Crystal Structure of the V-Region of *Streptococcus mutans* Antigen I/II at 2.4 Å Resolution Suggest a Sugar Preformed Binding Site. *Journal of Molecular Biology* 318 (1): 179-188.
- Corkum, C. P., Ings, D. P., Burgess, C., Karwowska, S., Kroll, W., dan Michalak, T. I. 2015. Immune Cell Subsets and Their Gene Expression Profiles from

- Human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT) and Staandart Density Gradient. *BMC Immunology* 16(48).
- Curnutte, J.T., Orkin, S. H., dan Dinauer, M.C. 2011. Genetic disorders of phagocyte function. In: Stamatoyannopoulos G, ed. *The molecular basis of blood diseases. In Press.*
- Desai, K. G. H. dan Park H. J. 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Dry Technol.* 23: 1361-1394.
- Dewi, S. P. I. 2016. Aktivitas Antioksidan Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Terhidrolisis Terhadap Radikal Superoksida Neutrofil In Vitro. *Skripsi. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.*
- Dewo, M. 2013. *Gendola: Obat Dewa Penakluk Aneka Penyakit.* Jakarta: Fmedia.
- Dupas, C. J., Agnes C. M. B., Claire S. O., Farrice M. G. D., dan Marie. N. M. 2006. Coffee Antioxidant Properties: Effect of Milk Addition and Processing Conditions. *Journal of Food Science* 71(3): 253-258.
- Erel, Ozcan. 2003. A Novel Automated Method to Measure Total Antioxidant Response Against Potent Free Radical Reactions. *Chemical Biochemistry* 37: 112-119.
- Eslami, H., Ali Z., Firoz P., Vahid F., Parisa F., dan Roya R. S. 2016. Assessment of Relationship between *Streptococcus mutans*, Dental Caries and TGF- β . *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 6(56): 20-22.
- Es-safi, N.E., Ghidouche, S., dan Ducrot, P.H. 2007. Flavonoids, Hemisynthesis, Reactivity, Characerization, and Free Radical Scavenging Activity. *Molecule* 12(9): 2228-2258.
- Farah, A. 2012. *Coffee: Emerging Health Effect And Disease Prevention.* Oxford: Wiley-Blackwell.
- Farhaty, N. dan Muchtaridi. 2016. Tinjauan Kimia dan Aspek Farmakologi Senyawa Asam Klorogenat pada Biji Kopi: Review. *Farmaka Suplemen* 14(1): 214-227.
- Fatmawati, D. W. A. 2011. Hubungan Biofilm *Streptococcus mutans* terhadap Resiko Terjadinya Karies Gigi. *Stomatognatic Jurnal Kedokteran Gigi UNEJ* 8(3): 127-130.
- Fattah, M. H. A. 2016. *Mukjizat Hebat dalam Al-Qur'an: Volume 2.* Jakarta: Mirqat.
- Forssten, S. D., Bjorklund, M., dan Ouwehand, A. C. 2010. *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models. *Nutrients* 2(3): 290-298.

- Ghirişan, A. dan Vasile M. 2017. Comparative Study of Spray-Drying and Freeze-Drying On The Soluble Coffee Properties. *Studia UBB Chemia LXII* (4): Tom II 309-316.
- Guyton, A. C dan Hall J. E. 2011. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi 12*. Jakarta: EGC.
- Hamdan, D. dan Aries S. 2018. *Coffee: Karena Selera Tidak Dapat Diperdebatkan*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Herlinawati, L. 2016. *Kajian Konsentrasi Maltodekstrin dan Polivinil Piroolidon (PVP) Pada Tablet Effervescent Kopi Robusta (Coffea robusta Lindl)*. Thesis. Universitas Pasundan.
- Handajani, A., Roosihermiatie B., dan Maryani H. 2010. Faktor-faktor yang Berhubungan dengan Pola Kematian Pada Penyakit Degeneratif di Indonesia. *Buletin Penelitian Sistem Kesehatan* 13(1): 42-53.
- Hoffman, J. 2014. *The World Atlas of Coffee: From beans to Brewing - Coffees Explored, Explained, and Enjoyed*. Hachette: OCTOPUS.
- Idawanni. 2015. Pengolahan Pasca Panen Kopi. BPTP Balitbangtan Aceh. Kementrian Pertanian Indonesia. <http://nad.litbang.pertanian.go.id/ind/index.php/info-teknologi/664-pengolahan-pascapanen-kopi>. [Diakses pada 29 Mei 2018].
- Ishwarya, P. dan Chinnaswamy, A. 2014. *Spray-Freezing-Drying Approach for Soluble coffee Processing and Its Effect on Quality Characteristic*. *Journal of Food Engineering* 149: 171-180.
- Isnindar, S. W, dan S. Widyarini. 2017. Aktivitas Antioksidan Buah Kopi Hijau Merapi The Antioxidant Activity of Green Coffee Cherries at Merapi. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research* 02: 130-136.
- ITIS. 2011. Flora of China, *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner. Taxonomic Serial No.: 506060. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=506060&print_version=PRT&source=to_print#null. [Diakses pada 27 Mei 2018].
- Juliantari, N. P D., Wrsiati, L. P., dan Wartini, N. M. 2018. Karakteristik Ekstrak Ampas Kopi Bubuk Robusta (*Coffea Canephora*) pada Perlakuan Konsentrasi Pelarut Etanol dan Suhu Maserasi. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri* 6(3): 243-249.

- Kementrian Pertanian. 2016. Outlook Kopi: Komoditas Pertanian Subsektor Perkebunan. Pusat data dan Sistem Informasi Sekretariat Jendral Kementrian Pertanian.
- Kregiel, D. 2012. Succinate Dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* – The Unique Enzyme of TCA Cycle – Current Knowledge and New Perspectives. *Dehydrogenases Intech* 211-234.
- Lemos, J.A., Quivey R.G. Jr., Koo H., dan Abranches J. 2013. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm. *Microbiologi Society* 159(3): 436.
- Liao, S. 2014. *Streptococcus mutans* Extracellular DNA is Upregulated during Growth in Biofilms, Actively Released via Membrane Vesicles, and Influenced by Components of the Protein Secretion Machinery. *Journal of Bacteriology American Society for Microbiology* 196(13) : 2355-2366.
- Lingga, L. 2012. *The Healing Power of Antioxidant*. Jakarta: Gramedia.
- Marliana, E. 2012. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Andong (*Cordyline fruticosa* L) A. Cheval. *Mulawarman Scientifie* 11(1).
- Marsh, P. D., Michael V. M., Michael A.O.L., dan David W. W. 2009. *Oral Microbiologi : Fifth Edition*. China: Churchill Livingstone Elsevier.
- Maruf, A. A. dan O'Brien, P. 2014. Flutamide-Induced Cytotoxicity and Oxidative Stress in an *In Vitro* Rat Hepatocyte System. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014(1): 1-9
- Mescher, A. L. 2011. *Histologi Dasar Junqueira Teks dan Atlas*. Jakarta: EGC.
- Mizfar, F. dan Aldon S. 2015. Analisis Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Perilaku Konsumen dalam Pengambilan Keputusan Pembelian Kopi Instan. *Jurnal Sosial Ekonomi Pertanian dan Agribisnis* 11(2): 175-180.
- Mussatto , S. I., Ercilia M. S. M., Silvia M., dan José A. T. 2011. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol* 4:661–672.
- Nimse, S. B. dan Pal, D. 2015. Free Radicals, Natural Antioxidants, and Their Reaction Mechanism. *Journal of The Royal Society and Chemistry* 2015 5: 27986-28006
- Niseteo, Tena Drazhenka K., Ana Belščak-Cvitanović, dan Dunja H. Maja B. 2012. Bioactive Composition and Antioxidant Potential of Different Commonly Consumed Coffee Brews Affected by Their Preparation Technique and Milk Addition. *Journal of Science Direct Food Chemistry* 134: 1870–1877.

- Notoatmodjo. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: PT. Rineka Cipta.
- Oliveira, B. F., Machado, J. A. N., dan Chaves, M. M. 2010 The Role of Oxydative Stress in the Aging Process. *The Scientific World Journal* 2010(10): 1121-1128
- Olivia, F. 2014. *Khasiat Bombastis Kopi*. Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Preanger, C., Utama, I. H., Kardena, I. M. 2016. Gambaran Ulas Darah Ikan Lele di Denpasar Bali. *Indonesia Medicus Veterinus* 5(2): 96-103.
- Prastowo, B. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Kementrian Pertanian. Jakarta. *Indonesian Agency for Agricultural Research and Development Press* (IAARD Press).
- Purnamasari, I. W., Pudji A., Tantin E. 2014. Viabilitas Neutrofil yang Diinkubasi dalam Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza*) dan Dipapar dengan *Streptococcus mutans*. Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. *Dentofasial* 13(3): 135—140.
- Purwanto, & Susilawati I. D. A. 2014. Induksi *Streptococcus mutans* terhadap Aktivitas Proteinase Netrofil pada Degradasi Kolagen Tipe IV. *Jurnal Pustaka Kesehatan* 2 (1): 160-166.
- Rahardjo, P. 2012. *Kopi Panduan Budi Daya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rahardjo, P. 2017. *Berkebun Kopi*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rahman, H., Kartawinata, T. G., dan Julianti E. 2012. Uji Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase dalm Ekstrak Mesokarp Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamarck) Menggunakan Densitometri Citra Elektrofogram. *Acta Pharmaceutica Indonesia* 37(2).
- Safaatin, A. 2018. Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta Terhadap Radikal Superoksida Neutrofil In Vitro. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Samuel. 2018. Pengaruh Allopurinol Terhadap Kadar Glutathione Sulphydryl (GSH), Nilai % Vep₁, Six Minute Walking Test, dan Skor Cat Pasien Penyakit Paru Obstruktif Kronik (Ppok) Stabil. *Thesis*. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Sukma, P. V. 2018. Aktivitas Antioksidan Bubuk Kopi Robusta (*Coffea canephora*) terhadap Produksi Superoksida Monosit in Vitro. *Skripsi*. Jember. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

- Sun-Waterhouse, D., S. S. Wadhwa, dan G. I. N. Waterhouse. 2013. Spray Drying Microencapsulation of Polyphenol Bioactives: A Comparative Study Using Different Natural Fibre Polymers as Encapsulant. *Food Bioproc. Tech.* 6: 2376-2388.
- Susilawati, I. D. A. 2018. Laporan Penelitian Fitokimia.
- Toyama, D. O., Paulete R., Marcelo J. P. F., Oriana, A. F., Henrique H. G., and Marcos H. T. 2014. Effect of Chlorogenic Acid (5-Caffeoylquinic Acid) Isolated from *Baccharis oxyodonta* on the Structure and Pharmacological Activities of Secretory Phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (2): 726585.
- Vicente, S. J. V., Emilia Y. I., dan Elizabeth A. S. T. 2014a. Coffee Modulates Transcription Factor Nrf2 and Highly Increases The Activity of Ntioxidant Enzymes in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(2): 116-122.
- Vicente, S. J. V. V., Yara S. Q., Sabina L. D. G., dan Elizabeth A. S. d. A T. 2014b. Stability of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Regular and Decaffeinated Coffees. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57(1): 110-118.
- Werdhasari, A. 2014. Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia* 3(2): 59-68.
- Widayati, N. 2014. Faktor yang Berhubungan dengan Karies Gigi pada Anak Usia 4-6 Tahun. *Jurnal Berkala Epidemiologi* 2(2): 196-205.
- Winarno, F. G., Wida W., A. Driando A. W. 2015. *Telomer, Membalik Proses Penuaan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. *Media Litbangkes* 24(2).
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Yashin, A., Yakov Y., Jin Y. W., Boris N. 2013. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Journal of Antioxidants (Basel)* 2(4): 230–245.
- Yuslianti, E. R. 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Yogyakarta: Deepublish Publisher.
- Yusmarini. 2011. Senyawa Polifenol pada Kopi: Pengaruh Pengolahan, Metabolisme dan Hubungannya dengan Kesehatan. *SAGU* 10(2): 22-30.
- Yuwono, Sudarminto S., dan Elok W. 2017. *Teknologi Pengolahan Pangan Hasil Perkebunan*. Malang. UB Press.

LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Izin Penelitian



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

Nomor : 2844/UN25.8.T1/2018
Perihal : Izin Penelitian

Yth. Direktur RSGM
Universitas Jember
di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan izin penelitian bagi mahasiswa kami di bawah ini:

Nama : Asmaradita Nourisha Isthi
NIM : 151610101093
Semester/Tahun : VII / 2018-2019
Fakultas : Kedokteran Gigi
Alamat : Jl. Danau Toba VII no 222a
Judul Penelitian : Aktivitas Antioksidan Seduhan Kopi Robusta *Spray Drying* terhadap Produksi Radikal Superoksida Monosit yang Dipapar *Streptococcus mutans In Vitro*
Lokasi Penelitian : Laboratorium Bioscience RSGM UNEJ
Alat yang dipinjam : *Laminar flow, mikropipet*, dll.
Waktu : Agustus 2018-selesai
Tujuan Penelitian : Menganalisis aktivitas antioksidan seduhan kopi robusta *spray drying* terhadap produksi radikal superoksida monosit yang dipapar *Streptococcus mutans in vitro*
Dosen Pembimbing : 1. Dr. drg. IDA Susilawati, M. Kes.

Demikian atas perhatian dan kerjasamanya disampaikan terima kasih.

Jember, 25 September 2018
an. Dekan
Wakil Dekan I,

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

Lampiran B. *Ethical Clearance*

	<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</p>
<p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL <u>No. 111/UN25.8/KEPK/DL/2018</u></p>	
Title of research protocol	: "The Effect of Spray Drying Robusta Coffee Brew on the Viability of Neuthropil Exposed by <i>Streptococcus mutans</i> In Vitro"
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Asmaradita Nourisha Isthi
Member of research	: Fiftiani Syarah
Responsible Physician	: Asmaradita Nourisha Isthi
Date of approval	: August 10 th , 2018
Place of research	: Laboratorium of Bioscience Faculty of Dentistry Universitas Jember
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p>	
<p>Jember, August 14th, 2018</p>	
<p>Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>	<p>Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember</p>
	
<p>(Pardyan P. M. Kes, Sp. Pros)</p>	<p>(Prof. Dr. Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.S)</p>

Lampiran C. Surat Identifikasi Bakteri



**LABORATORIUM MIKROBIOLOGI FAKULTAS
MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM (MIPA) JURUSAN BIOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER**

Jalan Kalimantan III No. 23 FMIPA, Universitas Jember
Jawa Timur 68123

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

Sehubungan dengan keperluan identifikasi bakteri yang digunakan
Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA oleh:

Nama : 1. Asmaradita Nourisha Isthi (151610101093)
2. Fiftiani Syarah (151610101123)
Instansi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

melalui pengecatan Gram dan pengamatan mikroskopis menunjukkan
bahwa bakteri tersebut adalah *Streptococcus mutans*.

Jember, 8 Oktober 2018

Kepala Laboratorium Mikrobiologi

Drs. Rudju Winarsa, M. Kes
NIP. 196008161989021001

Lampiran D. Lembar Persetujuan (*Informed Consent*)**SURAT PERSETUJUAN
(INFORMED CONCENT)**

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama :

Fakultas/NIM :

Usia :

Jenis Kelamin :

Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari :

Nama : Asmaradita Nourisha Isthi

Fakultas/NIM : Kedokteran Gigi / 151610101093

Alamat : Jl. Danau Toba Gang 7 no 222a

No Telp : 085704263227

Dengan judul penelitian skripsi “Inhibisi Seduhan Kopi Robusta *Spray Dried* terhadap Produksi Radikal Superoksida Monosit yang Dipapar *Streptococcus mutans* secara *In Vitro*”, dimana prosedur pelaksanaan untuk pengambilan sampel ini tidak akan menimbulkan resiko dan ketidaknyamanan pada subyek yang bersangkutan.

Saya telah membaca atau telah dibacakan prosedur penelitian yang terlampir dan telah diberi kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan diberi jawaban yang jelas. Dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan saya menyatakan sukarela dan bersedia menjadi subyek dalam penelitian ini.

Jember,

Yang menyetujui,

Subyek penelitian

.....

Lampiran E. Alat dan Bahan Penelitian

E.1 Alat penelitian



Oven



Autoclave



Blue tip



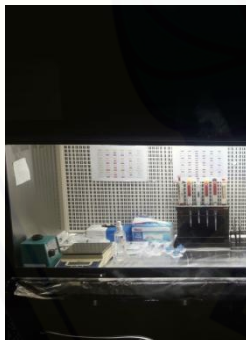
Yellow tip



Tabung heparin



Tourniquet



Laminar air flow



Tabung Falcon 15mL



Cover slip



Disposable syringe



Well plate 24



Mikroskop cahaya



Inkubator shaker



Pipet mikro



Vortex



Petridish kecil



Centrifuge



Syringe filter



Timbangan



Densichk



Optilab

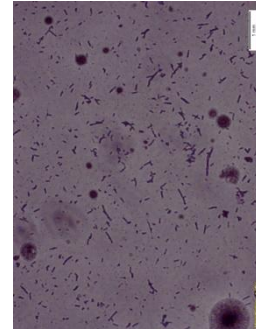
E.2 Bahan Penelitian



Lymphoprep



Safranin



Streptococcus mutans



Alkohol



Media Culture



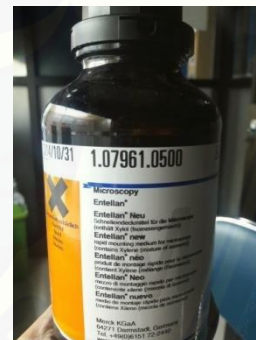
Darah vena perifer



Kopi spray dried



Kopi bubuk biasa

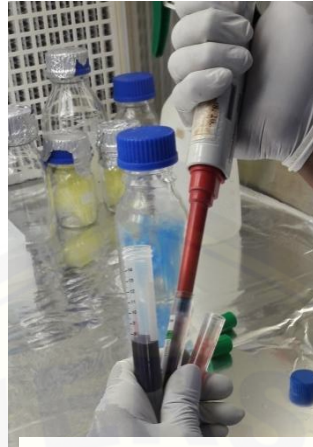


Etellan

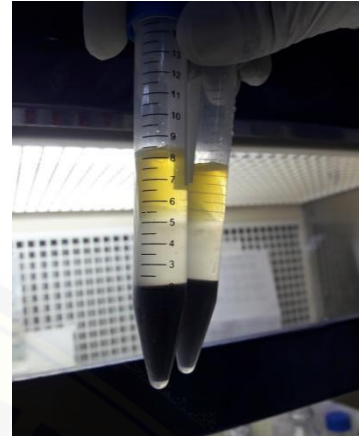
Lampiran F. Prosedur Penelitian



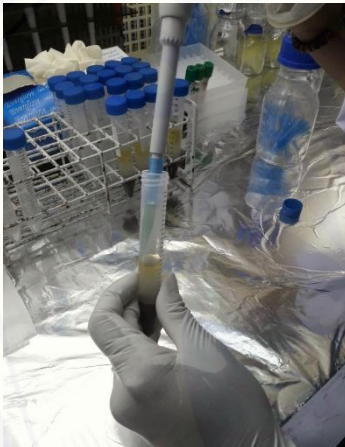
Pengambilan sampel darah



Memasukkan ke lymphoprep 1:2



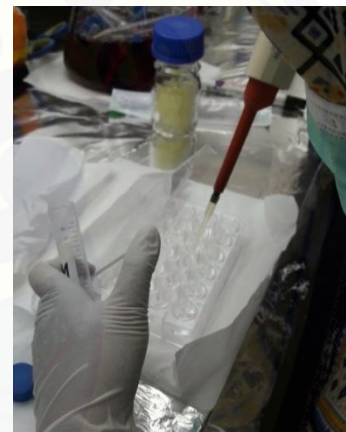
Sentrifugasi (Hasil Sentrifugasi)



Mengambil lapisan mononuklear



Penambahan media kultur



Penempelan sel



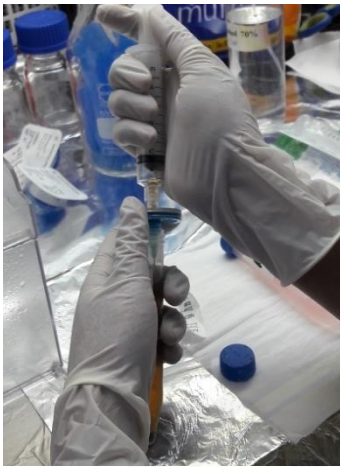
Pencucian sel



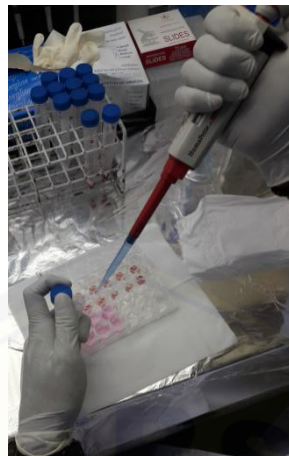
Inkubasi 30 menit



Pembuatan seduhan kopi



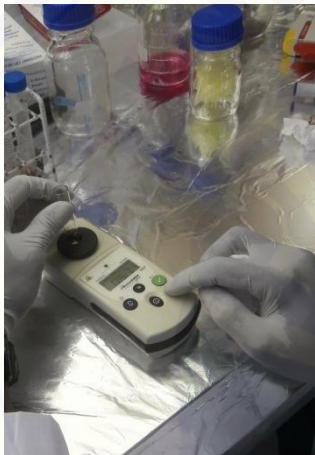
Penyaringan hasil sentrifugasi kopi



Perlakuan kopi 100 μ l



Inkubasi 90 menit



Penentuan konsentrasi bakteri



Perlakuan eksotoksin 100 μ l



Inkubasi 90 menit



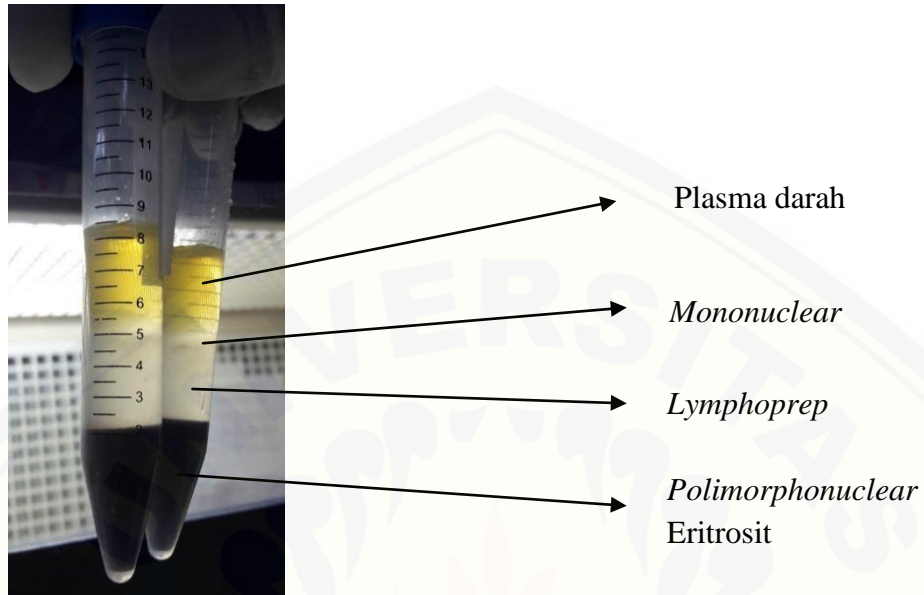
Persiapan pewarnaan



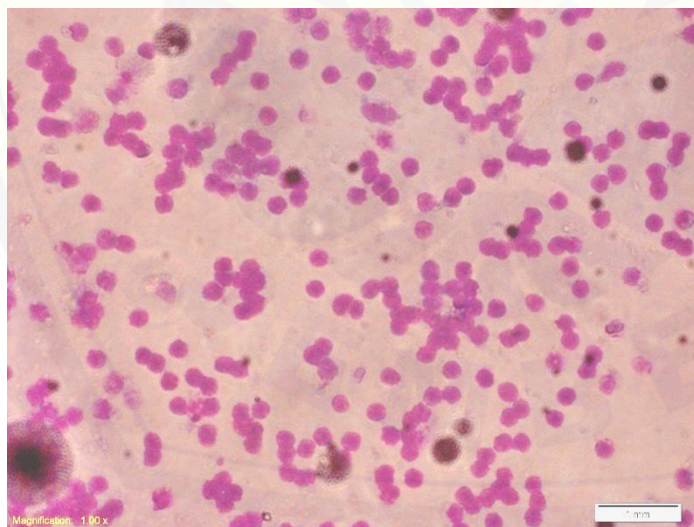
Penempelan *coverslip*

Lampiran G. Gambaran Hasil Isolasi Monosit

G.1 Hasil Setrifugasi Prosedur Isolasi Monosit

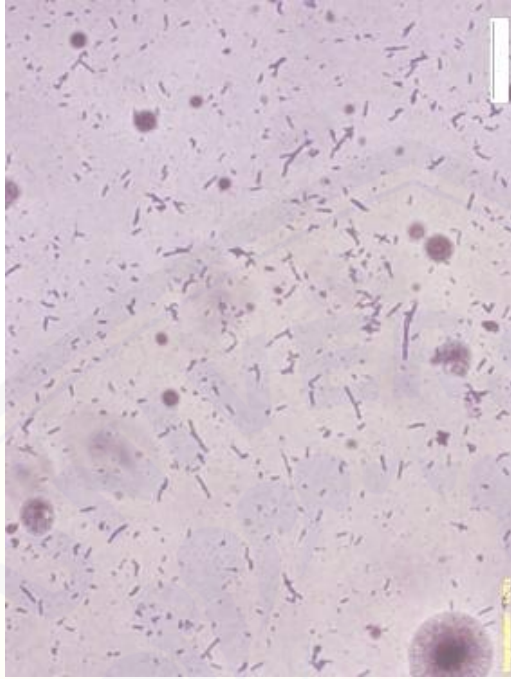


G.2 Gambaran Mikroskopis Hasil Isolasi Monosit Pewarnaan Giemsa



Gambaran mikroskopis isolasi monosit pengecatan giemsa perbesaran 400x

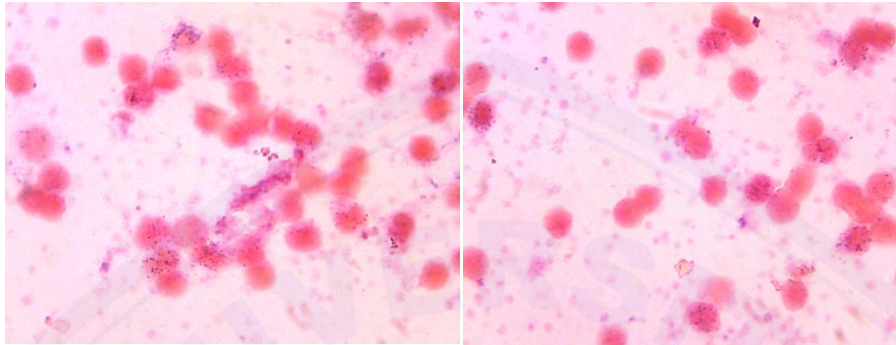
Lampiran H. Gambaran Hasil Pengecatan Gram Bakteri



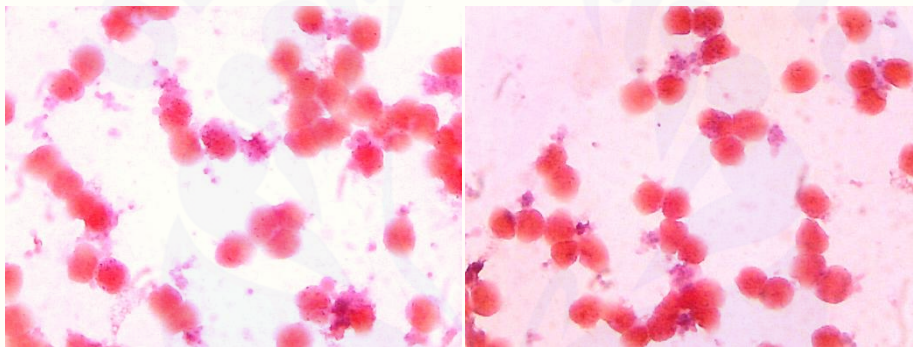
Gambaran mikroskopis *Streptococcus mutans* dengan perbesaran 400x

Lampiran I. Gambaran Mikroskopis Monosit yang memproduksi Radikal Superoksida

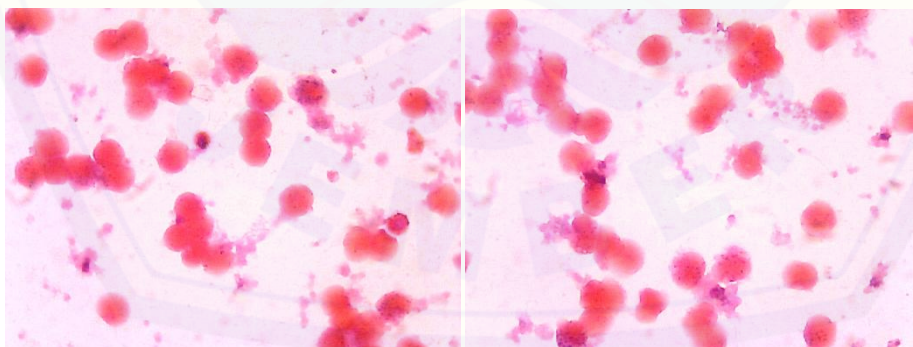
I.1 Kontrol (Monosit + Eksotoksin)



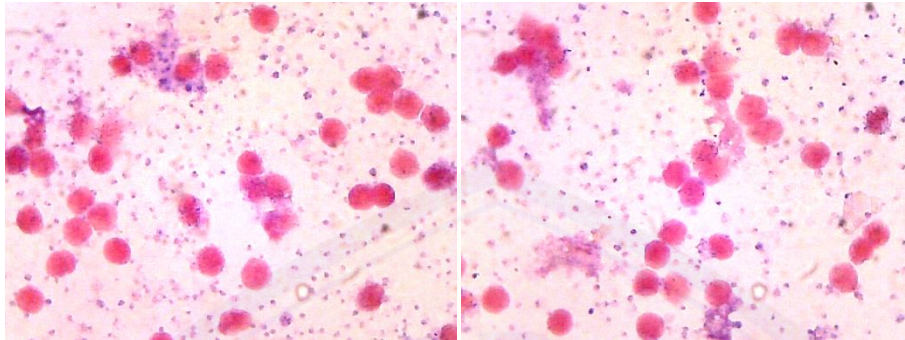
I.2 Perlakuan I (Monosit + Kopi Bubuk Biasa + Eksotoksin)



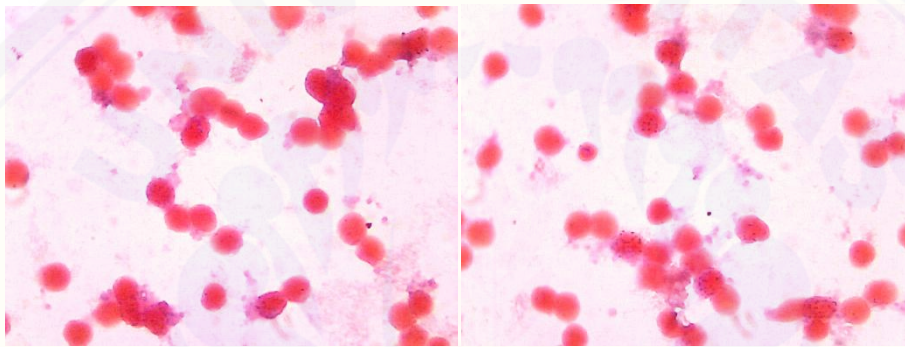
I.3 Perlakuan II (Monosit + Kopi Bubuk *Spray Dried* + Eksotoksin)



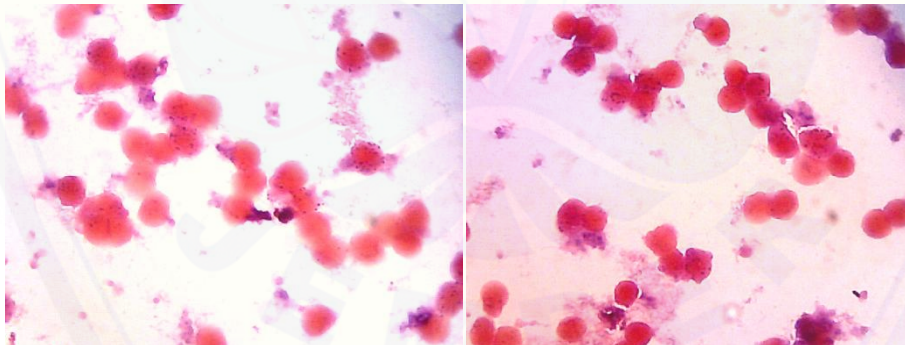
I.4 Monosit



I.5 Monosit + Kopi Bubuk Biasa



I.6 Monosit + Kopi Bubuk *Spray Dried*



Lampiran J. Tabel Persentase Perhitungan Jumlah Monosit

J.1 Kontrol (Monosit + Eksotoksin)

	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4
Pengamat 1	19,22	22,17	22,38	25,82
Pengamat 2	20,38	22,75	23,40	26,75
Pengamat 3	19,53	21,88	23,43	26,28
Rata-Rata	19,71	22,27	23,08	26,29
Total Rata-rata				22,84

J.2 Perlakuan I (Monosit + Kopi Bubuk Biasa + Eksotoksin)

	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4
Pengamat 1	19,19	20,13	20,84	17,86
Pengamat 2	18,31	19,90	21,53	18,75
Pengamat 3	18,36	19,01	21,23	18,38
Rata-Rata	18,62	19,68	21,20	18,33
Total Rata-rata				19,46

J.3 Perlakuan II (Monosit + Kopi Bubuk *Spray Dried* + Eksotoksin)

	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4
Pengamat 1	15,90	12,88	18,74	20,63
Pengamat 2	16,99	14,41	20,40	20,32
Pengamat 3	17,09	15,14	18,03	20,39
Rata-Rata	16,67	14,15	19,06	20,45
Total Rata-rata				17,58

J.4 Monosit

	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4
Pengamat 1	14,90	8,99	4,75	9,45
Pengamat 2	18,88	9,77	6,30	8,01
Pengamat 3	17,85	7,61	4,79	9,05
Rata-Rata	17,21	8,79	5,28	8,84
Total Rata-rata				10,03

J.5 Monosit + Kopi Bubuk Biasa

	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4
Pengamat 1	16,21	13,96	15,91	12,87
Pengamat 2	16,61	13,26	14,50	13,52
Pengamat 3	16,40	13,14	13,80	14,57
Rata-Rata	16,41	13,46	14,74	13,66
Total Rata-rata				14,48

J.6 Monosit + Kopi Bubuk *Spray Dried*

	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4
Pengamat 1	15,13	14,93	6,96	11,00
Pengamat 2	17,24	13,70	8,40	10,52
Pengamat 3	14,80	14,97	8,85	11,00
Rata-Rata	15,73	14,53	8,07	10,84
Total Rata-rata				12,29

Lampiran K. Analisis Data

K.1 Uji Normalitas

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ProduksiRadikal Kontrol	.214	4	.	.982	4	.914
Perlakuan I (KB)	.241	4	.	.913	4	.497
Perlakuan II (KS)	.203	4	.	.971	4	.846

a. Lilliefors Significance Correction

K.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

ProduksiRadikal

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.989	2	9	.409

K.3 Uji One Way Anova

ANOVA

ProduksiRadikal

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	56.740	2	28.370	5.090	.033
Within Groups	50.161	9	5.573		
Total	106.901	11			

K.4 Uji LSD

Multiple Comparisons

ProduksiRadikal
LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Perlakuan I (KB)	3.38000	1.66934	.074	-.3963	7.1563
	Perlakuan II (KS)	5.25500 [*]	1.66934	.012	1.4787	9.0313
Perlakuan I (KB)	Kontrol	-3.38000	1.66934	.074	-7.1563	.3963
	Perlakuan II (KS)	1.87500	1.66934	.290	-1.9013	5.6513
Perlakuan II (KS)	Kontrol	-5.25500 [*]	1.66934	.012	-9.0313	-1.4787
	Perlakuan I (KB)	-1.87500	1.66934	.290	-5.6513	1.9013

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

K.5 Uji LSD (6 Kelompok)

Multiple Comparisons

ProduksiRadikal
LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Perlakuan I (KB)	3.38000'	2.16965	.137	-1.1783	7.9383
	Perlakuan II (KS)	5.25500'	2.16965	.026	.6967	9.8133
	Sel	12.80750'	2.16965	.000	8.2492	17.3658
	Sel+KB	8.27000'	2.16965	.001	3.7117	12.8283
	Sel+KS	10.54500'	2.16965	.000	5.9867	15.1033
Perlakuan I (KB)	Kontrol	-3.38000	2.16965	.137	-7.9383	1.1783
	Perlakuan II (KS)	1.87500	2.16965	.399	-2.6833	6.4333
	Sel	9.42750'	2.16965	.000	4.8692	13.9858
	Sel+KB	4.89000'	2.16965	.037	.3317	9.4483
	Sel+KS	7.16500'	2.16965	.004	2.6067	11.7233
Perlakuan II (KS)	Kontrol	-5.25500'	2.16965	.026	-9.8133	-.6967
	Perlakuan I (KB)	-1.87500	2.16965	.399	-6.4333	2.6833
	Sel	7.55250'	2.16965	.003	2.9942	12.1108
	Sel+KB	3.01500	2.16965	.182	-1.5433	7.5733
	Sel+KS	5.29000'	2.16965	.025	.7317	9.8483
Sel	Kontrol	-12.80750'	2.16965	.000	-17.3658	-8.2492
	Perlakuan I (KB)	-9.42750'	2.16965	.000	-13.9858	-4.8692
	Perlakuan II (KS)	-7.55250'	2.16965	.003	-12.1108	-2.9942
	Sel+KB	-4.53750	2.16965	.051	-9.0958	.0208
	Sel+KS	-2.26250	2.16965	.311	-6.8208	2.2958
Sel+KB	Kontrol	-8.27000'	2.16965	.001	-12.8283	-3.7117
	Perlakuan I (KB)	-4.89000'	2.16965	.037	-9.4483	-.3317
	Perlakuan II (KS)	-3.01500	2.16965	.182	-7.5733	1.5433
	Sel	4.53750	2.16965	.051	-.0208	9.0958
	Sel+KS	2.27500	2.16965	.308	-2.2833	6.8333
Sel+KS	Kontrol	-10.54500'	2.16965	.000	-15.1033	-5.9867
	Perlakuan I (KB)	-7.16500'	2.16965	.004	-11.7233	-2.6067
	Perlakuan II (KS)	-5.29000'	2.16965	.025	-9.8483	-.7317
	Sel	2.26250	2.16965	.311	-2.2958	6.8208
	Sel+KB	-2.27500	2.16965	.308	-6.8333	2.2833

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