



**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA  
(*Coffea canephora*) PADA SEL MONONUKLEAR DARAH TEPI  
(PBMC)**

**SKRIPSI**

Oleh:

**Indah Putri Arifiana Dewi**

**NIM: 141610101057**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**



**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA  
(*Coffea canephora*) PADA SEL MONONUKLEAR DARAH TEPI  
(PBMC)**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi pada Fakultas Kedokteran Gigi (S-1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh:

**Indah Putri Arifiana Dewi**

**NIM: 141610101057**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2019**

## PERSEMBAHAN

Dengan setulus hati skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas limpahan rahmat, berkah, dan kemudahan yang tak henti diberikan
2. Nabi Muhammad SAW teladan dunia dan akhirat bagi seluruh umat manusia.
3. Orang tua tersayang, Ayah Sukari dan ibu Nafi'ah yang selalu mengalunkan doa tanpa henti, memberikan kasih sayang dan pengorbanan yang tiada batas.
4. Adik-adik yang saya sayangi, Fian dan Dhiana yang selalu memberikan dorongan dan doa
5. Guru-guru saya sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

### MOTTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan) kerjakanlah dengan sesungguhnya (urusan) yang lain dan hanya kepada Tuhanmulah hendaknya kamu berharap.”

(Al-Insyiroh: 6-8)

“Dan apa saja nikmat yang ada pada kamu, maka dari Allah-lah (datangnya), dan bila kamu ditimpa oleh kemudharatan, maka hanya kepada-Nya-lah kamu meminta pertolongan.”

(QS An Nahl : 53)

---

\*) Mushaf Al Qur'an dan Terjemahannya. Departemen Agama RI. 2010. Al-Qur'an dan Terjemahan Indonesia. Bandung: Diponegoro.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Indah Putri Arifiana Dewi

NIM : 141610101057

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah berjudul “Uji Sitotoksisitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) pada Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC)” adalah benar-benar karya sendiri, kecuali kutipan yang saya sebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 13 November 2018

Yang menyatakan

Indah Putri Arifiana Dewi

NIM 141610101057

**SKRIPSI**

UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)  
PADA SEL MONONUKLEAR DARAH TEPI (PBMC)

Oleh:

Indah Putri Arifiana Dewi

NIM 141610101057

Dosen Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : drg. Dessy Rachmawati, M.Kes., Ph.D

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Hengky Bowo Ardhiyanto MDSc

Dosen Penguji:

Dosen Penguji Ketua : Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc., Ph.D

Dosen Penguji Pendamping : drg. Agus Sumono M.Kes

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Uji Sitotoksitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) pada Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC)” karya Indah Putri Arifiana Dewi telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

Hari, tanggal : Rabu, 21 November 2018

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota,

Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc., Ph.D

NIP. 196805291994031003

drg. Agus Sumono, M.Kes

NIP. 196804012000121001

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Pendamping,

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

NIP. 197612232005012001

drg. Hengky Bowo Ardhiyanto, MDSc

NIP. 197905052005011005

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

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

NIP. 196901121996011001

## RINGKASAN

**Uji Sitotoksitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) pada Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC);** Indah Putri Arifiana Dewi; 141610101057, 68 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Tanaman herbal dikenal mempunyai manfaat terhadap kesehatan dan sudah banyak diteliti efeknya seperti antikanker, anti mikrobial, antijamur, antioksidan serta antiinflamasi. Tanaman kopi robusta merupakan salah satu tanaman herbal yang banyak dikembangkan saat ini. Biji kopi robusta secara alami memiliki komponen bioaktif seperti flavonoid, trigonelline, kafein, asam klorogaenat dan polifenol yang memiliki aktifitas sebagai imunomodulator, antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri. Tanaman ini dipercaya masyarakat tidak menimbulkan efek toksik, tetapi diduga juga secara ilmiah tanaman herbal ini secara alami memiliki efek toksik. Tanaman kopi hingga saat ini belum banyak dilakukan penelitian secara ilmiah untuk membuktikan toksisitasnya terutama pada ekstrak biji kopi robusta. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui Mengetahui apakah ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan konsentrasi 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 125 µg/ml menunjukkan efek toksik terhadap sel mononuklear darah tepi (PBMC).

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian adalah *the posttest group design*. Penelitian menggunakan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*). Penelitian dilakukan pada bulan April 2018, bertempat di Laboratorium Bioscience. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) menggunakan metode maserasi, kemudian dilakukan pengenceran untuk memperoleh konsentrasi 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 125 µg/ml. Konsentrasi 125 µg/ml ini digunakan sebagai konsentrasi tertinggi pada penelitian ini karena hasil penelitian pendahuluan dengan menggunakan konsentrasi 125 µg/ml, 250 µg/ml dan 500 µg/ml, menunjukkan bahwa konsentrasi 125 µg/ml merupakan konsentrasi yang tidak



toksik pada sel PBMC. Isolat PBMC yang digunakan diambil dari darah vena perifer orang sehat. Isolat PBMC dibagi menjadi kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yaitu, kelompok perlakuan 1 (P1) adalah isolat PBMC dipapar dengan ekstrak kopi 31,25 µg/ml, kelompok perlakuan 2 (P2) adalah isolat PBMC dipapar dengan ekstrak kopi 62,5 µg/ml dan kelompok perlakuan 3 (P3) adalah isolat PBMC dipapar dengan ekstrak kopi 125 µg/ml. Setelah dilakukan eksperimen, viabilitas sel dihitung menggunakan mikroskop inverted perbesaran 400x (*trypan blue*) dan menggunakan ELISA reader (MTT). Data dianalisis menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk* dan uji homogenitas Levene, kemudian dilanjutkan uji parametrik *One Way Anova* dan uji beda LSD (*Least Significance Difference*).

Hasil penelitian menggunakan *trypan blue* menunjukkan bahwa semua kelompok uji memiliki sifat sitotoksisitas yang berbeda terhadap sel PBMC. Jumlah rata-rata persentase sel tertinggi yaitu pada kelompok kontrol sebesar 91,07% sedangkan viabilitas sel PBMC terhadap ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 125 µg/ml masing-masing sebanyak 75,19%, 67,7% dan 57,6%. Sedangkan hasil penelitian uji sitotoksisitas menggunakan MTT menunjukkan rata-rata persentase viabilitas sel PBMC terhadap ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 31,25 µg/ml menunjukkan viabilitas sel sebanyak 87,2%, pada konsentrasi ekstrak kopi 62,5 µg/ml sebanyak 79,4% dan konsentrasi 125 µg/ml sebanyak 74,2%.

Kesimpulan dari penelitian ini didapatkan hasil bahwa dengan pengamatan menggunakan metode MTT menunjukkan bahwa ekstrak biji kopi yang bersifat non-toksik terhadap sel PBMC adalah konsentrasi 31,25 µg/ml, sedangkan konsentrasi 62,5 µg/ml dan 125 µg/ml bersifat sitotoksik lemah. Hasil penggunaan metode *trypan blue*, ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 31,25 µg/ml dan konsentrasi 62,5 µg/ml bersifat sitotoksik lemah sedangkan konsentrasi 125 µg/ml menunjukkan sifat sitotoksik menengah terhadap sel PBMC. Viabilitas sel PBMC tertinggi terdapat pada konsentrasi 31,25 µg/ml dan viabilitas sel PBMC terendah terdapat pada konsentrasi 125 µg/ml

## PRAKATA

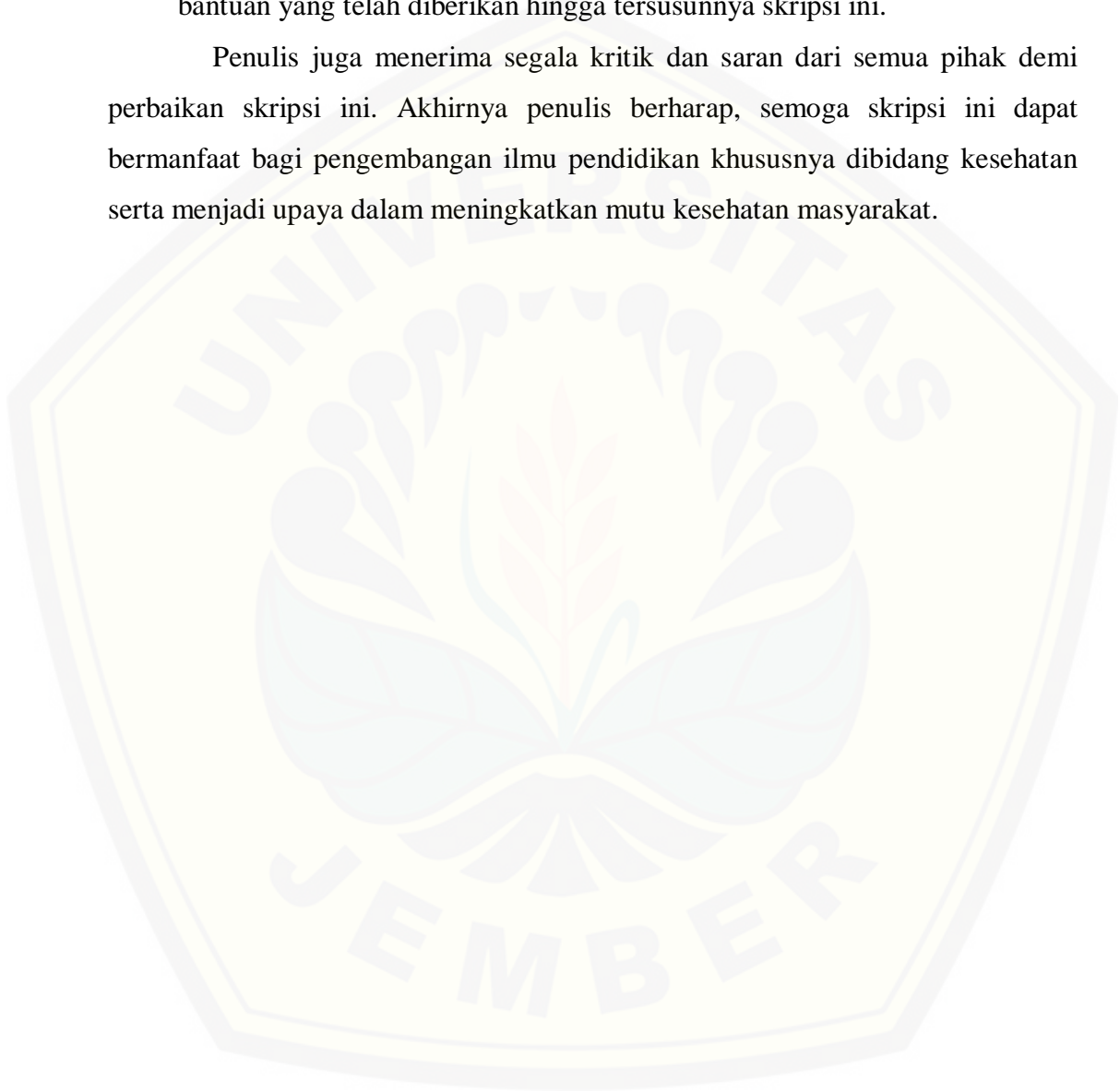
Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) pada Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Kedua orang tuaku tercinta; Ayahanda Sukari dan Ibunda Nafi'ah yang tidak pernah putus memanjatkan doa, mencurahkan kasih sayang, memberikan restu, nasihat, semangat dan dukungan selama ini;
2. drg. Dessy Rachmawati, M.Kes., Ph.D dan drg. Hengky Bowo Ardhiyanto MDSc, selaku dosen pembimbing utama dan dosen pembimbing pendamping skripsi;
3. Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc., Ph.D dan drg Agus Sumono M.Kes selaku dosen penguji utama dan dosen penguji anggota skripsi;
4. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
5. drg. Nuzulul Hikmah M.Biomed, selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi dalam perjalanan studi selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Adik-adik tersayang, Rizqi Arifianto Dwi Putra dan Dhiana Wahyu Kusuma Wardhani yang telah memberikan semangat dan tidak ada hentinya mendoakan;
7. Seluruh staf di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang membantu dalam penyelesaian administrasi penulisan skripsi ini;
8. Teknisi laboratorium Bioscience Jember yang telah membantu dalam proses penelitian;

9. Teman-teman seperjuangan FKG Universitas Jember angkatan 2014. Terima kasih atas kebersamaan, dukungan, bantuan dan doa kalian selama ini;
10. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian; atas perhatian dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya skripsi ini.

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

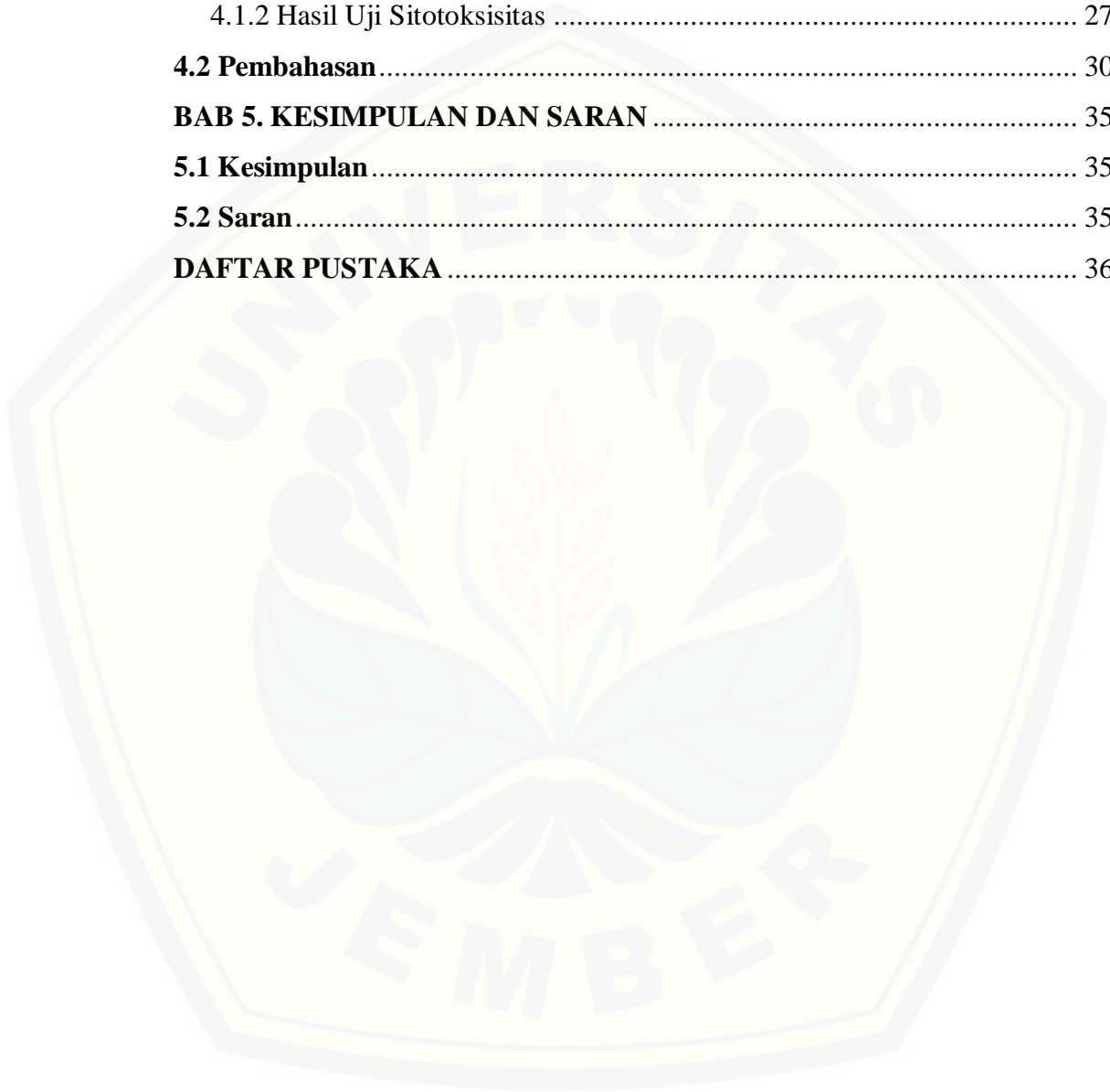


**DAFTAR ISI**

|  | Halaman |
|--|---------|
| <b>HALAMAN JUDUL</b> .....                         | ii      |
| <b>PERSEMBAHAN</b> .....                           | iii     |
| <b>MOTTO</b> .....                                 | iv      |
| <b>PERNYATAAN</b> .....                            | v       |
| <b>PENGESAHAN</b> .....                            | vii     |
| <b>RINGKASAN</b> .....                             | viii    |
| <b>PRAKATA</b> .....                               | x       |
| <b>DAFTAR ISI</b> .....                            | xii     |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....                         | xv      |
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....                          | xvi     |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....                       | xvii    |
| <b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....                    | 1       |
| <b>1.1 Latar Belakang</b> .....                    | 1       |
| <b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....                   | 3       |
| <b>1.3 Tujuan</b> .....                            | 3       |
| <b>1.4 Manfaat</b> .....                           | 4       |
| <b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....               | 5       |
| <b>2.1 Sel mononuklear darah tepi (PBMC)</b> ..... | 5       |
| <b>2.2 Kopi Robusta</b> .....                      | 6       |
| 2.2.1 Klasifikasi .....                            | 6       |
| 2.2.2 Morfologi kopi .....                         | 6       |
| 2.2.3 Habitat kopi.....                            | 8       |
| 2.2.4 Kandungan kimia ekstrak biji kopi .....      | 8       |
| <b>2.3 Kematian Sel</b> .....                      | 9       |
| <b>2.4 Uji Sitotoksitas</b> .....                  | 12      |
| <b>2.5 Peta Konsep</b> .....                       | 14      |
| <b>2.6 Keterangan Kerangka Konsep</b> .....        | 15      |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.7 Hipotesis.....   | 15        |
| <b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>                                       | <b>16</b> |
| <b>3.1 Jenis Penelitian.....</b>   | <b>16</b> |
| <b>3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....</b>                                | <b>16</b> |
| 3.2.1 Waktu Penelitian.....  | 16        |
| 3.2.2 Tempat penelitian.....   | 16        |
| <b>3.3 Identifikasi Variabel.....</b>                                      | <b>16</b> |
| 3.3.1 Variabel Bebas.....  | 16        |
| 3.3.2 Variabel Terikat.....  | 16        |
| 3.3.3 Variabel Terkendali.....   | 16        |
| <b>3.4 Sampel.....</b>   | <b>17</b> |
| 3.4.1 Kelompok Sampel.....   | 17        |
| 3.4.2 Jumlah Sampel.....   | 17        |
| <b>3.5 Definisi Operasional.....</b>                                       | <b>18</b> |
| 3.5.1 Ekstrak Biji Kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> ).....           | 18        |
| 3.5.2 Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC).....                               | 18        |
| 3.5.3 Uji Sitotoksitas.....  | 18        |
| <b>3.6 Alat dan Bahan.....</b>   | <b>18</b> |
| 3.6.1 Alat Penelitian.....   | 18        |
| 3.6.2 Bahan Penelitian.....  | 18        |
| <b>3.7 Prosedur Penelitian.....</b>  | <b>19</b> |
| 3.7.1 <i>Ethical Clearance</i> .....                                       | 19        |
| 3.7.2 Sterilisasi Alat.....  | 19        |
| 3.7.3 Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta ( <i>Coffea canephora</i> )..... | 19        |
| 3.7.4 Pengambilan Sampel Darah.....  | 19        |
| 3.7.5 Isolasi PBMC.....  | 20        |
| 3.7.6 Inkubasi PBMC dengan ekstrak biji kopi robusta.....                  | 20        |
| 3.7.7 Uji Sitotoksitas dengan MTT.....                                     | 20        |
| 3.7.8 Uji Sitotoksitas dengan <i>trypan blue</i> .....                     | 21        |
| 3.7.9 Pengamatan Hasil.....  | 21        |
| <b>3.8 Analisis Data.....</b>  | <b>22</b> |

|   |    |
|---|----|
| <b>3.9 Alur Penelitian</b> .....                                | 23 |
| <b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....                        | 24 |
| <b>4.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data</b> .....             | 24 |
| 4.1.1 Hasil Uji Viabilitas Menggunakan <i>trypan blue</i> ..... | 24 |
| 4.1.2 Hasil Uji Sitotoksitas .....                              | 27 |
| <b>4.2 Pembahasan</b> .....                                     | 30 |
| <b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....                        | 35 |
| <b>5.1 Kesimpulan</b> .....                                     | 35 |
| <b>5.2 Saran</b> .....  | 35 |
| <b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....                                     | 36 |



**DAFTAR GAMBAR**

|            | Halaman  |
|------------|--|
| Gambar 2.1 | Tanaman kopi robusta ..... 7   |
| Gambar 2.2 | Biji kopi robusta..... 7   |
| Gambar 2.3 | Perbedaan proses kematian sel nekrosis dan apoptosis ... 12                              |
| Gambar 2.4 | Peta konsep ..... 14   |
| Gambar 3.1 | Alur penelitian ..... 23   |
| Gambar 4.1 | Diagram batang rerata presentase viabilitas sel PBMC<br>menggunakan trypan blue ..... 25 |
| Gambar 4.2 | Kelompok kontrol dan Kelompok perlakuan 1..... 25  |
| Gambar 4.3 | Kelompok perlakuan 2 dan 3 ..... 26  |
| Gambar 4.6 | Diagram batang rerata presentase viabilitas sel PBMC<br>menggunakan MTT ..... 29         |

**DAFTAR TABEL**

|  | Halaman |
|--|---------|
| Tabel 2.1 Kandungan kimia biji kopi robusta .....                                    | 9       |
| Tabel 4.1 Jumlah rata-rata % viabilitas sel .....                                    | 24      |
| Tabel 4.2 Hasil uji normalitas <i>Shapiro-wilk</i> .....                             | 26      |
| Tabel 4.3 Hasil uji homogenitas menggunakan <i>Levene</i> .....                      | 27      |
| Tabel 4.4 Hasil uji beda menggunakan <i>One-way Anova</i> .....                      | 27      |
| Tabel 4.5 Hasil uji LSD pada masing-masing kelompok .....                            | 27      |
| Tabel 4.6 Nilai Absorbansi Ekstrak Biji Kopi Robusta Menggunakan Metode<br>MTT ..... | 28      |
| Tabel 4.7 Jumlah rata-rata % viabilitas sel .....                                    | 28      |
| Tabel 4.8 Hasil uji normalitas <i>Shapiro-wilk</i> .....                             | 29      |
| Tabel 4.9 Hasil uji homogenitas menggunakan <i>Levene</i> .....                      | 29      |
| Tabel 4.10 Hasil uji beda menggunakan <i>One way Anova</i> .....                     | 30      |
| Tabel 4.11 Hasil uji LSD pada masing-masing kelompok .....                           | 30      |



DAFTAR LAMPIRAN

|   | Halaman |
|---|---------|
| <b>A. Surat keterangan</b> .....                  | 41      |
| A.1 Surat <i>ethical clearence</i> .....          | 41      |
| A.2 Surat izin penelitian .....                   | 42      |
| A.3 Surat Identifikasi Tanaman .....              | 43      |
| A. 4 <i>Informed Consent</i> .....                | 44      |
| A. 5 Surat Keterangan Pembuatan Ekstrak .....     | 45      |
| A. 6 Data Kesehatan Umum Subjek .....             | 46      |
| <b>B. Foto Hasil Penelitian Pendahuluan</b> ..... | 47      |
| <b>C. Foto Hasil Penelitian</b> .....             | 49      |
| <b>D. Analisis Data</b> .....                     | 53      |
| D.1 Metode <i>Trypan blue</i> .....               | 53      |
| D.2 Metode MTT .....                              | 56      |
| <b>E. Alat dan Bahan Penelitian</b> .....         | 59      |
| E.1 Pembuatan ekstrak biji kopi robusta .....     | 59      |
| E.2 Uji sitotoksisitas .....                      | 60      |
| <b>F. Dokumentasi Penelitian</b> .....            | 63      |
| F.1 Pembuatan ekstrak biji kopi robusta .....     | 63      |
| F.2 Uji sitotoksisitas .....                      | 65      |
| <b>G. Cara Pengenceran Ekstrak</b> .....          | 68      |

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Tanaman herbal dikenal mempunyai manfaat dalam bidang kesehatan seperti antikanker, antimikrobal, antijamur, antioksidan serta antiinflamasi (Ramawat dan Merillon, 2013). Potensi ini dapat digunakan sebagai bahan alternatif dalam meningkatkan status kesehatan. Bahan herbal selain dikenal menawarkan keberagaman kandungan yang bermanfaat secara fisiologis tetapi juga mulai dipertanyakan kemungkinan efek berbahaya yaitu efek toksiknya jika tanaman herbal tersebut digunakan sebagai bahan *phytopharmaceutical* (Thakkar, 2014).

Tanaman kopi robusta merupakan salah satu tanaman herbal yang banyak dikembangkan saat ini. Tanaman kopi di Indonesia sekitar 95% adalah kopi robusta dikarenakan letak geografis Indonesia yang sangat mendukung untuk ditanami komoditi ini (Bambang, 2010). Daerah penghasil kopi robusta salah satunya yaitu kota Jember. Berdasarkan Badan Pusat Statistik Provinsi Jawa Timur (2018), tanaman kopi ini memiliki tingkat produksi yang baik di kota Jember, hasil produksi yang diperoleh mencapai 10.863 ton pada tahun 2016. Bagian dari tanaman kopi yang dapat dimanfaatkan salah satunya adalah biji kopi. Biji kopi robusta secara alami memiliki komponen bioaktif seperti flavonoid, trigonelline, kafein, asam kloroganat dan polifenol yang memiliki aktifitas sebagai antioksidan dan antibakteri (Kiattisin, 2016; Silva dkk., 2014).

Tanaman herbal kopi robusta dipercaya secara empiris di masyarakat tidak menimbulkan efek toksik, tetapi diduga juga secara ilmiah tanaman herbal ini secara alami memiliki efek toksik. Senyawa aktif yang terdapat dalam kopi dapat menyebabkan kematian pada sel. Kematian sel dibagi menjadi 2 yaitu apoptosis (kematian sel terprogram) dan nekrosis (kematian sel yang tidak terprogram) (Vural, 2013). Sifat toksik yang ditimbulkan tersebut diketahui dari beberapa penelitian bahwa senyawa pada kopi dapat menyebabkan hilangnya integritas selular dan akhirnya sel mengalami kematian (Silva dkk., 2014). Hasil penelitian Rao dan Nadumane (2016) menggunakan sel HeLa dan sel PA-1,

dengan konsentrasi ekstrak kopi mulai dari 0,1-25 µg/ml menunjukkan adanya peningkatan level *caspase-9* dan fragmentasi DNA yang mengarah pada kerusakan sel. Adanya aktivitas *caspase* dan fragmentasi DNA menunjukkan karakteristik terjadinya apoptosis sel.

Tanaman kopi robusta hingga saat ini belum banyak dilakukan penelitian secara ilmiah terutama untuk membuktikan toksisitasnya. Dua metode umum yang digunakan untuk uji toksisitas adalah metode perhitungan langsung (*direct counting*) dengan menggunakan *trypan blue* dan metode MTT (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). Prinsip dasar metode *trypan blue* adalah berdasarkan penyerapan warna yaitu sel mati akan menyerap pewarna biru ke dalam sitoplasma disebabkan oleh adanya perubahan integritas membran sel, sehingga membran sel menjadi permeabel dan dapat menyerap zat warna, sedangkan sel hidup tidak berwarna. Metode yang kedua adalah metode MTT yang didasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam tetrazolium, sehingga sel hidup dapat menyerap warna. Terserapnya warna ini disebabkan karena sel mengalami reduksi secara metabolik oleh adanya enzim suksinat dehidrogenase. Enzim ini yang mengkonversi garam tetrazolium menjadi kristal formazan yang berwarna biru keunguan (Bahi dkk., 2016).

Sel yang banyak digunakan pada penelitian di bidang imunologi dan aplikasi toksikologi yaitu sel mononuklear darah tepi (PBMC) (Rachmawati dkk., 2013). Sel PBMC merupakan sel darah putih yang terdiri dari sel monosit, limfosit (sel T, sel B dan sel NK) dan dendritik sel. Sel limfosit biasanya didapati sekitar 70-90%, monosit ±10-30% sedangkan sel dendritik ±1-2% dari jumlah PBMC. Sel PBMC merupakan komponen penting dalam sistem kekebalan tubuh dalam melawan infeksi dan benda asing (Verhoeckx dkk., 2015; Paurahmad dan Salimi, 2015).

Uji pendahuluan yang telah dilakukan pada konsentrasi 125 µg/ml, 250 µg/ml dan 500 µg/ml, didapatkan hasil pada konsentrasi ekstrak biji kopi robusta 500 µg/ml dan 250 µg/ml tidak ditemukan sel yang hidup sedangkan pada konsentrasi 125 µg/ml masih ditemukan beberapa sel yang hidup. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak kopi 250 µg/ml dan 500 µg/ml

bersifat toksik pada sel PBMC. Penelitian pendahuluan tersebut digunakan sebagai acuan untuk eksperimen berikutnya, sehingga pada penelitian ini konsentrasi tertinggi ekstrak kopi yang digunakan adalah 125  $\mu\text{g/ml}$ , diikuti dengan konsentrasi 62,5  $\mu\text{g/ml}$  dan 31,25  $\mu\text{g/ml}$  sebagai variasi konsentrasinya.

Uraian di atas merupakan alasan yang mendorong perlunya dilakukan uji sitotoksisitas ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 31,25  $\mu\text{g/ml}$ , 62,5  $\mu\text{g/ml}$  dan 125  $\mu\text{g/ml}$ . Uji sitotoksisitas tersebut untuk mengetahui apakah bahan ekstrak biji kopi dengan konsentrasi 31,25  $\mu\text{g/ml}$ , 62,5  $\mu\text{g/ml}$  dan 125  $\mu\text{g/ml}$  bersifat toksik atau tidak terhadap sel PBMC. Uji ini didasarkan pada jumlah viabilitas sel PBMC dan kelangsungan hidup sel (Sarasmita dan Laksmiani, 2015; Rachmawati dkk., 2015).

## **1.2 Rumusan Masalah**

- 1.2.1 Apakah ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan konsentrasi 31,25  $\mu\text{g/ml}$ , 62,5  $\mu\text{g/ml}$  dan 125  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan efek toksik terhadap sel PBMC?
- 1.2.2 Berapa konsentrasi ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang menunjukkan viabilitas sel PBMC tertinggi?
- 1.2.3 Berapa konsentrasi ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang menunjukkan viabilitas sel PBMC terendah?

## **1.3 Tujuan penelitian**

- 1.3.1 Mengetahui apakah ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan konsentrasi 31,25  $\mu\text{g/ml}$ , 62,5  $\mu\text{g/ml}$  dan 125  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan efek toksik terhadap sel PBMC.
- 1.3.2 Mengetahui berapa konsentrasi ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang menunjukkan viabilitas sel PBMC tertinggi.
- 1.3.3 Mengetahui berapa konsentrasi minimal ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang viabilitas sel PBMC terendah.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

- 1.4.1 Menambah pengetahuan tentang sitotoksitas ekstrak biji kopi robusta terhadap sel PBMC.
- 1.4.2 Sebagai bahan kajian dan panduan untuk penelitian selanjutnya. Sehingga diharapkan dapat digunakan sebagai dasar menentukan konsentrasi paparan yang tepat terhadap sel mononuklear secara *in vitro*.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Sel mononuklear darah tepi (PBMC)

Sel mononuklear darah tepi (PBMC) adalah sel darah putih yang memiliki inti tunggal berbentuk bulat. PBMC terdiri dari beberapa jenis sel imun yaitu limfosit (sel B, sel T dan sel *Natural killer*) 70-90%, sel monosit 10-20% dan sel dendritik 1-2%. Sel-sel tersebut terlibat dalam proses inflamasi (Verhoeckx dkk., 2015; Munoz dan Costa, 2013). Rentang hidup sel-sel mononuklear darah perifer yaitu, beberapa minggu/bulan untuk limfosit dan monosit selama 1-3 hari dalam aliran darah (El-maarri dkk., 2011).

PBMC sangat berperan penting dalam sistem kekebalan tubuh. Fungsi dari masing-masing PBMC beragam tergantung pada jenis sel. Mulai dari sel monosit yang merupakan sel fagosit dan juga sebagai APC untuk mengenal serta menyerang antigen. Monosit menjadi aktif saat bertemu jaringan yang rusak dan bahan-bahan patogen. Sel ini selanjutnya dapat berdiferensiasi menjadi makrofag dan sel dendritik. Sel-sel dendritik ini kemudian memproses dan menyajikan antigen, tetapi setelah aktivasi sel ini bermigrasi ke limfa nodus untuk berinteraksi dengan sel-sel sistem imun adaptif, seperti sel B dan sel T (Klepeisz, 2013).

Sel limfosit terdiri dari sel B, sel T dan sel NK. Pada imunitas humoral sel B bertugas melepas antibodi untuk menyingkirkan mikroba maupun antigen, sedangkan pada imunitas selular sel T bertugas mengaktifkan makrofag sebagai efektor untuk menghancurkan mikroba maupun antigen. Sel NK berasal dari sel asal progenitor yang sama dengan sel B dan sel T. Sel NK memiliki kemampuan membunuh sel tanpa bantuan tambahan untuk aktivitasnya. Sedangkan sel dendritik berfungsi sebagai APC yang berperan pada awal pengenalan protein asing, mengawali respon imunitas selular dan humoral dengan cara mengaktifkan sel T naif, sel Th dan sel B (Baratawidjaja, 2013).

## 2.2 Kopi Robusta

Kopi robusta (*Coffea canephora*) adalah spesies tanaman berbentuk pohon. Tanaman ini tumbuh tegak, bercabang dan bila dibiarkan akan mencapai tinggi 12 m. Kondisi lingkungan tanaman kopi yang paling berpengaruh terhadap produktivitasnya adalah tinggi tempat dan curah hujan (Muljana, 2010).

### 2.2.1 Klasifikasi

Taksonomi tanaman kopi jenis robusta yaitu (Chamidah, 2012):

|            |                           |
|------------|---------------------------|
| Kingdom    | : <i>Phylum</i>           |
| Divisi     | : <i>Spermathophyta</i>   |
| Sub Divisi | : <i>Angiospermae</i>     |
| Kelas      | : <i>Dicotyledoneae</i>   |
| Ordo       | : <i>Rubiales</i>         |
| Genus      | : <i>Coffea</i>           |
| Species    | : <i>Coffea canephora</i> |

### 2.2.2 Morfologi kopi

Tanaman kopi (Gambar 2.1) membutuhkan waktu 3 tahun dari saat perkecambahan sampai menjadi tanaman berbunga dan menghasilkan buah kopi. Semua spesies kopi berbunga putih beraroma wangi. Bunga tersebut muncul pada ketiak daun (Rahardjo, 2012). Tanaman kopi membentuk bunga dari mata tunas yang berada di ketiak-ketiak daun pada cabang *plagiotrop* atau cabang yang berarah mendatar, masing-masing ketiak daun memiliki sekitar 5 mata tunas. Setiap mata tunas akan dapat tumbuh menjadi organ vegetatif (cabang dan daun) serta menjadi organ generatif (bunga, buah dan biji) (Soemarno dan Ryan, 2016).



Gambar 2.1 tanaman kopi robusta (Bambang, 2010)

Buah kopi tersusun dari kulit buah (*epicarp*), daging buah (*mesocarp*) yang dikenal dengan sebutan *pulp* dan kulit tanduk (*endocarp*). Buah yang terbentuk akan matang selama 7-12 bulan. Setiap buah kopi memiliki 2 biji kopi. Biji kopi (Gambar 2.2) tersebut dibungkus kulit keras yang disebut kulit tanduk (*parchment skin*) (Rahardjo, 2012).



Gambar 2.2 biji kopi robusta (Bambang, 2010)

Karakter morfologi yang khas pada kopi robusta adalah tajuk yang lebar, perwatakan besar, ukuran daun yang lebih besar dibandingkan daun kopi arabika, dan memiliki bentuk pangkal tumpul. Selain itu, daunnya tumbuh berhadapan dengan batang, cabang, dan ranting-rantingnya (Najiyatih dan Danarti 2012). Biji kopi robusta juga memiliki karakteristik yang membedakan dengan biji kopi lainnya. Secara umum, biji kopi robusta memiliki rendemen yang lebih tinggi



dibandingkan kopi arabika. Selain itu, karakteristik yang menonjol yaitu bijinya yang agak bulat, lengkungan bijinya yang lebih tebal dibandingkan kopi arabika, dan garis tengah dari atas ke bawah hampir rata (Panggabean, 2011).

### 2.2.3 Habitat kopi

Jenis kopi robusta berasal dari hutan-hutan khatulistiwa di Afrika, dari pantai barat sampai Uganda. Kopi baru dikenal masyarakat dunia setelah tanaman tersebut dikembangkan di luar daerah asalnya, yaitu Yaman di bagian selatan Jazirah Arab. Kopi mulai menyebar ke daratan lainnya melalui saudagar arab (Rahardjo, 2012). Kopi Robusta (*Coffea canephora*) masuk ke Indonesia pada tahun 1900. Kopi ini memiliki ketahanan terhadap penyakit karat daun, dan memerlukan syarat tumbuh dan pemeliharaan yang ringan, sedang produksinya jauh lebih tinggi. Oleh karena itu, kopi ini cepat berkembang dan mendesak kopi-kopi lainnya. Saat ini lebih dari 90% dari areal pertanaman kopi Indonesia terdiri atas kopi robusta (Bambang, 2010).

Tanaman kopi robusta biasanya tumbuh di dataran dengan ketinggian 400-700 m di atas permukaan laut dan masih toleran pada ketinggian di bawah 400 m di atas permukaan laut. Akar-akar pohon dapat tumbuh memanjang hingga lebih dari 30-45 cm di bawah permukaan tanah. Ketinggian pohon dapat mencapai 12 m (Soemarno dan Ryan, 2016). Berdasarkan Badan Pusat Statistik Jawa Timur (2018) menjelaskan bahwa produksi tanaman kopi di Jawa Timur yang memiliki tingkat produksi sangat baik yaitu Kabupaten Jember. Hasil produksi kopi yang diperoleh sangat besar pada tahun 2012 mencapai 3178 ton sedangkan pada tahun 2013 mencapai 3105 ton. Produksi kopi yang tinggi di Kabupaten Jember dikarenakan kopi merupakan komoditas perkebunan rakyat yang diusahakan hampir di seluruh Kabupaten Jember. Selain itu juga banyak perkebunan besar di Kabupaten Jember yang membudidayakan tanaman kopi.

### 2.2.4 Kandungan kimia ekstrak biji kopi

Komposisi kimia dari biji kopi bergantung pada spesies dan varietas dari kopi tersebut serta faktor-faktor lain yang berpengaruh antara lain lingkungan tempat tumbuh, tingkat kematangan dan kondisi penyimpanan. Proses pengolahan juga akan mempengaruhi komposisi kimia dari kopi. Misalnya penyangraian akan

mengubah komponen yang labil yang terdapat pada kopi sehingga membentuk komponen yang kompleks (Panggabean, 2011).

Biji kopi robusta memiliki banyak kandungan kimia seperti karbohidrat, senyawa nitrogen (protein, asam amino, kafein dan trigonelline), mineral, asam dan ester (asam klorogenat dan asam kuinat) (Farah, 2012). Konsentrasi kandungan kimia dari biji dan bubuk kopi robusta dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kandungan kimia biji kopi robusta

| Komponen              | Konsentrasi Senyawa |
|-----------------------|---------------------|
| Mineral               | 4.0-4.5             |
| Kafein                | 1.6-2.4             |
| Trigonelline          | 0.6-0.75            |
| Lipid                 | 9.0-13.0            |
| Total Asam Klorogenat | 7.0-10.0            |
| Asam Alifatik         | 1.5-2.0             |
| Oligosakarida         | 5.0-7.0             |
| Total Polisakarida    | 37.0-47.0           |
| Asam Amino            | 2.0                 |
| Protein               | 11.0-13.0           |

(Sumber: Panggabean, 2011)

Pada ekstrak biji kopi robusta hijau dapat ditemukan senyawa kafein, asam klorogenat, asam caffeic dan trigonellin. Sedangkan pada biji kopi robusta sangrai senyawa memiliki kandungan senyawa asam klorogenat yang lebih rendah, kafein, trigonelin dan melanoidin. Ekstrak biji kopi robusta dengan pelarut etanol mengandung senyawa kafein dan senyawa polifenol yang tinggi terutama asam klorogenat (kiattisin dkk., 2016).

### 2.3 Kematian sel.

Kematian sel dibagi menjadi dua kategori yaitu apoptosis atau kematian sel terprogram dan nekrosis atau kematian sel yang tidak terprogram, perbedaan apoptosis dan nekrosis dapat dilihat pada Gambar 2.4. Nekrosis adalah perubahan morfologis yang menyebabkan kematian sel dan disebabkan oleh degradasi enzimatis yang progresif. Nekrosis dimulai dengan gangguan kemampuan sel untuk mempertahankan homeostasis, yang menyebabkan masuknya air dan ion ekstraseluler. Organel intraseluler terutama mitokondria dan seluruh sel

membengkak dan pecah (lisis sel). Pemecahan utama dari membran plasma menyebabkan isi sitoplasma melepaskan enzim lisosom ke dalam cairan ekstraseluler. Nekrosis sering dikaitkan dengan kerusakan jaringan yang luas yang mengakibatkan respon inflamasi. Morfologi sel yang mengalami nekrosis yaitu pembengkakan sitoplasma ringan, dilatasi organel, hilangnya ribosom dan retikulum endoplasma kasar serta *blebbing* dari membran plasma fragmen sitoplasma (Alvarez dkk., 2010).

Kematian sel terprogram atau apoptosis adalah kemampuan sel untuk membunuh dirinya sendiri dengan cara yang terkontrol. Apoptosis adalah proses yang diatur secara genetik dan terlibat dalam pengaturan fisiologis dan patologis. Apoptosis merupakan suatu mekanisme untuk mematikan sel-sel yang tidak berguna atau berpotensi berbahaya seperti sel yang sudah tua, sel yang terinfeksi, terluka atau bermutasi. Apoptosis sel terjadi akibat rusaknya DNA yang disebabkan oleh infeksi virus, hipoksia, stres oksidatif, stres retikulum endoplasma, senyawa toksik, *heat shock* dan polusi lingkungan (Nuutinen, 2009; Lantto, 2017).

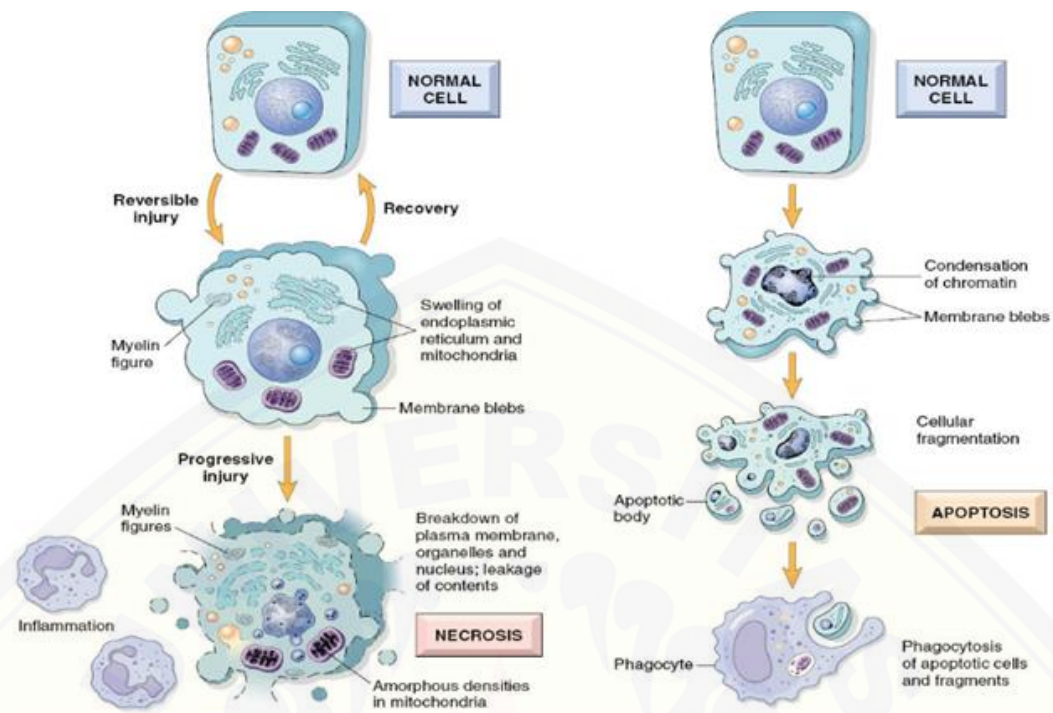
Apoptosis melibatkan serangkaian peristiwa biokimia yang mengarah pada perubahan morfologi yang khas, termasuk penyusutan sel, membran *blebbing*, gangguan membran sel, kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA. Sel-sel apoptosis biasanya cepat diambil dan terdegradasi oleh makrofag atau sel-sel yang berdekatan sebelum isi intraselulernya bocor ke dalam ruang ekstraseluler, sehingga menghindari respons inflamasi (Nuutinen, 2009).

Kajian ilmiah menunjukkan bahwa apoptosis adalah program bunuh diri intraseluler dengan cara mengaktifkan *caspase*. Apoptosis diaktivasi melalui dua jalur yaitu jalur intrinsik dan ekstrinsik. Jalur intrinsik meliputi pemberian kode yang memicu proses mitokondria-dependen melepaskan sitokrom C dan mengaktifkan *caspase* dan jalur ekstrinsik meliputi pengaktifan reseptor kematian (*death receptor*, DR) seperti Fas (reseptor 1 tumor nekrotik faktor), DR4 dan DR5 (CCRC, 2012).

Jalur apoptosis intrinsik terjadi karena rangsangan berupa radiasi, obat-obatan, senyawa beracun, hipoksia, hipertermia, infeksi virus dan radikal bebas.

Ekstrak kopi mengandung senyawa aktif asam klorogenat, kafein dan trigonellin, diduga dari senyawa tersebut terdapat senyawa yang beracun sehingga menyebabkan kematian pada sel (Rao dan Nadumane, 2016). Adanya rangsangan berupa senyawa beracun tersebut dapat menyebabkan perubahan pada membran mitokondria bagian dalam sehingga terlepasnya protein pro-apoptosis seperti *Apoptotic Inducing Factor* (AIF), Smac/DIABLO dan sitokrom C. Faktor-faktor ini dilepaskan dari mitokondria setelah pembentukan pori di membran Mitokondria Permeabilitas Transisi (MPT). Sitokrom C dapat memicu perakitan apoptosome (Apaf-1, *caspase-9* dan nukleotide adenosine tri phosphate/ATP). Selanjutnya apoptosome mengaktifkan *caspase-3* dan terjadi kematian sel (Kalimuthu dan se-kwon, 2013).

Inisiasi apoptosis melalui jalur ekstrinsik melibatkan ikatan antara protein sinyal kematian (*death receptor*) ekstraseluler seperti TNF- $\alpha$ , Fas-Ligand (Fas-L), TNF-related apoptosis including ligand (TRAIL) dan Apo-3 ligand (Apo-3L) dengan reseptor permukaan sel sasaran. Reseptor-reseptor permukaan sel sasaran tersebut diantaranya adalah TNF- $\alpha$  receptor 1 (TNF-R1), TNF- $\alpha$  receptor 2 (TNF-R2), Fas, *death receptor 3* (DR-3). Setelah berikatan dengan ligand yang sama, *death receptor* membentuk kompleks homotrimerik yang menyebabkan protein adaptor intraseluler tertarik ke membran sel seperti TNF-R1 dan DR-3 yang disebut TNFR-associated death domain protein (TRADD). Sedangkan Fas dan DR-4 berinteraksi dengan Fas-associated death domain protein (FADD). Sinyal TNF- $\alpha$  akan berikatan dengan sinyal jalur Fas menyebabkan interaksi antara TRADD dengan FADD. Ikatan-ikatan tersebut mengirimkan sinyal ke sitoplasma untuk mengaktifasi *caspase-8* selanjutnya terjadi kaskade *caspase* untuk apoptosis (Elmore, 2007).



Gambar 2.3 perbedaan proses kematian sel nekrosis dan sel apoptosis (Saunders, 2010)

## 2.4 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas adalah bagian dari evaluasi biologik bahan kedokteran gigi dan diperlukan untuk prosedur *screening* yang standar. Tujuan uji ini adalah untuk mengetahui efek toksik suatu bahan secara langsung pada kultur jaringan. Uji ini dapat digunakan untuk mengukur proliferasi dan sitotoksitas terhadap sel (Siregar dan Hadijono, 2000). Dua metode umum yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah metode perhitungan langsung (*direct counting*) dengan menggunakan metode *trypan blue* dan metode MTT.

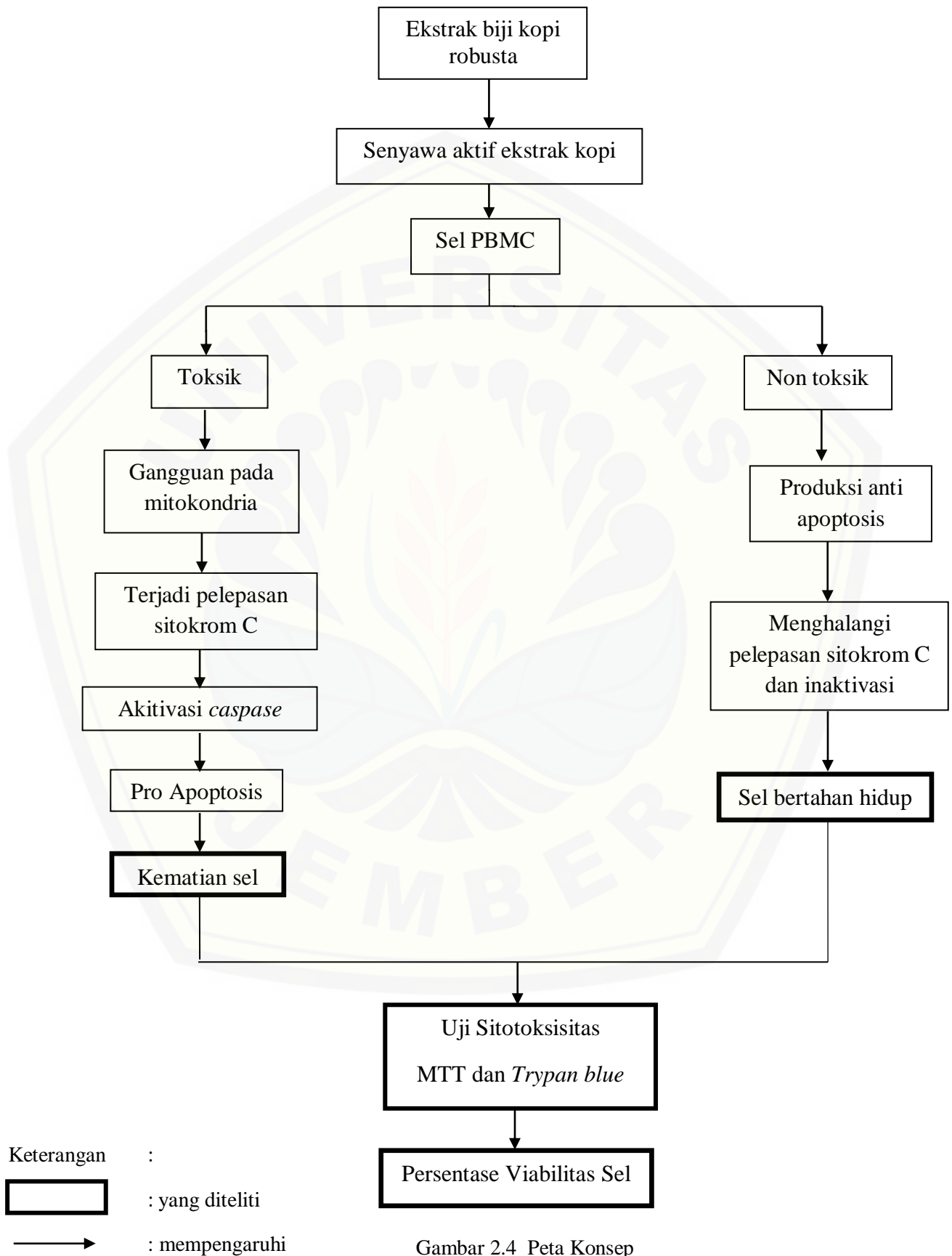
Prinsip dasar uji MTT adalah kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yang berwarna kuning. Senyawa MTT yang larut dalam air dan berwarna kuning, setelah direduksi oleh suksinat dehidrogenase akan menjadi formazan yang berwarna biru. Kemampuan reduksi ini ditunjukkan oleh enzim suksinat dehidrogenase mitokondria pada sel *viable*/sel hidup yang masih melangsungkan respirasi (Chan, 2015).

Untuk membedakan sel hidup dan mati menggunakan pewarnaan dengan *trypan blue*. Apabila pewarnaan *trypan blue* menembus sel dan menghasilkan warna biru, maka sel tersebut telah mati. Kematian pada sel menyebabkannya dapat menyerap zat warna biru, hal itu disebabkan oleh karena kematian sel akan diikuti oleh perubahan integritas membran sel sehingga membran sel menjadi permeabel dan dapat menyerap zat warna. Sedangkan sel hidup, memiliki membran sel yang impermeabel sehingga tidak dapat menyerap warna (Kurnijasanti dkk., 2008).

Tingkat toksisitas suatu bahan berdasarkan klasifikasi jumlah sel yang hidup yaitu:

- a. Sel yang hidup lebih dari 80% dapat diklasifikasikan sebagai non-sitotoksik.
- b. Sel yang hidup diantara 80% hingga 60% dapat diklasifikasikan sebagai sitotoksik lemah.
- c. Sel yang hidup diantara 60% hingga 40% dapat diklasifikasikan sebagai sitotoksik menengah.
- d. Sel yang hidup kurang dari 40% dapat diklasifikasikan sebagai sitotoksik kuat (Garcia dkk., 2014).

2.5 Peta Konsep



Gambar 2.4 Peta Konsep

## 2.6 Keterangan Kerangka Konsep

Sel PBMC dipapar dengan ekstrak biji kopi robusta untuk mengetahui sitotoksitas bahan tersebut. Ekstrak biji kopi robusta mengandung beberapa senyawa kimia yang dapat bersifat toksik maupun non-toksik. Apabila senyawa kimia tersebut bersifat non-toksik, maka sel akan bertahan hidup dengan cara memproduksi anti apoptosis, sehingga pelepasan dan aktivasi *caspase* tidak terjadi. Sedangkan jika senyawa bersifat toksik maka sel akan mati. Kematian sel melalui jalur intrinsik diawali dengan senyawa toksik akan menyebabkan gangguan pada membran mitokondria sehingga terjadi pelepasan sitokrom C. Pelepasan sitokrom C dapat memicu aktivasi dari *caspase* yang akan menyebabkan kematian sel. Untuk mengetahui apakah senyawa kimia pada kopi robusta bersifat toksik atau non toksik maka dilakukan uji sitotoksitas. Setelah dilakukan uji sitotoksitas dilanjutkan penghitungan persentase viabilitas sel.

## 2.7 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu ekstrak biji kopi robusta dalam konsentrasi tertentu tidak bersifat toksik terhadap sel mononuklear (PBMC).



## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris *in vitro*. Suatu proses yang berlangsung diluar tubuh, diterapkan pada prosedur laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the posttest only control group design*, yaitu dengan melakukan pengukuran pada kelompok perlakuan dan membandingkannya dengan kelompok kontrol (Notoatmojo, 2010).

### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

#### 3.2.1 Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan April 2018

#### 3.2.2 Tempat penelitian :

Tempat penelitian dilakukan di laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember. Pembuatan ekstrak biji kopi dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

### 3.3 Identifikasi Variabel

#### 3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*)

#### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah jumlah sel PBMC yang hidup setelah dipapar ekstrak kopi.

#### 3.3.3 Variabel Terkendali

- a. Konsentrasi ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 125 µg/ml
- b. Isolat sel mononuklear (PBMC)

### 3.4 Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel berupa sel mononuklear (PBMC) yang diisolasi dari darah vena perifer/vena tepi orang sehat.

#### 3.4.1 Kelompok Sampel

Sampel penelitian dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, sebagai berikut:

- a. Kelompok 1 : Sel PBMC dengan media kultur
- b. Kelompok 2 : Sel PBMC dipapar dengan ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 31,25 µg/ml
- c. Kelompok 3 : Sel PBMC dipapar dengan ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 62,5 µg/ml
- d. Kelompok 4 : Sel PBMC dipapar dengan ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 125 µg/ml

#### 3.4.2 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan menurut Daniel (2005) untuk setiapkelompok dalam penelitian ini adalah empat sampel yang didasarkan pada penghitungan sebagai berikut:

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

Keterangan:

$n$  = besar sampel tiap kelompok

$\sigma$  = standar deviasi sampel

$d$  = kesalahan yang masih dapat di tolerir,  $\sigma = d$

$Z$  = nilai pada tingkat tertentu jika  $\alpha = 0,05$ , maka  $Z = 1,96$  Sehingga diperoleh besar sampel sebesar:

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

Berdasarkan hasil perhitungan diatas diperoleh jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini 4. Peneliti menggunakan minimal 4 sampel untuk setiap perlakuan.

### 3.5 Definisi Operasional

#### 3.5.1 Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Ekstrak *green* biji dari buah kopi robusta (*Coffea canephora*) merupakan suspensi dari serbuk biji kopi robusta. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta menggunakan metode maserasi, yaitu sediaan cair yang dibuat dengan mengencerkan bubuk biji kopi robusta dengan etanol 96%. Kemudian dilakukan pengenceran, sehingga diperoleh konsentrasi 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 125 µg/ml. Pengenceran dapat dilihat pada lampiran G.

#### 3.5.2 Sel mononuklear darah tepi (PBMC)

Sel PBMC diambil dari darah vena perifer/vena tepi orang yang sehat (tidak memiliki kelainan sistemik). Isolasi dilakukan dengan menggunakan teknik *gradient density* menggunakan bahan *Ficoll density gradient centrifugation*.

#### 3.5.3 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas merupakan uji yang dilakukan untuk melihat sifat toksik suatu bahan terhadap sel yang ditentukan melalui viabilitas sel PBMC. Dihitung memakai metode MTT dengan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang 630 nm dan metode *trypan blue* dengan menggunakan mikroskop *inverted*. Pada sel yang hidup akan terbentuk gambaran ungu.

### 3.6 Alat dan Bahan

#### 3.6.1 Alat penelitian

Tabung eppendorf (Pyrex, *Japan*), tabung falcon, gelas ukur, *centrifuge* (Hettich, *Germany*), mikroskop *inverted*, inkubator (WTC Binder, *Germany*), *coverslip* (Duran), *syringe* 6 ml, *syringe filter*, vortex (Labinco L46), pipet mikro, *blue tip*, *yellow tip*, petridish kecil, tabung heparin, *laminar flow* (Dwyer, Mark xx), *microplate-24 well* dan *microplate-96 well*, ELISA *reader*, neraca timbang, rak tabung, *blender*, oven (Binder), *rotarary evaporator* dan *shaker incubator* (LabTech, Daihan LabTech co, LTD)

#### 3.6.2 Bahan penelitian

Aquadest steril, darah vena perifer, *ficoll density gradient centrifugation*, alkohol 70%, HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*), RPMI (*Roswell Park*

*Memorial Institute*), DMSO (Dimetil sulfoksida), M199, *trypan blue*, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide), ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 125µg/ml dan PBS (*Phospat Buffered Saline*).

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 *Ethical Clearance*

Sebelum dilaksanakan penelitian, prosedur pengambilan darah pada pasien telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

#### 3.7.2 Sterilisasi alat

Semua alat penelitian yang terbuat dari logam dicuci bersih kemudian disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C. Sedangkan alat yang terbuat dari plastik disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%.

#### 3.7.3 Pembuatan Ekstrak Biji Kopi robusta (*Coffea canephora*)

Pembuatan ekstrak biji kopi dilakukan menggunakan biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang telah diblender menjadi serbuk. Setelah itu dilakukan pengekstraksian di laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Pembuatan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) dilakukan dengan menggunakan teknik maserasi. Biji kopi robusta yang telah halus ditimbang sebanyak 500 gram menggunakan neraca timbang lalu dimaserasi dalam larutan etanol 96% sebanyak 2000 ml selama 3 hari. Hasil maserasi disaring dengan menggunakan corong yang dilapisi kertas saring sehingga di dapatkan maserat yang jernih. Kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan temperatur 30- 40°C, sehingga didapatkan sediaan pekat.

#### 3.7.4 Pengambilan sampel darah

- a. Dilakukan pengambilan darah sebanyak 6 cc dari darah vena perifer orang sehat dengan menggunakan *syringe* 6 cc.
- b. Segera setelah diambil, dimasukkan dalam tabung heparin secara perlahan-lahan dengan melewati pada dinding tabung agar tidak berbuih kemudian

tabung digoyangkan agar tidak menggumpal.

### 3.7.5 Isolasi PBMC

Pengambilan darah dari vena perifer orang sehat (tidak mempunyai riwayat kelainan darah) sebanyak 6 cc, pengambilan darah vena menggunakan *disposable syringe* secara intravena. Sampel darah dibagi menjadi 2, masing-masing 3 cc pada tabung EDTA menggunakan perbandingan 1:2 dengan filter 1077. Isolasi sel PBMC, menambahkan lymoprep 3 cc ke dalam tabung lalu darah 3 ml dialirkan melalui dinding tabung secara perlahan lalu disentrifuse 700 g selama 30 menit. Kemudian terbentuk 4 lapisan yaitu plasma, PBMC, lymoprep, eritrosit, untuk mengurangi kontaminasi platelet, lapisan plasma dibuang. Sel PBMC diambil dan diencerkan menggunakan HBSS dengan perbandingan 1:3, cuci 3x, lalu disentrifuse 400 g selama 10 menit. Dilakukan pengukuran jumlah populasi sel/ $\mu\text{L}$  dengan hemositometer. Lalu diambil 100  $\mu\text{l}$  untuk diletakkan pada *microplate 24-well*.

### 3.7.6 Inkubasi PBMC dengan ekstrak biji kopi robusta

Pada Kelompok perlakuan 1 (P1) PBMC dengan media kultur. Pada kelompok perlakuan 2 (P2) PBMC ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 31,25  $\mu\text{g/ml}$ . Pada kelompok perlakuan 3 (P3) PBMC ditambahkan ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 62,5  $\mu\text{g/ml}$ . Pada Kelompok perlakuan 4 (P4) PBMC ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  ekstrak biji kopi robusta dengan konsentrasi 125  $\mu\text{g/ml}$ . Lalu dilakukan pipetting sampai sel dan ekstrak homogen lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah 1 jam dilakukan pengamatan dibawah mikroskop untuk mengetahui pengaruh ekstrak biji kopi robusta terhadap PBMC.

### 3.7.7 Uji Sitotoksitas dengan MTT

Siapkan garam tetrazolium (MTT) untuk perlakuan dengan cara mengambil 1 mL stok larutan MTT dalam PBS (5 mg/mL), encerkan dengan media kultur 10 mL dengan perbandingan 1:10. Buang media sel, cuci PBS 1x dan tambahkan larutan MTT 50  $\mu\text{L}$  ke setiap sumuran. Inkubasi sel selama 1 jam di dalam ruangan gelap pada inkubator CO<sub>2</sub>. Periksa kondisi sel dengan mikroskop *inverted*. Jika formazan telah jelas terbentuk, tambahkan *stopper* yaitu

larutan DMSO (Dimethylsulfoxide) sebanyak 50 µl tiap sumuran. Plate diaduk secara mekanis dengan *Plate Shaker* sampai kristal formazan terlarut, selama 20 menit. Selanjutnya, formazan dibaca absorbansinya secara spektrofotometri dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 630 nm (Rachmawati dkk., 2015).

### 3.7.8 Uji Sitotoksitas dengan *trypan blue*

Menyiapkan *cover slip* yang diletakkan pada *microplate* 24-well sesuai jumlah sampel dan menambahkan masing-masing 100 µl sel PBMC pada tiap *well*, kemudian diinkubasi selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan perlakuan sesuai kelompok. Kemudian diinkubasi selama 60 menit. Satu-persatu *well* kemudian diberi *trypan blue* 50 µl diratakan memenuhi *cover slip*. Segera setelah itu, dilakukan pemotretan (di bawah mikroskop *inverted*) proses pemotretan harus dilakukan dalam waktu 3-5 menit, apabila melebihi waktu tersebut sel akan mati dan mengurangi jumlah sel yang hidup. Sel yang berwarna putih bening atau tidak menyerap pewarnaan *trypan blue* dihitung sebagai sel yang hidup.

### 3.7.9 Pengamatan Hasil

Persentase viabilitas sel menggunakan metode MTT dihitung menggunakan persamaan berikut (Garcia dkk., 2014):

$$\% \text{ Viabilitas sel} = \frac{\text{Absorbansi tes} - \text{Absorbansi media} \times 100}{\text{Absorbansi sel} - \text{Absorbansi media}}$$

Keterangan:

- % Viabilitas sel : Persentase jumlah kehidupan sel setelah diuji
- Absorbansi tes : Nilai *Optical Density* (OD) formazan setiap sampel setelah tes.
- Absorbansi media : Nilai OD formazan pada rata-rata setiap kontrol media.
- Absorbansi sel : Nilai OD formazan pada rata-rata kontrol sel.

Persentase viabilitas sel menggunakan metode *trypan blue* dihitung menggunakan persamaan berikut (Felicia, 2014) :

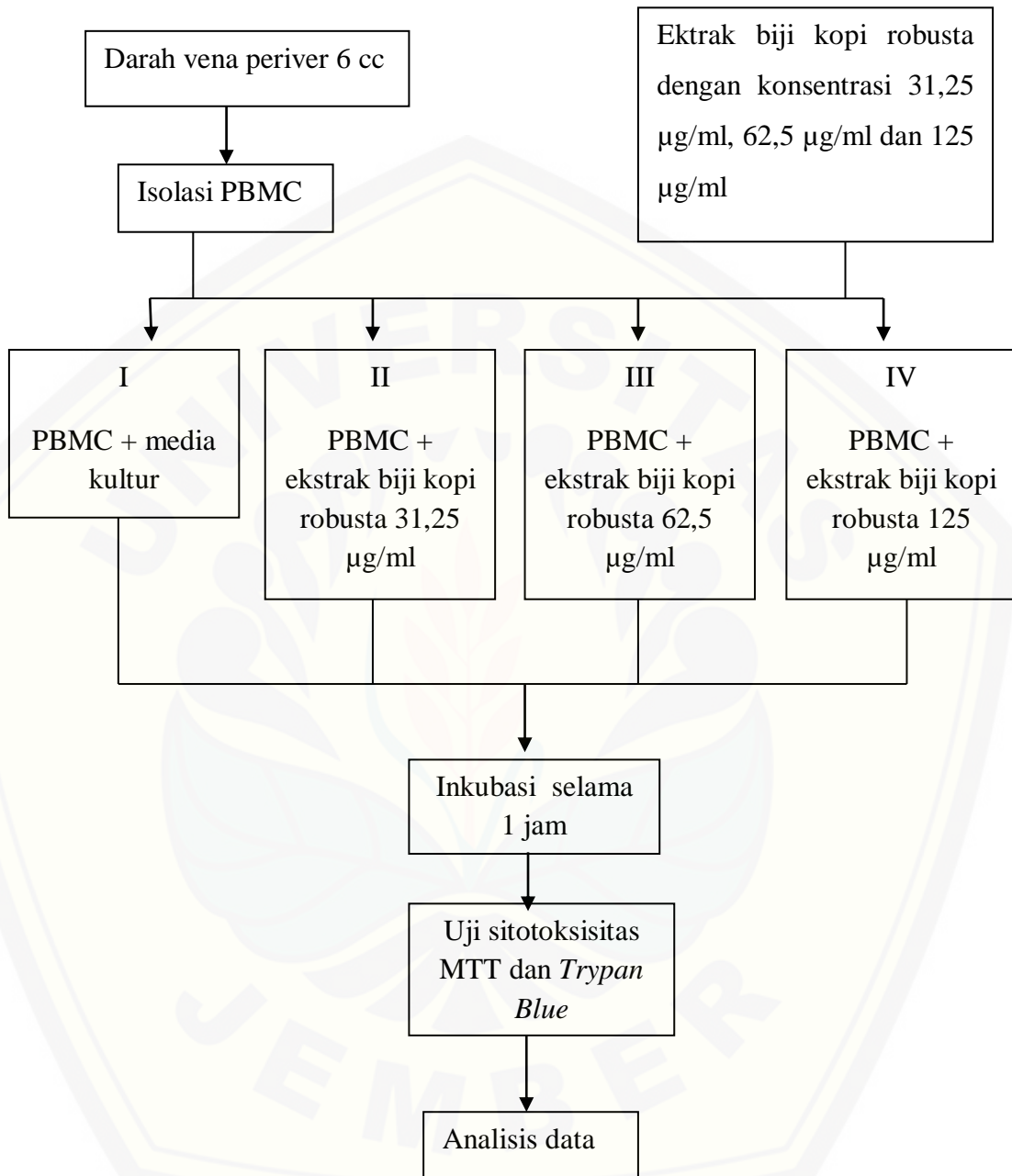
$$\% \text{ Viabilitas sel} = \frac{\text{Jumlah sel hidup}}{\text{Jumlah seluruh sel}} \times 100$$

### 3.8 Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh dilakukan uji normalitas *Shapiro-wilk* dan uji homogenitas dengan uji *Levene-test*. Data yang terdistribusi normal dan homogen kemudian dianalisis menggunakan uji parametrik *One Way Anova*. Selanjutnya dilakukan uji beda *Least Significance Difference* (LSD) untuk mengetahui perbedaan antar uji sampel.



### 3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Pemberian ekstrak biji kopi robusta terhadap sel PBMC menggunakan metode MTT bersifat non-toksik pada konsentrasi 31,25  $\mu\text{g/ml}$ , sedangkan konsentrasi 62,5  $\mu\text{g/ml}$  dan 125  $\mu\text{g/ml}$  bersifat sitotoksik lemah. Penggunaan metode *trypan blue*, ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 31,25  $\mu\text{g/ml}$  dan konsentrasi 62,5  $\mu\text{g/ml}$  bersifat sitotoksik lemah sedangkan konsentrasi 125  $\mu\text{g/ml}$  bersifat sitotoksik menengah terhadap sel PBMC.
2. Viabilitas sel PBMC tertinggi terdapat pada konsentrasi 31,25  $\mu\text{g/ml}$  dengan persentase 87,2% dengan metode MTT dan 75,19% dengan metode *trypan blue*
3. Viabilitas sel PBMC terendah terdapat pada konsentrasi 125  $\mu\text{g/ml}$  dengan persentase 74,2% dengan metode MTT dan 57,63% menggunakan metode *trypan blue*

### 5.2 Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut sehingga dapat diketahui bahan aktif manakah dari ekstrak biji kopi robusta yang dapat menyebabkan toksisitas pada sel.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya dalam penggunaan konsentrasi maksimal non-toksik (tanpa menimbulkan kematian sel) dari ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*).

**DAFTAR PUSTAKA**

- Alvarez. A., Lacalle. J., Cañavate M L., Alonso-Alconada D., Lara-Celador I., Alvarez F J., dan Hilario. E. 2010. Cell death A comprehensive approximation Necrosis. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education. A Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.)*. University of the Basque.
- Badan Pusat Statistik Jawa Timur. 2018. Produksi Perkebunan Kopi Menurut Kabupaten/Kota di Jawa Timur (Ton), 2006-2017. [on line] <https://jatim.bps.go.id/statictable/2018/11/12/1390/produksi-perkebunan-kopi-menurut-kabupaten-kota-di-jawa-timur-ton-2006-2017.html>
- Bahi, M., Jacob, C dan Khairan, K. 2016. Efek Sitotoksik Haarlem Oil Terhadap HI-60 *Cell Line* dan *Steinernema Feltiae*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh. *Jurnal Kedokteran Hewan* Vol. 10 No. 2.
- Bambang, P. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Jakarta: Eska Media.
- Baratawidjaja, K.G. 2013. *Imunologi Dasar: Edisi Ke-10*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- CCRC. 2012. Peran Mitokondria dalam Apoptosis. *Journal Club*. UGM farmasi
- Chamidah, S. 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap Aktivitas Pertumbuhan *Porphyromonas Gingivalis*. T. Tidak diterbitkan. *Skripsi*. Jember: Program Sarjana (S1) Universitas Jember.
- Chan, S. M., Kyoo, K. S. dan Sit, N. M. 2015. Interactions between Plant Extracts and Cell Viability Indicators during Cytotoxicity Testing: Implications for Ethnopharmacological Studies. *Tropical Journal of Pharmaceutical*.
- Choudhury, J. D., Kumar, S., Mayank, V., Mehta, J., dan Bardalai, D. 2012. A Review on Apoptosis & Its Different Pathway. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*.
- Daniel, W W. 2005. *Biostatistic: A Foundation for Analysis in The Health Sciences*. Eight Edition. John Wiley & Sons Inc.
- El-Maarri, O., Walier, M., Behne, F., van, Ü. J., Singer, H., Diaz-Lacava, A., Nüsgen, N., Niemann, B., Watzka, M., Reinsberg, J., van der Ven H.,

- Wienker, T., Stoffel-Wagner, B., Schwaab, R., Oldenburg, J. 2011. Methylation At Global LINE-1 Repeats In Human Blood Are Affected By Gender But Not By Age Or Natural Hormone Cycles. *Research Article PLoS ONE*.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. PMC US National Library of Medicine.
- El-Nabi, S. E. H., Dawoud, G., El Shafey, S. S., dan El-Garawani, I. M. 2018. HPLC analysis of phenolic acids, antioxidant activity and in vitro effectiveness of green and roasted *Coffea arabica* bean extracts: a comparative study. *Anticancer Agents Med Chem*. Menoufia University, Menoufia. Egypt..
- Farah, A. 2012. Coffee Constituents in Coffee : Emerging Health Effects and Disease revention. First Edition. United Kingdom : Blackwell Publishing Ltd.
- Felicia, V. 2014. Viabilitas Monosit Setelah Diinkubasi Dengan Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya*) dan Dipapar *Porphyromonas gingivalis*. Tidak diterbitkan. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Freitas, B. A. A., Almeida., Pinto., Mourão., Massensini, A. R., Filho, O. A. M., Vieira, E. R dan Melo, G. E. A. B. 2014. Trypan Blue Exclusion Assay By Flow Cytometry. *Braz Journal Med Biol Res*.
- García, J. L., Humpolíček, P dan Sába, P. 2014. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *Journal Funct Biomater*.
- Kalimuthu, S dan Se-Kwon, K. 2013. Cell Survival and Apoptosis Signaling as Therapeutic Target for Cancer: Marine Bioactive Compounds. *Int. Journal. Marine Bioprocess Research Center*, Pukyong National University.
- Kiattisin, K., Nantarat, T dan leelapornpisid, P. 2016. Evaluation Of Antioxidant And Anti-Tyrosinase Activities As Well As Stability of Green And Roasted Coffee Bean Extracts From *Coffea Arabica* and *Coffea Canephora* Grown In Thailand. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Vol. 8(10). Chiang Mai University: Thailand.




- Klepeisz, P. 2013. Proteomic profiling of primary cells to investigate effects of nongenotoxic carcinogens and mechanisms of chemoprevention. Department of Biotechnology, Institute of Applied Microbiology.
- Kurnijasanti, R., Hamid, I., dan Rahmawati, K. 2008. Efek Sitotoksik In Vitro Dari Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa*) Terhadap Kultur Sel Kanker Mieloma. *J. Penelit. Med. Eksakta* Vol. 7 No. 1
- Lantto, T. A. 2017. Cytotoxic And Apoptotic Effects Of Selected Phenolic Compounds And Extracts From Edible Plants. Faculty of Pharmacy University of Helsinki.
- Muljana, Wahyu. 2010. *Bercocok Tanam Kopi*. Aneka Ilmu: Semarang.
- Muñoz, A. dan Costa, M. 2013. Nutritionally Mediated Oxidative Stress and Inflammation. *Hindawi Publishing Corporation*. New York University School of Medicine.
- Najiyati, S dan Danarti. 2012. *Kopi, Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. PT. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta : Rineka Cipta
- Nuutinen, U. 2009. Mechanisms and Regulation of Apoptotic Pathways in Human Follicular Lymphoma Cells Aiming for Curative Treatment. Institute of Clinical Medicine Department of Clinical Microbiology University of Kuopio.
- Panggabean, E. 2011. *Buku Pintar Kopi*. Jakarta: Agro Media Pustaka
- Phyma, A. R., Hutomo, S., Suryanto, Y. I dan Susilowati, H. 2015. Viabilitas Sel Epitel Rongga Mulut (*Kb Cell Line*) Yang Dipapar Ekstrak Etanol Kopi. Vol. 1, ISSN: 2460-9684. *Duta Wacana Medical Journal*. Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Duta Wacana.
- Pourahmad, J. dan Salimi, A. 2015. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*.

- Rachmawati, D., Bontkes, H. J., Verstege, M. I., Muris, J., Blomberg, B. Mary E. von., Scheper, R. J dan W, I. M. 2013. Transition metal sensing by Toll-like receptor-4: next to nickel, cobalt and palladium are potent human dendritic cell stimulators. *Contact Dermatitis*. VU University Medical Centre: Amsterdam.
- Rachmawati, D., Alsalem, I. W.A., Bontkes, Hetty J., Verstege, M. I., Gibbs, S., Scheper, R. J., W, I. M. dan van Hoogstraten. 2015. Innate stimulatory capacity of high molecular weight transition metals Au (*gold*) and Hg (*mercury*). *Elvesier*. VU University Medical Centre: Amsterdam.
- Rahardjo, P. 2012. *Kopi: Panduan Budi Daya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rahayu, N. T. 2015. Viabilitas Sel Neutrofil Yang Diinkubasi Dengan Ekstrak Daun Singkong (*Manihot Esculenta*) dan Dipapar Lipopolisakarida (LPS). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Ramawat, K. G. dan Mérillon, Jean-Michel. 2013. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rao, S dan Nadumane, V. K. 2015. Evaluation of the anticancer potential of coffee beans: An *in vitro* study. *Indian Journal of traditional Knowledge*. Vol. 15(2). Jain University: India.
- Sarasmita, M. A dan Laksmiani, N. P. L. 2015. Uji Sitotoksisitas Ekstrak Etanol Limbah Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus Polyrhizus*) pada Sel Kanker Payudara Secara In Vitro Dan In Silico. *Jurnal Farmasi Udayana* Vol. 4, No. 2. Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana.
- Saunders. 2010. *The Anatomy and Physiology Learning System*. an imprint of Elsevier
- Silva, F. M., Iorio, N. L. P., Lobo, L. A, Santos, K. R. N., Farah, A., Maia, L. C., Antonio, A. G. 2014. Antibacterial Effect of Aqueous Extracts and Bioactive Chemical Compounds of *Coffea canephora* against Microorganisms Involved in Dental Caries and Periodontal Disease. *Advances in Microbiology*.
- Siregar, F dan Hadijono, B. S. 2000. Uji Sitotoksisitas dengan Esei MTT. *Jurnal Kedokteran Gigi UI*. Vol: 7.

- Soemarno, M. S. R. 2016. *Pengelolaan Lahan untuk Kebun Kopi*. Malang: Penerbit Gunung Samudera.
- Suwandi, T. 2012. Pengembangan Potensi Antibakteri Kelopak Bunga Hibiscus Sabdariffa L. (*Rosela*) Terhadap Streptococcus Sanguinis Penginduksi Gingivitis Menuju Obat Herbal Terstandar. *Disertasi*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.
- Thakkar, K. N., Prasad, A. K., Nayak, J., Iyer, S. V., dan kumar, S. 2014. Antioxidant and in vitro cytotoxic activity of extracts of aerial parts of *Cocculus hirsutus* (L) using cell line cultures (breast cell line). *The Journal of Phytopharmacology*.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., Expósito, IL dan Kleiveland, C. 2015. *The Impact of Food Bioactives on Health In Vitro and Ex Vivo Models*. Cost: The Netherland.
- Vural, F., Cebesoy, S dan Karakas, M. 2013. Classification of Cell Death. *Journal of Entomology and Zoology Studies*.

## Lampiran A. Surat Keterangan

## A.1 Surat ethical clearance

|  |  |
|--|--|
|   | <b>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)<br/>FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER<br/>(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH<br/>FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</b> |
| <b>ETHIC COMMITTEE APPROVAL</b><br><b>No. 054/UN25.8/KEPK/DL/2018</b>  |  |
| Title of research protocol   | : "Cytotoxicity of Robusta Coffee Beans ( <i>Coffea canephora</i> )<br>Extract Towards Peripheral Blood Mononuclear Cell"  |
| Document approved  | : Research Protocol  |
| Principal investigator   | : Indah Putri Arifiana Dewi  |
| Member of research   | : Fadylla Nuansa Citra Bening  |
| Responsible Physician  | : Indah Putri Arifiana Dewi  |
| Date of approval   | : March 28 <sup>th</sup> , 2018  |
| Place of research  | : 1. Bioscience Laboratory RSGM Universitas Jember   |
| <p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that<br/>the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p> <p style="text-align: right;">Jember, April 2<sup>nd</sup>, 2018</p> |  |
| Dean of Faculty of Dentistry Universitas<br>Jember   | Chairperson of Research Ethics Committee<br>Faculty of Dentistry Universitas Jember  |
| <br>P. M. Kes, Sp. Pros)  | <br>Ayu Ratna Dewanti, M. Si.)   |

## A.2 Surat izin penelitian



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

Nomor : 1361 /UN25.8/TL/2018  
Perihal : Ijin Penelitian

11 APR 2018

Kepada Yth  
Direktur RSGM Universitas Jember  
Di  
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan Ijin penelitian mahasiswa kami dibawah ini :

- 1 Nama : Indah Putri Arifiana Dewi
- 2 NIM : 141610101057
- 3 Semester/Tahun : 2017/2018
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Perumahan Taman Gading B-34 Jember
- 6 Judul Penelitian : Sitotoksitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (Coffea Canephora) Terhadap Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC)
- 7 Lokasi Penelitian : Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember
- 8 Data/alat yang dipinjam : Inkubator, Centrifuge, dll
- 9 Waktu : April 2018 Sd Selesai
- 10 Tujuan Penelitian : Untuk Menganalisis Sitotoksitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (Coffea Canephora) Terhadap Sel Mononuklear Darah Tepi (PBMC)
- 11 Dosen Pembimbing : 1. drg. Dessy Rachmawati, M.Kes, Ph.D  
2. drg. Hengky Bowo Ardhiyanto, MDSc

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an Dekan  
Dekan I,

IDA Susilawati, M.Kes  
NIP. 196109031986022001



### A.3 Surat Identifikasi Tanaman

Kode Dokumen : FR-AUK-064  
Revisi : 0



**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
POLITEKNIK NEGERI JEMBER  
LABORATORIUM TANAMAN**

Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531  
E-mail : [Polije@polije.ac.id](mailto:Polije@polije.ac.id) Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN**

No: 011/ PL17.3.1.02/LL/2018

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan 1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 1361/UN25.8/TL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada specimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

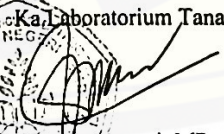
Nama : Indah Putri Arifiana Dewi  
NIM : 141610101057  
Jur/Fak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

Maka dapat disampaikan hasilnya bahwa specimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah: *Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Sub Kelas: Asteridae; Ordo: Rubiales; Famili: Rubicidae; Genus: Coffea; Spesies: Coffea canephora, Pierre*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 1 Maret 2018

Ka. Laboratorium Tanaman

  
Ir. Lili Mastuti, MP  
NIP. 195808201987032001

**A. 4 Informed Consent****SURAT PERSETUJUAN**  
**INFORMED CONSENT**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Zakiyya Ulphiyah

Umur : 20 tahun

Jenis kelamin : Perempuan

Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari :

Nama : Indah Putri Arifiana Dewi

Nim : 141610101057

Fakultas : Kedokteran Gigi

Dengan judul penelitian "**Sitotoksisitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) Terhadap Sel Mononuclear Darah Tepi (PBMC)**", dimana prosedur pelaksanaan penelitian untuk pengambilan sampel ini tidak akan menimbulkan resiko bagi subyek yang bersangkutan

Surat persetujuan ini saya tulis dengan sebenar-benarnya tanpa ada suatu paksaan dari pihak manapun. Dengan ini saya menyatakan sanggup menjadi subyek penelitian ini.

Jember,

Yang menyatakan



(Zakiyya Ulphiyah)

## A. 5 Surat Keterangan Pembuatan Ekstrak



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
**FAKULTAS FARMASI**  
Jl. Kalimantan 1/2 Kampus Tegal Boto. Telp./ Fax. (0331) 324736 Jember 68121

## SURAT KETERANGAN PEMBUATAN EKSTRAK

**Data pemohon** :  
Nama : Indah Putri Arifiana  
NIM : 141610101057  
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember  
**Bahan** : Biji Kopi *Robusta* (*Coffea canephora*)  
**Pelarut Pengekstraksi** : Ethanol 96%  
**Metode ekstraksi** : Maserasi  
**Prosedur** : Serbuk biji kopi *Robusta* (*Coffea canephora*) sebanyak 850 gram dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 4 kali berat serbuk selama 3 hari. Maserat dipekatkan dengan rotary evaporator.  
**Hasil** : Ekstrak biji kopi *Robusta* dengan rendemen 15 % (b/b)  
**Tanggal pembuatan** : 30 Januari 2018

Jember, 2 Februari 2018

Ketua Bagian Biologi Farmasi,



Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt.  
NIP. 198407122008122002

**A.6 Data Kesehatan Umum Subyek**

Nama : Zakiyya Ulphiyah

NIM : 141610101061

Jenis Kelamin/ Umur : Perempuan/ 20

**PERNYATAAN****Kesehatan Umum**

1. Apakah Anda memiliki kebiasaan merokok?  
a. ~~Ya~~ b. Tidak
2. Apakah Anda mengonsumsi alkohol?  
a. ~~Ya~~ b. Tidak
3. Apakah Anda pernah/sedang mengalami penyakit di bawah ini?
  - a. Diabetes Mellitus (~~Ya~~/Tidak)
  - b. Hipertensi (~~Ya~~/Tidak)
  - c. Hipotensi (~~Ya~~/Tidak)
  - d. Jantung (~~Ya~~/Tidak)
  - e. Kelainan Darah (~~Ya~~/Tidak)
  - f. Kejang/Epilepsi (~~Ya~~/Tidak)
  - g. Gangguan Pencernaan (~~Ya~~/Tidak)
  - h. Thyphus (~~Ya~~/Tidak)
  - i. Hepatitis (~~Ya~~/Tidak)
  - j. Demam/Flu (~~Ya~~/Tidak)
  - k. Penyakit lain.....

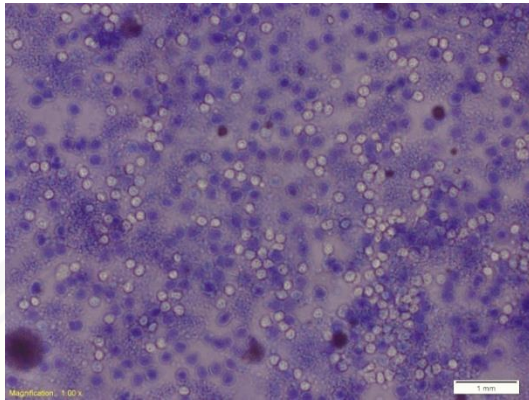
Jember,  
Yang menyatakan



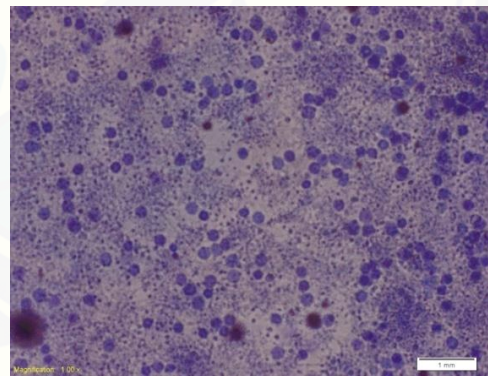
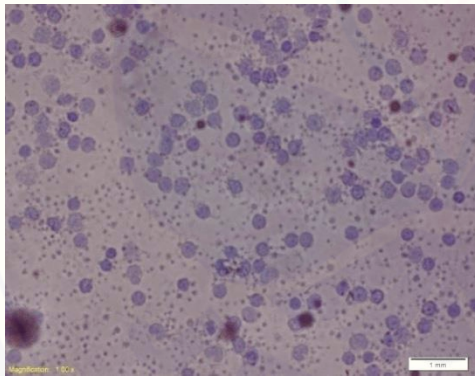
(Zakiyya Ulphiyah)

**Lampiran B. Foto Hasil Penelitian Pendahuluan**

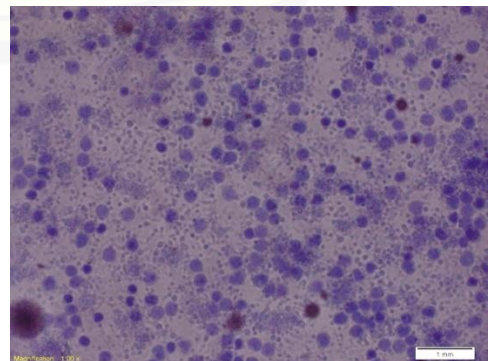
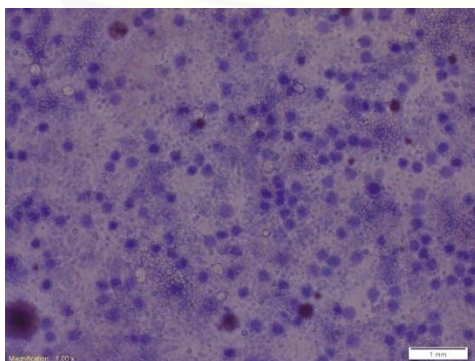
1. Kelompok kontrol (Sel PBMC+ kultur media)



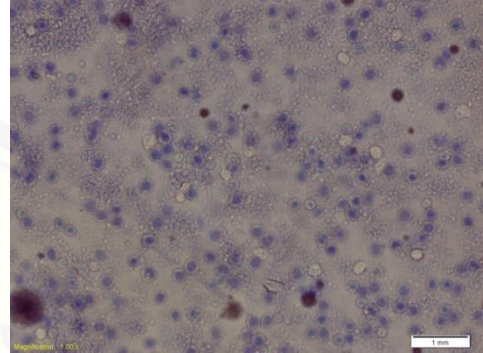
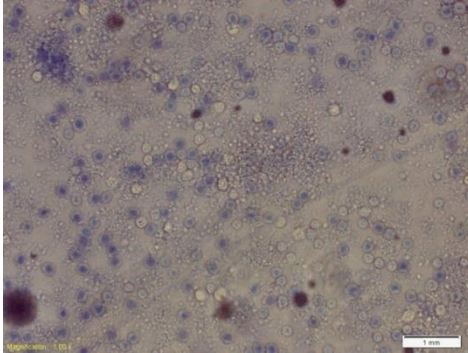
2. Kelompok ekstrak biji kopi dengan konsentrasi 500  $\mu\text{g/ml}$



3. Kelompok ekstrak biji kopi dengan konsentrasi 250  $\mu\text{g/ml}$

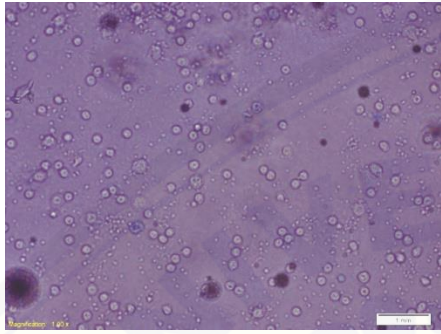


4. Kelompok ekstrak biji kopi dengan konsentrasi 125 µg/ml

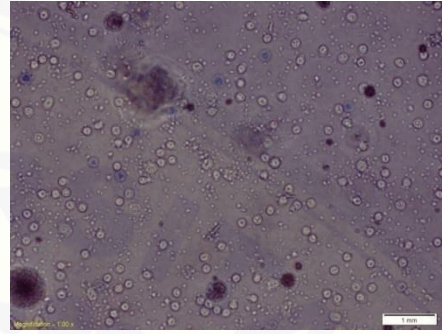


**Lampiran C. Foto Hasil Penelitian**

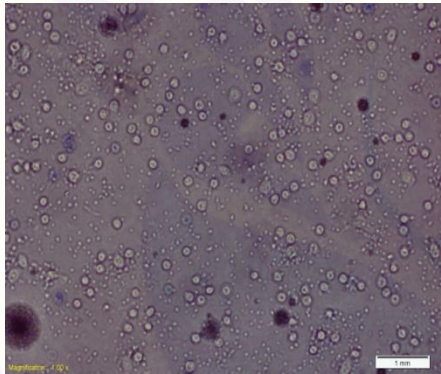
C.1 Gambar mikroskopis viabilitas sel PBMC pada kelompok kontrol dengan perbesaran 400x



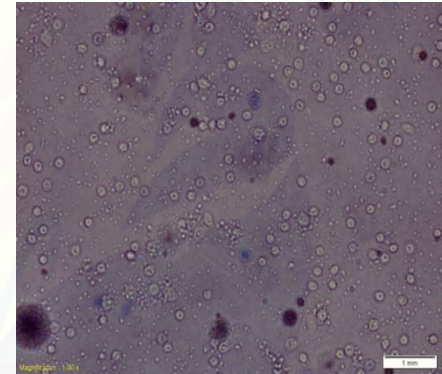
Lapang pandang 1



Lapang pandang 2

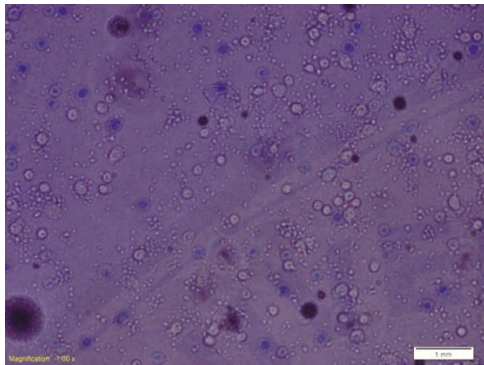


Lapang pandang 3

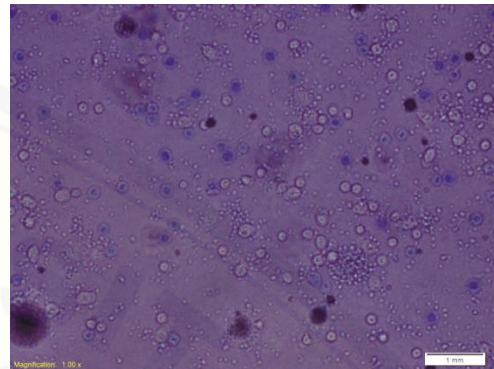


Lapang pandang 4

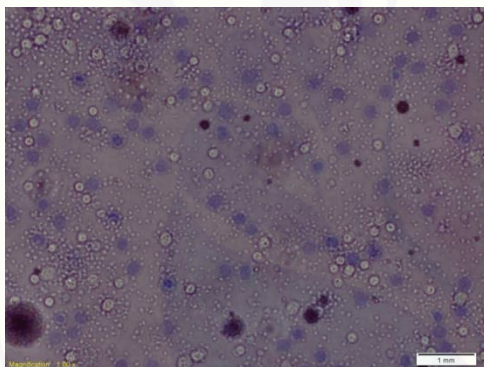
C.2 Gambar mikroskopis viabilitas sel PBMC pada Kelompok perlakuan 1 (sel PBMC + ekstrak biji kopi dengan konsentrasi 125  $\mu\text{g/ml}$ )



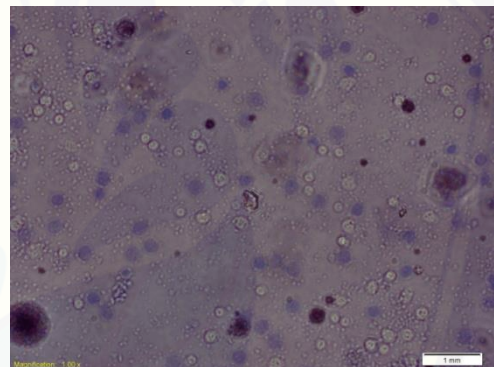
Lapang pandang 1



Lapang pandang 2



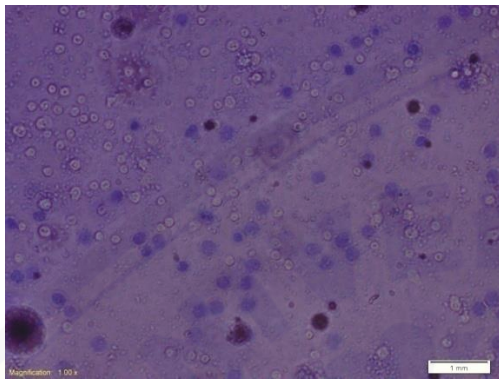
Lapang pandang 3



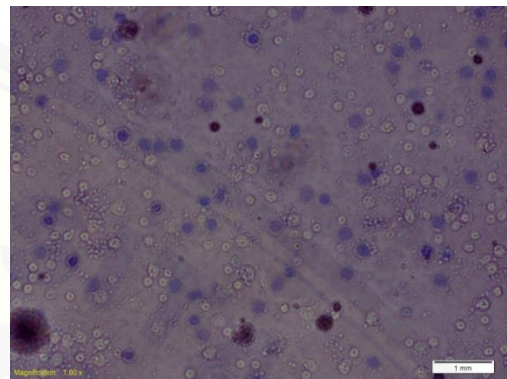
Lapang pandang 4



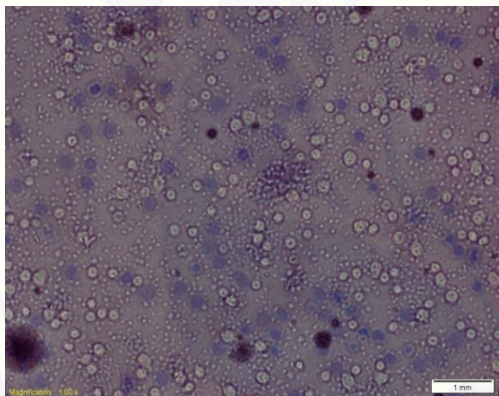
C.3 Gambar mikroskopis viabilitas sel PBMC pada Kelompok perlakuan 1 (sel PBMC + ekstrak biji kopi dengan konsentrasi 62,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) dengan perbesaran 400x



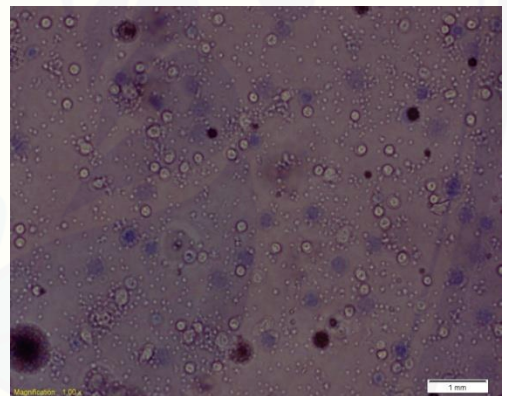
Lapang pandang 1



Lapang pandang 2

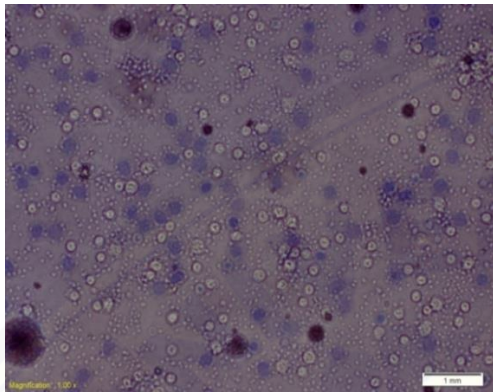


Lapang pandang 3

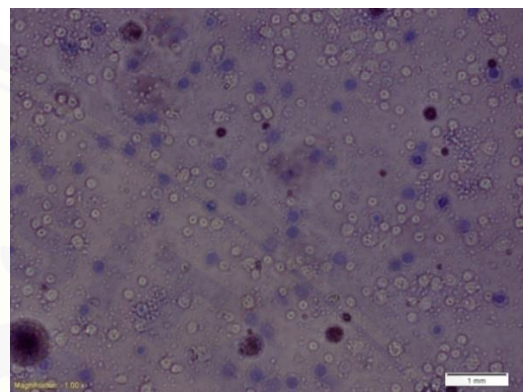


Lapang pandang 4

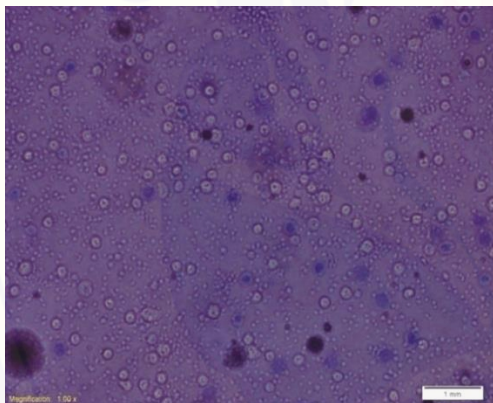
C.4 Gambar mikroskopis viabilitas sel PBMC pada Kelompok perlakuan (sel PBMC + ekstrak biji kopi dengan konsentrasi 31,25  $\mu\text{g/ml}$ ) dengan perbesaran 400x



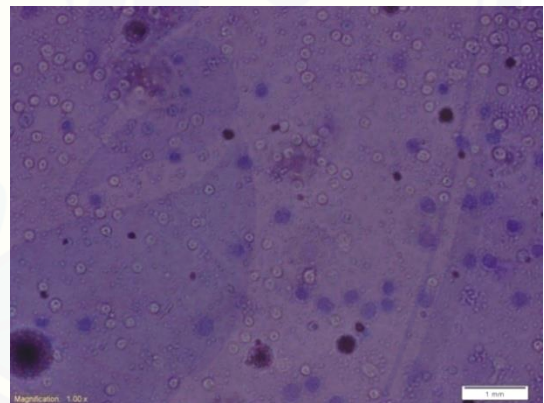
Lapang pandang 1



Lapang pandang 2



Lapang pandang 3



Lapang pandang 4

## Lampiran D. Analisis Data

### D.1 Analisis data hasil penelitian dengan metode *Trypan blue*

| % Viabilitas      |         |    |                |         |         |
|-------------------|---------|----|----------------|---------|---------|
| Konsentrasi       | Mean    | N  | Std. Deviation | Minimum | Maximum |
| Konsentrasi 0     | 91.0750 | 4  | 3.61959        | 86.00   | 94.08   |
| Konsentrasi 31,25 | 76.0250 | 4  | 2.88025        | 73.60   | 80.20   |
| Konsentrasi 62,5  | 67.1750 | 4  | 2.28528        | 65.00   | 69.70   |
| Konsentrasi 125   | 55.6750 | 4  | 5.17904        | 50.00   | 61.00   |
| Total             | 72.4875 | 16 | 13.74990       | 50.00   | 94.08   |

#### 1. Uji Normalitas dengan Saphiro-Wilk

| Tests of Normality |                   |              |    |      |
|--------------------|-------------------|--------------|----|------|
|                    | Konsentrasi       | Shapiro-Wilk |    |      |
|                    |                   | Statistic    | df | Sig. |
| % Viabilitas       | Konsentrasi 0     | .890         | 4  | .385 |
|                    | Konsentrasi 31,25 | .845         | 4  | .210 |
|                    | Konsentrasi 62,5  | .888         | 4  | .372 |
|                    | Konsentrasi 125   | .921         | 4  | .541 |

a. Lilliefors Significance Correction

## 2. Uji Homogenitas dengan Levene Test

### Test of Homogeneity of Variances

| % Viabilitas     |     |     |      |
|------------------|-----|-----|------|
| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 2.158            | 3   | 12  | .146 |

## 3. Uji beda dengan Oneway-Anova

### ANOVA

| % Viabilitas   |                |    |             |        |      |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
| Between Groups | 2675.567       | 3  | 891.856     | 66.753 | .000 |
| Within Groups  | 160.327        | 12 | 13.361      |        |      |
| Total          | 2835.894       | 15 |             |        |      |

#### 4. Uji Beda Lanjutan dengan LSD

| Multiple Comparisons             |                   |                          |            |      |                         |             |
|----------------------------------|-------------------|--------------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| Dependent Variable: % Viabilitas |                   |                          |            |      |                         |             |
| LSD                              |                   |                          |            |      |                         |             |
| (I) Konsentrasi                  | (J) Konsentrasi   | Mean Difference<br>(I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|                                  |                   |                          |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| Konsentrasi 0                    | Konsentrasi 31,25 | 15.05000*                | 2.58462    | .000 | 9.4186                  | 20.6814     |
|                                  | Konsentrasi 62,5  | 23.90000*                | 2.58462    | .000 | 18.2686                 | 29.5314     |
|                                  | Konsentrasi 125   | 35.40000*                | 2.58462    | .000 | 29.7686                 | 41.0314     |
| Konsentrasi 31,25                | Konsentrasi 0     | -15.05000*               | 2.58462    | .000 | -20.6814                | -9.4186     |
|                                  | Konsentrasi 62,5  | 8.85000*                 | 2.58462    | .005 | 3.2186                  | 14.4814     |
|                                  | Konsentrasi 125   | 20.35000*                | 2.58462    | .000 | 14.7186                 | 25.9814     |
| Konsentrasi 62,5                 | Konsentrasi 0     | -23.90000*               | 2.58462    | .000 | -29.5314                | -18.2686    |
|                                  | Konsentrasi 31,25 | -8.85000*                | 2.58462    | .005 | -14.4814                | -3.2186     |
|                                  | Konsentrasi 125   | 11.50000*                | 2.58462    | .001 | 5.8686                  | 17.1314     |
| Konsentrasi 125                  | Konsentrasi 0     | -35.40000*               | 2.58462    | .000 | -41.0314                | -29.7686    |
|                                  | Konsentrasi 31,25 | -20.35000*               | 2.58462    | .000 | -25.9814                | -14.7186    |
|                                  | Konsentrasi 62,5  | -11.50000*               | 2.58462    | .001 | -17.1314                | -5.8686     |

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

## D.2 Analisis data hasil penelitian dengan metode MTT

### Means

| Report            |          |   |                |         |         |
|-------------------|----------|---|----------------|---------|---------|
| % Viabilitas      |          |   |                |         |         |
| Konsentrasi       | Mean     | N | Std. Deviation | Minimum | Maximum |
| Konsentrasi 0     | 100.0000 | 4 | .00000         | 100.00  | 100.00  |
| Konsentrasi 31,25 | 87.28    | 4 | 3.42479        | 81      | 95      |
| Konsentrasi 62,5  | 79.28    | 4 | 1.81177        | 74      | 89      |
| Konsentrasi 125   | 74.00    | 4 | 3.41614        | 72      | 77      |

### 1. Uji Normalitas

| Tests of Normality <sup>a</sup> |                   |              |    |      |
|---------------------------------|-------------------|--------------|----|------|
|                                 | Konsentrasi       | Shapiro-Wilk |    |      |
|                                 |                   | Statistic    | df | Sig. |
| % Viabilitas                    | Konsentrasi 31,25 | .970         | 4  | .843 |
|                                 | Konsentrasi 62,5  | .896         | 4  | .409 |
|                                 | Konsentrasi 125   | .784         | 4  | .076 |

a. % Viabilitas is constant when Konsentrasi = Konsentrasi 0 It has been omitted.

b. Lilliefors Significance Correction

## 2. Uji Homogenitas

| Test of Homogeneity of Variances |     |     |      |
|----------------------------------|-----|-----|------|
| % Viabilitas                     |     |     |      |
| Levene Statistic                 | df1 | df2 | Sig. |
| 3.880                            | 2   | 9   | .061 |

## 3. Uji One way Anova

| ANOVA          |                |    |             |        |      |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| % Viabilitas   |                |    |             |        |      |
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
| Between Groups | 1673.525       | 3  | 557.842     | 83.629 | .000 |
| Within Groups  | 80.045         | 12 | 6.670       |        |      |
| Total          | 1753.570       | 15 |             |        |      |

#### 4. Uji LSD

| Multiple Comparisons             |                   |                          |            |      |                         |             |
|----------------------------------|-------------------|--------------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| Dependent Variable: % Viabilitas |                   |                          |            |      |                         |             |
| .SD                              |                   |                          |            |      |                         |             |
| (I) Konsentrasi                  | (J) Konsentrasi   | Mean Difference<br>(I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|                                  |                   |                          |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| Konsentrasi 0                    | Konsentrasi 31,25 | 18.57500*                | 1.82626    | .000 | 14.5959                 | 22.5541     |
|                                  | Konsentrasi 62,5  | 22.97500*                | 1.82626    | .000 | 18.9959                 | 26.9541     |
|                                  | Konsentrasi 125   | 26.55000*                | 1.82626    | .000 | 22.5709                 | 30.5291     |
| Konsentrasi 31,25                | Konsentrasi 0     | -18.57500*               | 1.82626    | .000 | -22.5541                | -14.5959    |
|                                  | Konsentrasi 62,5  | 4.40000*                 | 1.82626    | .033 | .4209                   | 8.3791      |
|                                  | Konsentrasi 125   | 7.97500*                 | 1.82626    | .001 | 3.9959                  | 11.9541     |
| Konsentrasi 62,5                 | Konsentrasi 0     | -22.97500*               | 1.82626    | .000 | -26.9541                | -18.9959    |
|                                  | Konsentrasi 31,25 | -4.40000*                | 1.82626    | .033 | -8.3791                 | -.4209      |
|                                  | Konsentrasi 125   | 3.57500                  | 1.82626    | .074 | -.4041                  | 7.5541      |
| Konsentrasi 125                  | Konsentrasi 0     | -26.55000*               | 1.82626    | .000 | -30.5291                | -22.5709    |
|                                  | Konsentrasi 31,25 | -7.97500*                | 1.82626    | .001 | -11.9541                | -3.9959     |
|                                  | Konsentrasi 62,5  | -3.57500                 | 1.82626    | .074 | -7.5541                 | .4041       |

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



**Lampiran E. Alat dan Bahan Penelitian****E.1 Alat dan bahan penelitian pembuatan ekstrak biji kopi robusta**

1. Bubuk kopi dan timbangan



2. Toples kaca



3. Gelas ukur



4. Etanol 96%



5. Corong kaca



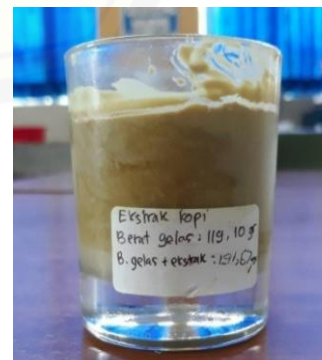
6. Pengaduk



7. Kertas saring



8. Rotary evaporator



9. Ekstrak kopi

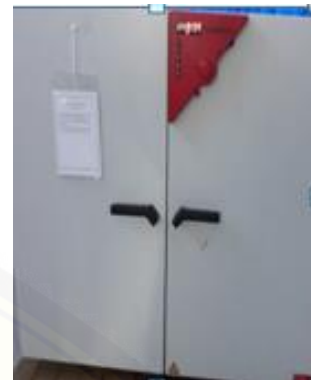
**E.2 Alat dan bahan penelitian uji sitotoksitas**



1. Centrifuge



2. Incubator shaker



3. Oven



4. Mikroskop inverted



5. Tabung heparin



6. Tabung falcon



7. Blue tip dan Yellow tip



8. Pipet mikro



9. Filter syringe



10. PBS



11. MTT



12. Alkohol 70 %



13. RPMI



14. Aquades steril



15. M199



16. DMSO



17. Well plate 96



18. Well plate 24



19. Tabung eppendorf tube



20. Vortex



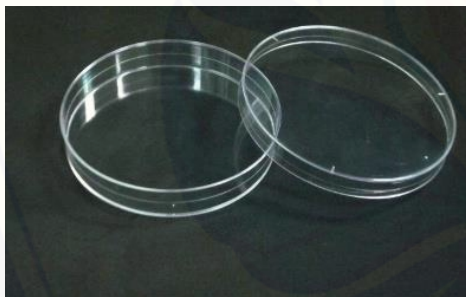
21. Cover slip



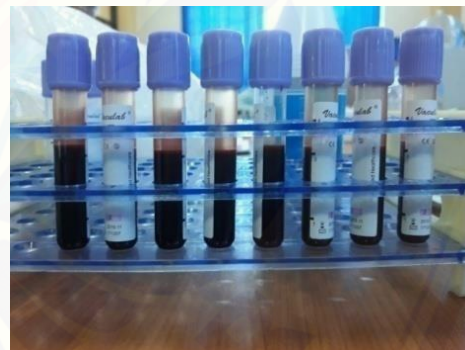
22. Laminar flow



23. ELISA reader



24. Petridish



25. Darah vena perifer



26. Sryringe 6 ml

## Lampiran F. Dokumentasi Penelitian

### F.1 Dokumentasi Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Robusta



1. Penimbangan biji kopi robusta yang telah dihaluskan



2. Bubuk kopi robusta di pindahkan ke dalam toples kaca



3. Maserasi dengan menambahkan etanol 96%



4. Mengaduk campuran bubuk kopi dan etanol 96%



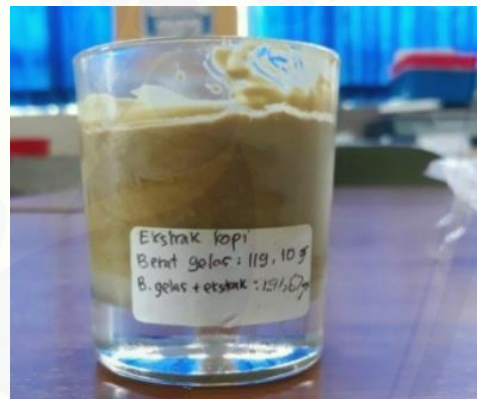
5. Hasil maserasi selama 3 hari



6. Menyaring hasil maserasi dengan menggunakan corong



7. Memekatkan hasil maserat menggunakan *rotary evaporator*

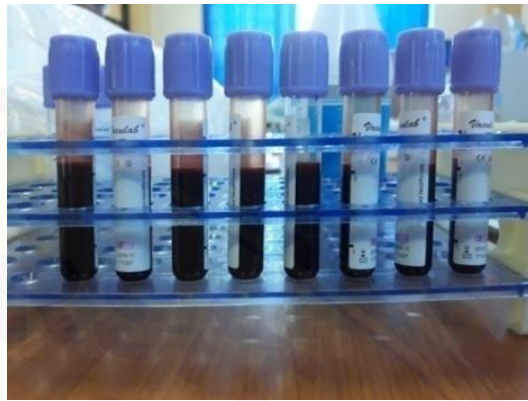


8. Ekstrak biji kopi robusta

## F.2 Dokumentasi Isolasi Sel



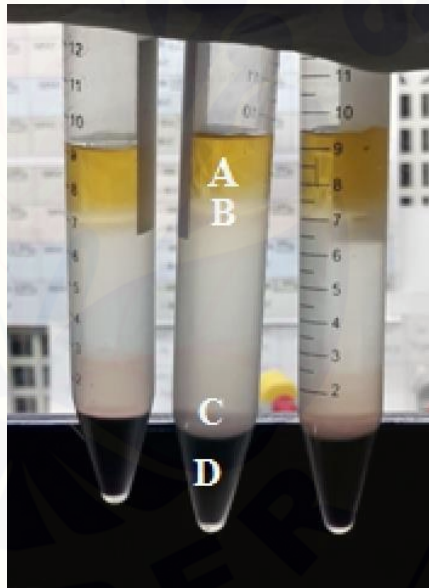
1. Pengambilan darah

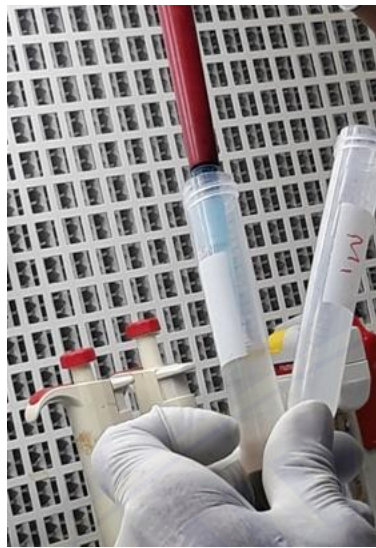


2. Darah dalam tabung heparin



3. Sentrifugasi 400 g selama 10 menit

4. Terbentuk 4 lapisan yaitu :  
A. plasma, B. PBMC,  
C. lymphoprep dan D. eritrosit



5. Mengambil lapisan PBMC



6. Ditambahkan medium RPMI



7. Inkubasi 20-30 menit

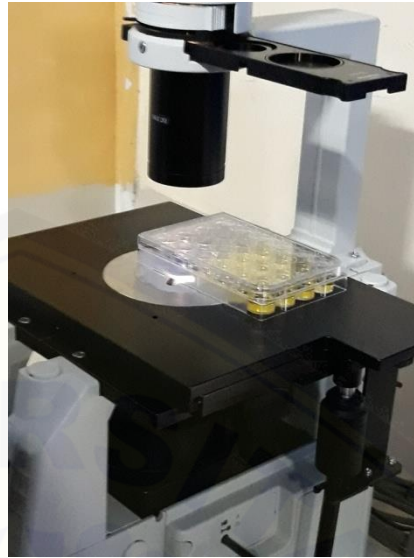


8. Mengganti medium menggunakan M199 lalu dipapar dengan ekstrak biji kopi robusta





9. Inkubasi selama 1 jam dalam inkubator shaker



10. Pembacaan sel menggunakan mikroskop inverted setelah di berikan trypan blue (untuk *well plate 24*)



11. Pembacaan sel menggunakan ELISA *reader* setelah di berikan MTT (untuk *well plate 96*)

### Lampiran G. Cara Pengenceran Ekstrak

Konsentrasi ekstrak biji kopi robusta yang digunakan yaitu 31,25 µg/ml, 62,5 µg/ml dan 125 µg/ml. Konsentrasi tersebut dihasilkan dengan pengenceran menggunakan aquades steril. Pembuatan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta menggunakan rumus sebagai berikut :

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$V_1$  = volume yang dibutuhkan (ml)

$C_1$  = konsentrasi awal (mg)

$V_2$  = volume larutan ekstrak yang akan dibuat (ml)

$C_2$  = konsentrasi yang akan dibuat (mg)

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 \times 1 = 12 \times 0,125$$

$$V_1 = 1,5 \text{ mg/ml}$$

Jadi untuk mendapatkan konsentrasi 125 µg/ml, dilakukan dengan cara menambahkan larutan aquades steril sebanyak 12 ml kedalam 1,5 mg ekstrak biji kopi robusta

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 = 12 \times 0,0625$$

$$V_1 = 0,75 \text{ mg/ml}$$

Jadi untuk mendapatkan konsentrasi 62,5 µg/ml, dilakukan dengan cara menambahkan larutan aquades steril sebanyak 12 ml kedalam 0,75 mg ekstrak biji kopi robusta

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 = 12 \times 0,03125$$

$$V_1 = 0,3725 \text{ mg/ml}$$

Jadi untuk mendapatkan konsentrasi 31,25 µg/ml, dilakukan dengan cara menambahkan larutan aquades steril sebanyak 12 ml kedalam 0,3725 mg ekstrak biji kopi robusta