

**EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK KOPI HIJAU ROBUSTA
TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PERITONEAL
MENCIT SECARA *IN-VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

HABIBI

NIM. 15620081



PRODI BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2020

**EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK KOPI HIJAU ROBUSTA
TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PERITONEAL
MENCIT SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:
HABIBI
NIM.15620081

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam Memperoleh
Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PRODI BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK KOPI HIJAU ROBUSTA
TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PERITONEAL
MENCIT SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :

Habibi

15620081

Telah disetujui oleh :

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Kholifah Holil, M. Si
19751106 200912 2 002

Mujahidin Ahmad, M. Sc
19860512 201903 1 002

Mengetahui
Ketua Program Studi Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M. P
19741018 200312 2 002

**EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK KOPI HIJAU ROBUSTA
TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PERITONEAL
MENCIT SECARA *IN-VITRO***

SKRIPSI

Oleh:
HABIBI
NIM. 15620081

Telah dipertahankan
Di depan dewan penguji skripsi dan dinyatakan diterima sebagai salah Satu
persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal 10 Desember 2020

Penguji Utama	<u>Dr. Retno Susilowati, M.Si</u> NIP. 19671113 199402 2 001	
Ketua Penguji	<u>Dr. Kiptiyah, M.Si</u> NIP. 19731005 200212 2 003	
Sekretaris Penguji	<u>Kholifah Holil, M.Si</u> NIP.19751106 200912 2 002	
Anggota Penguji	<u>Mujahidin Ahmad, M.Sc</u> NIP 19860512 201903 1 002	



Mengesahkan
Ketua Program Studi Biologi

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP. 19741018 200312 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan syukur
“Alhamdulillah Rabbil ‘Alamiin”

Puji syukur kepada Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat, karunia serta pertolongan yang telah memberikan hamba kesempatan untuk mencari ilmu dan melaksanakan segala kewajiban. Skripsi ini saya persembahkan kepada orang-orang yang telah memberikan dukungan dan semangat, kepada:

1. Kepada kedua orang tua Abi dan Umi, yang tiada hentinya melantunkan do'a dan mencurahkan kasih sayangnya kepada saya.
2. Kakak-kakak saya, yang selalu memberikan dukungan dalam hal apapun selama proses studi
3. Ibu Kholifah Holil, M.Si selaku dosen pembimbing biologi yang telah memberikan bimbingan selama melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi
4. Bapak Mujahiddin Ahmad, M.Sc selaku dosen pembimbing integrasi yang telah memberikan arahan selama penulisan skripsi
5. Guru-guru serta Pengasuh Pondok Pesantren Mahasiswa Firsdaus Malang yang telah menyalurkan ilmu kepada saya selama menimba ilmu di Pesantren
6. Sahabat-Sahabat tersayang dan teman-teman tercinta yang telah bersedia menemani serta membantu dalam hal apapun selama proses studi.

Semoga Allah SWT memberikan balasan kebaikan dan dijadikannya kebaikan tersebut sebagai amal jariyah. Semoga karya ini dapat bermanfaat khususnya bagi saya dan orang lain. Amin.

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Habibi
NIM : 15620081
Prodi : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Efek Imunomodulator Ekstrak Kopi Hijau Robusta Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal Mencit Secara *In Vitro*

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian ini tidak terdapat unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali secara tertulis dikutip dalam naskah dan disebutkan dalam sumber kutipan atau daftar pustaka. Apabila pernyataan hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur penjiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggungjawabkan serta diproses sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Malang, 03 Desember 2020

Yang Membuat Pernyataan



Habibi

NIM.15620081

PENDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenalkan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.



KATA PENGANTAR

Asslamu'alaikum Wr.Wb.

Syukur Alhamdulillah penulis hanturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan skripsi dengan baik. Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian bersama dengan dosen pembimbing yang diketahui oleh Ibu Kholifah Holil, M.Si dengan judul “Efek Imunomodulator Ekstrak Kopi Hijau Robusta (*Coffea Canephora*) Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal Mencit (*Mus Musculus*) Secara *In Vitro* (Implementasi QS *Asy-Syu'ara*:7)”.

Penulis mengucapkan terima kasih seiring doa dan harapan jazakumullah ahsanal jaza' kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. Abdul Haris, M Ag selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P selaku ketua prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang Malik Ibrahim Malang
4. Kholifah Holil, M.Si dan Mujahidin Ahmad, M.Sc selaku pembimbing skripsi dan pembimbing agama yang telah banyak memberikan bimbingan selama melaksanakan penelitian dan penulisan skripsi.
5. Dr. Retno Susilowati, M.Si dan Dr. Kiptiyah, M.Si selaku penguji yang banyak memberikan masukan dalam penulisan skripsi.
6. Abi dan Umi serta kaka-kakak saya tercinta yang senantiasa melantunkan do'a dan memberikan semangat kepada penulis dalam menuntut ilmu.
7. Lil Hanifah, M.Si selaku Laboran Kultur Jaringan Hewan dan Tumbuhan yang telah banyak membantu serta memberikan bimbingan selama proses penelitian.
8. Teman-teman penelitian (Nuri Thobibatus Shofia, Yekti Indriani, Masduki) yang telah bersedia untuk berjuang bersama dari awal hingga akhir penelitian.
9. Teman-teman Biologi angkatan 2015 (GENETIST) dan teman-teman Pesantren Mahasiswa Firdaus serta semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materil maupun moril.

Penulisan menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bias memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi. Amin Ya Rabbal Alamin.

Wassalamu'alaikum Wr.Wb

MOTO HIDUP

لَهُ مُعَقِّبَاتٌ مِّنْ بَيْنِ يَدَيْهِ وَمِنْ خَلْفِهِ يَحْفَظُونَهُ مِنْ أَمْرِ اللَّهِ إِنَّ اللَّهَ لَا يُغَيِّرُ مَا بِقَوْمٍ حَتَّىٰ يُغَيِّرُوا مَا بِأَنْفُسِهِمْ وَإِذَا أَرَادَ اللَّهُ بِقَوْمٍ سُوءًا فَلَا مَرَدَّ لَهُ وَمَا لَهُمْ مِّنْ دُونِهِ مِنْ وَالٍ ۝

“Artinya: Bagi manusia ada malaikat-malaikat yang selalu mengikutinya bergiliran, di muka dan di belakangnya, mereka menjaganya atas perintah Allah. Sesungguhnya Allah tidak merubah keadaan sesuatu kaum sehingga mereka merubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri. Dan apabila Allah menghendaki keburukan terhadap sesuatu kaum, maka tak ada yang dapat menolaknya; dan sekali-kali tak ada pelindung bagi mereka selain Dia (QS. Ar-Ra’d [13]: 11)”.

DAFTAR ISI

JUDUL PENELITIAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
PENDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	vi
KATA PENGANTAR	vii
MOTO HIDUP.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
ABSTRAK.....	xv
مستخلص البحث.....	xvi
ABSTRAC.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	6
1.3. Tujuan	6
1.4. Hipotesis.....	6
1.5. Manfaat Penelitian	6
1.6. Batasan Masalah.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1. Kopi dalam Prespektif Islam.....	8
2.2. Kopi Robusta (<i>Coffea canephora</i>)	10
2.2.1. Sistematika Tanaman	10
2.2.2. Morfologi Tanaman	11
2.2.3. Kandungan Fitokimia.....	13
2.2.4. Manfaat dan Efek Samping.....	15
2.3. Imunomodulator.....	18
2.3.1. Respon Imun Bawaan	20
2.3.2. Respon Imun Didapat.....	21
2.3.3. Faktor-Faktor Mempengaruhi Respon Imun.....	22
2.3.4. Macam-Macam Imunomodulator.....	24
2.3.5. Imunomodulator dari Tumbuhan	32

2.4.	Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal	36
2.4.1.	Fagositosis	36
2.4.2.	Makrofag	38
2.4.3.	Makrofag Peritoneal	40
2.4.4.	Faktor-Faktor Aktivasi Fagositosis	41
2.4.5.	Antigen Lateks	43
2.5.	Mencit (<i>Mus musculus</i>)	44
2.5.1.	Deskripsi	44
2.5.2.	Taksonomi	45
BAB III METODE PENELITIAN		47
3.1.	Rancangan Penelitian	47
3.2.	Variabel Penelitian	47
3.3.	Waktu dan Tempat	48
3.4.	Alat dan Bahan	48
3.4.1.	Alat	48
3.4.2.	Bahan	48
3.5.	Prosedur Penelitian	49
3.5.1.	Populasi dan Sampel Penelitian	49
3.5.2.	Preparasi Ruang	49
3.5.3.	Preparasi Alat	50
3.5.4.	Preparasi Bahan	50
3.5.5.	Isolasi Sel Makrofag Peritoneal	51
3.5.6.	Kultur Sel Makrofag Peritoneal	52
3.5.7.	Uji Aktivitas Fagositosis	53
3.5.8.	Pengamatan dan Pengambilan Data	54
3.5.9.	Analisis Data	55
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		56
4.1.	Efek Imunomodulator Ekstrak Kopi Hijau Robusta (<i>Coffeacanephora</i>) Terhadap Persentase Fagositosis Makrofag Peritoneal Secara <i>in vitro</i>	57
4.2.	Efek Imunomodulator Ekstrak Kopi Hijau robusta (<i>Coffea canephora</i>) Terhadap Kapasitas Fagositosis Makrofag Peritoneal secara <i>in vitro</i> ...	64
BAN V PENUTUP		73
5.1.	KESIMPULAN	73
5.2.	SARAN	73

DAFTAR PUSTAKA	74
LAMPIRAN	85



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Karakteristik a. Buah, b. Daun dan bunga, c,d. Habitat dari tanaman kopi robusta.....	12
Gambar 2.2	Struktur kimia asam klorogenat (5-ACG).....	14
Gambar 2.3	Struktur kimia kafein.....	15
Gambar 2.4	Gambaran umum respon imun bawaan (non-spesifik) dan respon imun didapat (spesifik).....	22
Gambar 2.5	Mekanisme fagositosis	38
Gambar 2.6	Hematopoietik sel mononuklear (monosit dan makrofag) dari sel induk pluripoten dalam sumsum tulang	39
Gambar 2.7	Kultur sel makrofag peritoneal pada media RPMI1640	41
Gambar 3.1	Isolasi makrofag peritoneal mencit (<i>Mus musculus</i>).....	53
Gambar 4.1	Aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit Balb/c yang diamati dengan mikroskop inverted perbesaran 200X dan pewarnaan Giemsa 20%	56

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Jenis sel makrofag residen dalam beberapa jaringan yang berbeda..	38
Tabel 4.1	Hasil uji BNT pemberian ekstra kopi hijau robusta (<i>Coffea canephora</i>) terhadap persentase fagositosis (PF) sel makrofag peritoneal secara <i>in vitro</i>	56
Tabel 4.2	Hasil uji Duncan pemberian ekstra kopi hijau robusta (<i>Coffea canephora</i>) terhadap persentase fagositosis (PF) sel makrofag peritoneal secara <i>in vitro</i>	64



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Pengamatan PF dan KF Makrofag Peritoneal.....	79
Lampiran 2. Hasil Uji Statistik PF dan KF Makrofag Peritoneal.	88
Lampiran 3. Hasil SPSS Uji Normalitas PF dan KF Makrofag Peritoneal.....	88
Lampiran 4. Hasil SPSS Uji Homogenitas Makrofag Peritoneal.	89
Lampiran 5. Hasil SPSS Uji One Way-ANOVA PF dan KF Makrofag.....	91
Lampiran 6. Hasil SPSS Uji Lanjut PF dan KF Makrofag Peritoneal.	91

ABSTRAK

Habibi, 2020. Efek Imunomodulator Ekstrak Kopi Hijau Robusta Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal Mencit Secara *in Vitro*. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi: Kholifah Holil, M.Si; Pembimbing Agama: Mujahidin Ahmad, M.Sc.

Kata kunci: *aktivitas fagositosis, imunomodulator, kopi hijau robusta, makrofag peritoneal*

Kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) diketahui mengandung senyawa antioksidan dan antiinflamasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kopi hitam. Kandungan fenolik asam klorogenat, kafein, dan flavonoid dalam kopi hijau robusta memiliki potensi sebagai imunomodulator. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek imunomodulator ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit (*Mus musculus*) secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan lima kali ulangan. Sel makrofag diisolasi dari rongga peritoneal mencit (*Mus musculus*) jantan dan dikultur dalam media RPMI 10% FBS selama 1x24 jam dengan CO₂ 5% dan suhu 37⁰C kemudian diberi perlakuan. Perlakuan yang digunakan yaitu K+ (produk-X imunomodulator), ekstrak kopi hijau robusta dengan varian konsentrasi yaitu P0 (0 µg/ml), P1 (25 µg/ml), P2 (50 µg/ml) dan P3 (75 µg/ml) yang diberikan dalam media kultur tersebut kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% suhu 37⁰C selama 6 jam. Variabel yang digunakan adalah aktivitas fagositosis makrofag meliputi dua parameter yaitu persentase fagositosis (PF) dan kapasitas fagositosis (KF). Aktivitas fagositosis makrofag dapat dilihat dengan pewarnaan Giemsa 20%. Data penelitian ini dianalisis menggunakan *one way ANOVA* ($\alpha=0.05$). Hasil analisis yang berpengaruh kemudian diuji lanjut sesuai dengan besar nilai koefisien keragaman (KK) yang didapat. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) berpengaruh terhadap aktivitas PF dan KF makrofag peritoneal mencit (*Mus musculus*) secara *in vitro*. Pemberian ekstrak kopi hijau robusta dengan konsentrasi P2 (50 µg/ml) merupakan perlakuan yang paling efektif dalam meningkatkan aktivitas PF dan KF makrofag peritoneal yaitu sebesar 61.70±4.738% dan 188±12.124 lateks/ml.

مستخلص البحث

تأثير مناعة مستخرج القهوة الخضراء رابوستا على نشاط البلعمة البريتونية من الفرنان في المختبر

حبيبي، خليفة خليل، مجاهدين أحمد

الكلمات المفتاحية: المناعة، القهوة الخضراء رابوستا، نشاط البلعمة، البلعمة البريتونية، في المختبر

الهدف من هذا البحث لمعرفة تأثير مستخرج القهوة الخضراء رابوستا (*Coffea canephora*) على نشاط البلعمة البريتونية من الفرنان (*Mus musculus*) في المختبر. استخدم هذا البحث التصميم العشوائي الكامل بخمس معالجات وخمس مكررات. تم عزل خلايا البلاعم من التجويف البريتوني لذكور الفرنان وزرعت درجة الحرارة في وسط RPMI 10 في المائة FBS لمدة 1 × 24 ساعة باستخدام كربون ديوكسيداً 5 في المائة ودرجة الحرارة 37 درجة مئوية تمت معالجتها. المعالجات المستخدمة هي كالسيوم (منتج- X العدلات المناعية)، المعالجة الصفيرية (0 ميكروغرام / مل)، المعالجة الأولى (25 ميكروغرام / مل)، المعالجة الثانية (50 ميكروغرام / مل) والمعالجة الثالثة (75 ميكروغرام / مل) التي أعطيت في وسط الثقافة ثم حضنت في حاضنة كربون ديوكسيداً 5 في المائة درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 6 ساعات. كان المتغير المستخدم هو نشاط البلعمة من الضامة الذي يشمل على معاملين، وهما نسبة البلعمة (PF) وقدرة البلعمة (KF). يمكن رؤية نشاط البلعمة البلاعم بصيغة جيمسا 20 في المائة. تم تحليل بيانات البحث باستخدام طريقة واحدة ANOVA (أ = 0.05). تم اختبار نتائج التحليل المؤثر بعد ذلك وفقاً لمعامل التنوع الناتج. دلت نتيجة البحث أن مستخرج القهوة الخضراء رابوستا (*Coffea canephora*) يتأثر على نشاط نسبة البلعمة (PF) وقدرة البلعمة (KF) الضامة البريتونية من الفرنان (*Mus musculus*) في المختبر. إن إعطاء مستخرج القهوة الخضراء رابوستا بتركيز المعالجة الثانية (50 ميكروغرام / مل) هو العلاج الأمثل في ترقية نشاط نسبة البلعمة (PF) وقدرة البلعمة (KF) الضامة البريتونية يبلغ 61.70 ± 4.738 في المائة و 188 ± 12.124 لاتيكنس.

ABSTRACT

Habibi, 2020. Immunomodulatory Effects of Robusta Green Coffee Extract on Peritoneal Macrophage Phagocytosis Activity of Mice in Vitro. Thesis. Department of Biology, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Biology Advisor: Kholifah Holil, M.Si; Religion Advisor: Mujahidin Ahmad, M.Sc.

Keywords: *immunomodulators, phagocytic activity, peritoneal macrophages, robusta green coffee*

Robusta green coffee (*Coffea canephora*) is known to contain antioxidant and anti-inflammatory compounds that are higher than black coffee. The phenolic content of chlorogenic acid, caffeine, and flavonoids in robusta green coffee has potential as an immunomodulator. The purpose of this research was to determine the immunomodulatory effect of robusta green coffee extract (*Coffea canephora*) on the phagocytosis activity of peritoneal macrophages of mice (*Mus musculus*) in vitro. This research used a completely randomized design (CRD) with five treatments and five replications. Macrophage cells were isolated from the peritoneal cavity of male mice (*Mus musculus*) and cultured in RPMI medium 10% FBS for 1x24 hours with 5% CO₂ and 37⁰C then treated. The treatments used were K + (product X-immunomodulator), robusta green coffee extract with various concentrations namely P0 (0 µg / ml), P1 (25 µg / ml), P2 (50 µg / ml), and P3 (75 µg / ml) which were given in some culture medium was then incubated in a 5% CO₂ incubator at 37⁰C for 6 hours. The variable used was the phagocytosis activity of macrophages including two parameters, namely the percentage of phagocytosis (PF) and the capacity of phagocytosis (KF). Macrophage phagocytosis activity can be seen with a 20% Giemsa stain. The research data were analyzed using one-way ANOVA ($\alpha = 0.05$). The results of the influential analysis were then further tested according to the resulting coefficient of diversity (KK). The results showed that robusta green coffee extract (*Coffea canephora*) affected the PF and KF activity of peritoneal macrophages of mice (*Mus musculus*) in vitro. The administration of robusta green coffee extract with a concentration of P2 (50 µg / ml) was the most effective treatment in increasing the activity of PF and KF of peritoneal macrophages, namely $61.70 \pm 4.738\%$ and $188 \pm 12,124$ latex/ml.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara terbesar ke-4 dalam produksi kopi dunia setelah Brazil, Vietnam dan Colombia. Hal tersebut dilihat dari luas areal perkebunan di Indonesia dan nilai ekspor kopi dari Indonesia (Hartono, 2013). Nilai ekspor biji kopi dari Indonesia kurang lebih 0,353 juta ton (ICO, 2014) dari produksi kopi dunia yang mencapai 9,2 juta ton. Hal tersebut juga didukung dengan luas areal perkebunan kopi di Indonesia yang mencapai 12 juta ha yang tersebar di beberapa wilayah di Indonesia (AEKI, 2015; Martauli 2018). Oleh karena itu, produksi kopi di Indonesia telah menjadi salah satu komoditas yang diperhitungkan dalam penguat devisa negara (Kusmiati & Reni, 2011; Ramadhani, 2018).

Tanaman kopi yang dibudidayakan di Indonesia sebagian besar adalah jenis kopi robusta (*Coffea canephora*). Saat ini terdapat dua jenis kopi robusta yang dipasarkan, yaitu *green coffee* dan *black coffee*. Kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) diketahui mengandung senyawa antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan kopi hitam (Isnandar dkk., 2017). Kopi hitam mengalami proses *roasting* yang membuat perubahan komposisi kimia dan aktivitas bioaktif kopi (Raharjo, 2012). Beberapa penelitian terkait skrining pada ekstrak kopi hijau dengan pelarut aquades menunjukkan bahwa, kopi hijau robusta memiliki kandungan fenolik asam klorogenat, kafein dan flavonoid lebih tinggi dibandingkan yang terkandung dalam kopi hitam dan kopi hijau dengan pelarut lain (Nohta dkk., 2016; Affonso dkk., 2016; aldelafi, 2018).

Hampir 83 % dari total senyawa bioaktif dalam kopi hijau robusta adalah senyawa polifenol dengan kadar asam klorogenat tertinggi sebesar 14,4% (Farah, 2006; Sentkowska dkk., 2016) dan kadar kafein pada kopi hijau robusta berkisar 2,38% (Bicho, 2013). Selain fenolik asam klorogenat dan juga kafein, kopi hijau robusta memiliki kandungan senyawa bioaktif lain seperti flavonoid, sterol (stigmasterol, sitosterol), diterpen, diterpen pentasiklik (methyl kafestol, kafestol dan kahweol), tripterpen ester dan alkohol serta seramid (Isnindar, 2017).

Penelitian sebelumnya membuktikan komponen kimia di dalam kopi seperti flavonoid, fenolik asam klorogenat, kafein memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamasi yang tinggi (Siva *et al.* 2016), serta banyak dimanfaatkan dalam terapi kesehatan (Priftis *et al.* 2015; Jeszka-Skowron *et al.* 2016).

Allah *Subhanahu wa Ta'ala* menciptakan tanaman kopi sebagai salah satu tumbuhan yang memiliki banyak manfaat diantara tumbuh-tumbuhan yang lain. Tumbuh yang tersebar di Bumi merupakan bentuk kasih sayang Allah SWT kepada manusia, sekaligus sebagai tanda-tanda kuasa-Nya. Oleh karena itu, manusia diperintahkan untuk memperhatikan dan mengamati serta meneliti tumbuh-tumbuhan. Sebagaimana firman Allah *Subhanahu wa Ta'ala* Surat Asy-Syu'ara (26) ayat 7 yaitu:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝٧

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan terhadap bumi, berapakah banyaknya kami tumbuhkan di dalamnya (bumi itu) berbagai macam **tumbuh-tumbuhan yang baik**?” (Q.S. Asy-Syu'ara (26): 7).

Berdasarkan ayat diatas kata “يَرَوْا” berarti “memperhatikan” memiliki makna apakah manusia tidak memikirkan bahwa Allah telah menciptakan “Bumi” dan “Berapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu” dengan berbagai tanda-tanda kekuasaan-Nya (Shihab, 2009). Tanda kekuasaan Allah *Subhanahu wa Ta'ala* beserta anugerah-Nya, tercantum di dalam kata “زَوْجٍ كَرِيمٍ” yang berarti ditumbuhkannya “tumbuh-tumbuhan yang baik”. Menurut Qurthubi (2009) dalam tafsirnya, kata “كَرِيمٍ” artinya baik dan mulia, berasal dari kata *al karam* dalam bahasa Arab adalah *al fadhl* yaitu keutamaan, serta *kariimun* yang artinya mulia dan unggul.

Berdasarkan penjelasan tersebut Allah SWT menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang dapat diambil manfaatnya oleh manusia. Oleh karena itu, dalam ayat ini manusia diperintahkan Allah *Subhanahu wa Ta'ala* untuk memperhatikan serta memikirkan pada ciptaan-Nya, salah satunya adalah tumbuh-tumbuhan, sehingga apabila manusia memikirkan kepada tanda kekuasaan Allah,

hal tersebut dapat dijadikan media pembelajaran mendekatkan diri kepada Allah *Subhanahu wa Ta'ala* dan meningkatkan keimanan dan ketaqwaan kepada-Nya.

Memperhatikan kuasa Allah *Subhanahu wa Ta'ala* yang ada di bumi tidak hanya sekedar melihat ataupun memikirkan saja. Namun, salah satunya dengan melakukan suatu penelitian. Penelitian yang dapat dilakukan yaitu mengeksplorasi potensi kandungan bioaktif pada tumbuh-tumbuhan. Menurut Amirghofran, (2012); Wang *et al.*, (2018) dalam beberapa tahun terakhir, senyawa bioaktif dari tumbuhan-tumbuhan yang ditemukan, terbukti secara ilmiah memiliki potensi imunomodulator yang dapat digunakan secara luas dalam pengobatan gangguan imunologis. Namun dalam praktiknya, belum ditemukan cukup bukti-bukti yang kemudian digunakan dalam praktik klinis (Kumar *et al.*, 2011), Oleh karena itu eksplorasi kandungan senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai imunomodulator menjadi penelitian yang bernilai tinggi di masa kini dan mendatang.

Kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) dalam penelitian sebelumnya diketahui memiliki kandungan asam klorogenat yang memiliki khasiat pengobatan gangguan imunologis (Liang dan David, 2015). Asam klorogenat dalam kopi robusta (*Coffea canephora*), masuk dalam senyawa turunan polifenol yang memiliki manfaat sebagai antiinflamasi (Shin *et al.*, 2014; Naveed *et al.*, 2018). Mekanisme asam klorogenat sebagai agen antiinflamasi berkaitan erat dengan produksi mediator inflamasi yang dihasilkan oleh aktivitas makrofag. Berdasarkan hasil uji asam klorogenat pada sel-sel makrofag RAW264.7 yang distimulasi rangsangan inflamasi menunjukkan, bahwa asam klorogenat dapat menurunkan produksi sitokin proinflamasi berupa *tumor necrosis factor* (TNF- α), interferon (IFN- γ) dan interleukin (IL-1 β , IL-6) (Chen & Wu, 2014; Hwang *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2017).

Penekanan produksi pada sitokin proinflamasi berupa TNF- α dan IFN- γ akan berefek pada aktivitas fagositosis makrofag (Cheng *et al.*, 2019). Hal tersebut dikarenakan dua jenis sitokin tersebut berperan penting dalam mediator respon imun bawaan yang dapat mengaktivasi fagositosis makrofag (Baratawijaja, 2010). TNF (*Tumor Necrosis Factor*) merupakan mediator utama pada respon inflamasi akut yang dapat merangsang makrofag untuk memproduksi IL-1 dan IL-6. Sedangkan IFN- γ memiliki fungsi poten sebagai aktivator fagosit mononuklear

seperti makrofag. IFN- γ menginduksi sintesis enzim yang berfungsi dalam *respiratory burst* secara langsung, sehingga sel makrofag teraktivasi untuk menghilangkan partikel asing dengan mekanisme fagositosis (Kresno, 2010). Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini efek imunomodulator ekstrak kopi hijau robusta diuji pada aktivitas fagositosis.

Menurut Ponshe dan Indap (2002), penelitian uji aktivitas fagositosis makrofag merupakan salah satu metode uji yang cukup banyak dilakukan untuk mengetahui respon imunologis dari senyawa bioaktif yang memiliki daya imunomodulator. Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Asti (2015), pemberian ekstrak biji kopi robusta pada konsentrasi 25% dan 50% secara *in vivo* meningkatkan aktivitas fagositosis terhadap antigen lateks. Sedangkan pada konsentrasi 100% menunjukkan penurunan aktivitas fagositosis. Hal tersebut dikarenakan terlalu tingginya konsentrasi, menyebabkan rusaknya keutuhan membran sel atau viabilitas sel, sehingga terjadi lisis dan aktivitas fagositosis menurun.

Akan tetapi pada penelitian tersebut, ekstrak kopi robusta didapat dari kopi yang sudah dipanggang serta menggunakan pelarut etanol 96%. Hal tersebut dapat mengakibatkan komponen utama fenolik asam klorogenat berkurang, serta etanol memiliki sifat toksik pada sel kultur (Farah, 2012; Farhaty dan Muchtaridi, 2016), sehingga akan berpengaruh terhadap khasiat imunologis dan aktivitas sel. Oleh karena itu, penelitian ini merupakan skrining awal pada ekstrak aquades dari kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) yang sebelumnya telah diketahui memiliki kandungan imunomodulator lebih tinggi kemudian diuji menggunakan metode aktivitas fagositosis makrofag.

Penelitian uji aktivitas fagositosis makrofag peritoneal menggunakan ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) secara *in vitro* masih sangat terbatas, sehingga konsentrasi perlakuan pada penelitian ini mengacu pada penelitian lain yang setara dengan metode yang sama. Penelitian oleh Arifah (2014) menunjukkan bahwa, kandungan bioaktif ekstrak pasak bumi (*Eurycoma logifolia*) berpengaruh terhadap aktivitas fagositosis makrofag peritoneal pada konsentrasi 10-100 $\mu\text{g/ml}$. Akan tetapi, peningkatan kadar 100 $\mu\text{g/ml}$ dapat

menurunkan pengaruh aktivitas fagositosis makrofag, disebabkan sifat sitotoksik ekstrak lebih dominan dari pada sifat immunomodulator.

Penelitian lain oleh Shan dkk., (2009) dan Hwang (2014), menunjukkan bahwa kandungan kafein dan asam klorogenat pada kopi dengan kadar 20 µg/mL dan 37,5 µg/mL secara signifikan efektif mempengaruhi aktivitas fagositosis makrofag dan produksi sitokin proinflamasi. Namun, pada penelitian tersebut menggunakan LPS sebagai rangsangan inflamasi dalam setiap perlakuan pada sel makrofag (RAW 264,7). Sedangkan pada penelitian ini, ekstrak kopi hijau robusta diuji pada sel makrofag peritoneal yang diinduksi dengan partikel lateks sebagai model antigen asing, sehingga dapat mengamati aktivitas fagositosis makrofag. Oleh karena itu, konsentrasi ekstrak yang akan digunakan pada penelitian ini adalah 0 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL dan 75 µg/mL.

Terbatasnya laporan penelitian uji aktivitas fagositosis makrofag peritoneal menggunakan ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) secara *in vitro* menjadi salah satu alasan untuk melakukan eksplorasi lebih lanjut untuk mengetahui khasiat immunomodulator kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap aktivitas fagositosis makrofag. Pada Penelitian ini, ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) akan diuji secara *in-vitro* pada sel makrofag yang diisolasi dari jaringan peritoneal mencit (*Mus musculus*) Balb/C yang berumur 6 sampai 8 minggu.

Parameter aktivitas fagositosis yang diamati dalam penelitian ini adalah persentase fagositosis (PF) dan kapasitas fagositosis (KF). Parameter PF dilakukan untuk menunjukkan gambaran aktivasi fungsi (peningkatan aktivitas) sel makrofag untuk memfagositosis partikel asing, sedangkan KF dilakukan untuk melihat kemampuan maksimal makrofag untuk memfagositosis partikel asing (Rosnizar, 2017). Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek immunomodulator ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap aktivitas fagositosis makrofag peritoneal *Mus musculus* secara *in vitro*.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah:

1. Apakah ada pengaruh ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap persentase fagositosis makrofag peritoneal mencit secara *in vitro*?
2. Apakah ada pengaruh ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap kapasitas fagositosis (KF) makrofag peritoneal mencit secara *in vitro*?

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap persentase fagositosis makrofag peritoneal mencit secara *in vitro*.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap kapasitas fagositosis makrofag peritoneal mencit secara *in vitro*.

1.4. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini meliputi:

1. Ada pengaruh pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap persentase fagositosis (PF) makrofag peritoneal mencit secara *in vitro*.
2. Ada pengaruh pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap persentase fagositosis (PF) makrofag peritoneal mencit secara *in vitro*.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini sebagai berikut:

1. Secara teoritis penelitian ini dapat dijadikan sebagai sumber informasi mengenai efek imunomodulator ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap aktivitas fagositosis sel makrofag.

2. Secara aplikatif penelitian ini diharapkan memberi informasi dalam bidang kesehatan khususnya pada gangguan imunologis mengenai pengobatan alternatif dengan menggunakan kopi hijau robusta (*Coffea canephora*).

1.6. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. Varietas biji kopi hijau yang digunakan adalah Robusta (*Coffea canephora* Pierre var. *Rabusta*), didapat dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao (PUSLIT KAKAO) di Jember Jawa Timur.
2. Isolat sel makrofag yang digunakan adalah sel makrofag yang dikultur dari cairan rongga peritoneal mencit Balb/c (*Mus musculus*) berumur 6 sampai 8 minggu.
3. Media kultur sel makrofag peritoneal yang digunakan adalah media RPMI 1640 (*with L-Glutamine without glucose and sodium bicarbonate*).
4. Perlakuan pada penelitian ini meliputi; perlakuan kontrol positif dan empat perlakuan ekstrak biji kopi hijau robusta dengan varian konsentrasi: 0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml dan 75 µg/ml.
5. Produk obat imunomodulator yang digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini adalah jenis obat yang mengandung ekstrak meniran yang telah diuji dan dipatenkan sebagai imunomodulator alami.
6. Pengamatan pada penelitian ini hanya dibatasi pada jumlah makrofag peritoneal atau persentase fagositosis (PF) dan kapasitas fagositosis (KF) makrofag.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kopi dalam Prespektif Islam

Al-Quran merupakan firman Allah *Subhanahu wa ta'ala* yang di dalamnya terdapat dorongan untuk bersikap ilmiah secara konsisten. Al-Qur'an dalam surat Al-Alaq: 1-5 memerintahkan manusia untuk membaca, menulis, mengamati, meneliti, mengobservasi, dan menyikapi kebenaran yang tertulis dalam ayat-ayat kauniyah (Kurniawan dkk, 2008). Oleh karena itu, kaum muslim sepanjang zaman dituntut untuk berijtihad, mengamati dan meneliti alam semesta dengan segala seluk-beluk fenomena yang kompleks, kemudian memanfaatkan akal pikiran dan semua indra untuk menafsirkan ayat Al-Qur'an tentang fenomena kauniyah tersebut (ITB, 2010). Salah satu fenomena kauniyah yang dapat menjadi objek penelitian adalah tumbuhan-tumbuhan yang Allah *Subhanahu wa ta'ala* ciptakan di Bumi ini.

Allah *Subhanahu wa ta'ala* telah menciptakan macam tumbuh-tumbuhan di Bumi ini agar dapat diambil manfaatnya oleh manusia. Tumbuh-tumbuhan merupakan rahmat Tuhan sekaligus sebagai tanda-tanda kuasa-Nya yang diberikan kepada manusia, yang apabila mengamati dan menelitinya dapat meningkatkan iman dan taqwa kepada-Nya. Sebagaimana firman Allah *Subhanahu wa Ta'ala* dalam Al-Qur'an Surat Al An'aam (6) ayat 99.

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنْ
الَّتِخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُشْتَبِهٍ أَنْظَرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا
أَفْتَمَرَ وَيَتَّعِيهِ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ۝

Artinya: “Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan, maka Kami keluarkan dari tumbuhan-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan tidak serupa. Perhatikan buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan

pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman” (Q.S. Al An’aam: 99).

Ayat ini menjelaskan kepada manusia agar selalu memperhatikan sekelilingnya yang merupakan bukti-bukti Maha Kuasa Allah SWT sebagai pencipta langit Bumi dan seisinya (Shihab, 2009). Ayat ini memang tidak secara langsung menyebutkan kata morfologi tumbuhan, namun cukup menjelaskan beberapa karakter yang dimiliki tumbuhan. Menurut Abdullah (2013) dalam tafsir Ibnu Katsir kata “خضرا” berarti “*menghijau*” yang menunjukkan tanaman-tanaman dan pepohonan yang hijau, kemudian Kami ciptakan biji-bijian dan buah-buahan. Menurut Mahalli dan Suyuti (2010) dalam tafsirnya kata “حبا مترابا” yang artinya “*biji-bijian yang tersusun*” maksudnya menyebutkan jenis tumbuhan yang memiliki biji dan buah-buah yang bersusun antara satu dan yang lainnya, menggerombol seperti bulir gandum dan sejenisnya. Salah satunya adalah kopi, Allah *Subhanahu wa Ta’ala* menciptakan tanaman kopi yang tergolong dalam tumbuhan *ever green*, memiliki daun yang berwarna hijau serta biji dan buahnya tumbuh menggerombol pada tangkainya.

Tanaman kopi merupakan sumber dari minuman kopi yang populer dan dikenal dunia dari masa-kemasa. Sejarah ke-Islaman dunia juga sangatlah dekat dengan kopi. Minuman kopi disebut dengan “*Qohwa*” dan tanamannya disebut dengan “*bun*” oleh bangsa Yaman pada masa kerajaan Islam di Ethiopia (Haq, 2015). Menurut sejarah, *Qohwah* diminum oleh para sufi karena memiliki esensi untuk mendekatkan diri kepada Allah *Subhanahu wa Ta’ala* dengan khasiat mencegah rasa kantuk disaat beribadah di malam hari. Selain itu, qohwa juga memiliki khasiat yang baik untuk kesehatan.

Hal ini ditulis dalam Tarikh Ibnu Tomyibi bahwa “*Kopi adalah penghilang kesusahan pemuda, senikmat-nikmat keinginan bagi engkau yang sedang mencari ilmu. Kopi adalah minuman yang dekat kepada Allah di dalamnya ada kesembuhan bagi pencari hikmah diantara manusia*” (Al-Qodir, 1558 dalam Zaimche, 2004). Dari kutipan kalimat tersebut, menjelaskan bahwa sejarah ke-Islaman di dunia juga mengenal kopi yang memiliki manfaat dalam menjaga semangat beribadah kepada Allah *Subhanahu wa Ta’ala* dan khasiat untuk menjaga kesehatan.

2.2. Kopi Robusta (*Coffea canephora*)

Kopi (*Coffea* sp) merupakan tanaman yang tumbuh secara alami di hutan Afrika, termasuk pulau Madagaskar. Tanaman kopi kemudian dibudidayakan di daerah tropis seperti Indonesia dan pulau-pulau lain di Hindia Belanda, Hindia Barat, India, Arab serta pulau-pulau Pasifik seperti Meksiko, Amerika Tengah dan Amerika Selatan. Sampai dengan saat ini, tanaman kopi terus dibudidayakan di seluruh belahan dunia termasuk Indonesia karena memiliki nilai ekonomis yang tinggi serta dijadikan minuman berenergi dengan cita rasa yang khas (Preedy, 2014).

Tanaman kopi tersebar di Indonesia sudah sejak abad ke-17 Masehi sebagai wilayah jajahan Belanda. Penyebaran kopi di Indonesia berpusat di Pulau Jawa di tahun 1700 tahun. Setelah penanaman kopi di Pulau Jawa berhasil, penyebaran dilakukan di Pulau Sumatera dan Sulawesi (Siregar, 2008). Jenis kopi yang pertama kali dibudidayakan di Indonesia adalah kopi jenis arabika. Akan tetapi, kopi arabika sangat rentan terhadap serangan penyakit, kemudian pemerintah Belanda mendatangkan jenis kopi baru yaitu kopi robusta yang lebih tahan terhadap serangan penyakit karat daun dan memiliki produksi lebih baik dibandingkan kopi jenis lain. Oleh karena itu kopi robusta menjadi kopi komoditas yang diunggulkan dan dibudidayakan di Indonesia (Panggabean, 2011; Prastowo dkk., 2012; Anshori, 2014).

2.2.1. Sistematika Tanaman

Tanaman kopi dikenal secara ilmiah sebagai tanaman yang masuk dalam subdivisi Angiospermae, yang berarti tanaman kopi bereproduksi menggunakan biji yang tertutup oleh daging buah. Tanaman kopi masuk dalam famili *Rubiaceae* yang memiliki sekitar 500 genus dan lebih dari 6000 spesies. Kopi termasuk dalam genus *Coffea*, sejauh ini merupakan anggota paling penting dari famili *Rubiaceae* (Ukers, 2012; Preedy, 2014). Berdasarkan data NCBI di Amerika Serikat oleh Davis *et al.*, (2007) menyebutkan, lebih dari 90 spesies tanaman masuk dalam genus *Coffea*, 25 di antaranya telah dipelajari lebih luas. Dari 25

spesies ini, hanya tiga yang memiliki kepentingan komersial yaitu *Coffea canephora*, *Coffea arabica*, dan *Coffea liberica* (Murthy, 2012).

Klasifikasi dari tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) berdasarkan *Integrated Taxonomic Information System (ITIS)* (2009) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i> (tumbuhan)
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i> (berpembuluh)
Divisio	: <i>Spermatophyta</i> (tumbuhan berbiji)
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i> (Biji ditutupi oleh ovulum)
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i> (memiliki dua kotiledon)
Subkelas	: <i>Sympetalae</i> atau <i>Metachlamydeae</i>
Ordo	: <i>Rubiales</i>
Famili	: <i>Rubiaceae</i>
Genus	: <i>Coffea</i>
Spesies	: <i>Coffea canephora</i> – (kopi robusta)

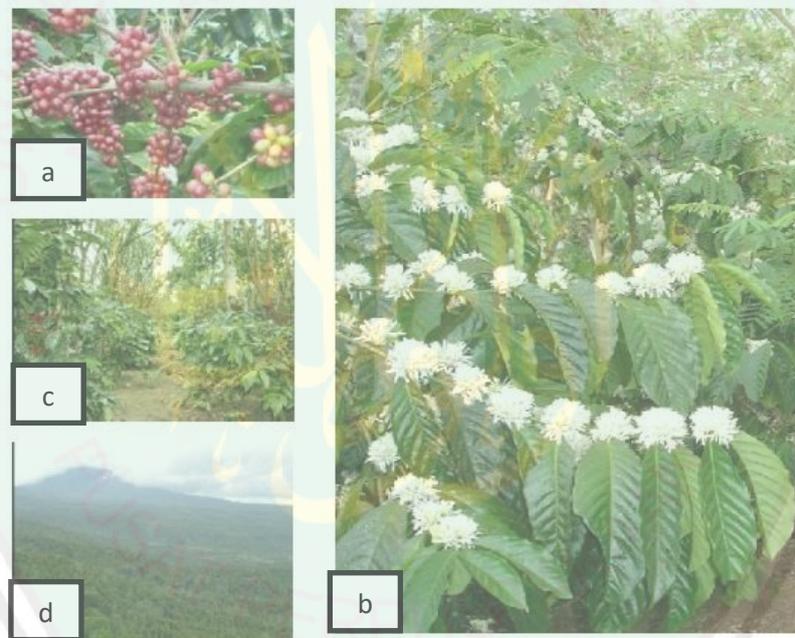
2.2.2. Morfologi Tanaman

Kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki karakteristik morfologi yang khas sehingga dapat dibedakan dengan kopi jenis arabika yang sudah lebih dahulu dibudidayakan. Ciri khas morfologi yang dimiliki oleh kopi robusta yaitu memiliki tajuk yang lebar dengan perawakan pohon dapat tumbuh mencapai ketinggian 10 meter, berdaun lebar dan besar dibandingkan daun kopi arabika. Kopi robusta merupakan tumbuhan dikotil, sehingga memiliki perakaran tunggang. Akar kopi robusta berada lebih dipermukaan dibandingkan akar kopi arabika yang lebih ke dalam, sehingga kopi robusta memerlukan tanaman pelindung untuk mengurangi transpirasi. Daun kopi robusta tumbuh berhadapan pada batang, cabang dan rating dengan bentuk pangkal daun tumpul (Najiyatih dkk., 2012; Ramadiana dkk., 2018).

Bunga tanaman kopi robusta (*Coffea canephora*) berwarna putih yang muncul pada cabang reproduksi atau tangkai utama di ketiak daun. Bentuk ujung mahkota bunga kopi robusta rata-rata memiliki ujung berbentuk *acute*, sedangkan pada pangkal bunga saling berhimpit dan beberapa mahkota menggulung

(Anshori, 2014). Biji kopi robusta juga memiliki perbedaan dengan biji kopi arabika. Secara umum, kopi robusta memiliki biji yang lebih bulat dengan rendemen yang lebih jelas dibandingkan dengan biji kopi arabika. Lengkungan biji kopi robusta lebih tebal dengan garis tengah dari atas ke bawah hampir rata, morfologi tanaman kopi dapat dilihat dalam gambar 2.1.

Bagian dalam dari buah kopi robusta apabila dilihat dari penampang melintang terdiri dari lapisan kulit luar, daging buah, lapisan kulit tanduk, kulit ari dan biji. Buah kopi robusta yang mentah berwarna hijau muda, setelah itu berubah menjadi hijau tua, lalu kuning. Buah kopi yang matang berwarna merah atau merah tua. Lapisan paling luar disebut kulit luar buah (eksokarp), lapisan daging buah (mesokarp), lapisan kulit tanduk (endocarp) dan biji yang masih dibungkus lagi dengan kulit ari (Pangabeian, 2011).



Gambar 2.1 Karakteristik a. Buah, b. Daun dan bunga, c,d. Habitat dari tanaman kopi robusta (Prsatowo dkk., 2010).

Kopi robusta adalah tanaman yang hidup dengan baik di iklim Indonesia, tumbuh baik pada ketinggian di atas 600 sampai 700 mdpL dengan temperatur rata-rata yang diperlukan berkisar 20° – 24°C (Indrawando dkk., 2010). Selain itu, kopi robusta memerlukan curah hujan yang cukup selama tiga bulan masa kering.

Masa kering dibutuhkan untuk pembentukkan bunga serta penyerbukkan (Anshori, 2014). Kopi robusta memiliki produksi lebih tinggi daripada kopi arabika dan liberika. Rata-rata 9-3 ku kopi beras/ha/thn, dan apabila dikelola secara intensif dapat memproduksi 20 ku/ha/thn (Agestin, 2019).

2.2.3. Kandungan Fitokimia

Kopi umumnya mengandung senyawa bioaktif berupa fenol, kafein, flavonoid, alkaloid, saponin dan trigonelin. Selain senyawa bioaktif kopi juga memiliki kandungan air, polisakarida, protein, lipid dan mineral (Yowanda, 2015). Kandungan yang terdapat pada kopi bervariasi sesuai dengan jenis kopi, daerah asal, metode analisis dan pelarut yang digunakan (Preedy, 2010; Handoyo, 2012).

Kopi hijau (*green coffee*) merupakan olahan dari biji kopi yang belum melewati proses pemanggangan. Kopi hijau memiliki rasa yang lebih pahit serta memiliki lebih banyak kandungan fitokimia dibandingkan dengan kopi yang sudah dipanggang (Handoyo, 2017). Hal ini disebabkan karena proses pemanggangan dapat mengubah kandungan fitokimia khususnya pada senyawa fenolik menjadi senyawa volatil dan melanoidin sebagai perasa kopi (Panggabean, 2011). Kopi hijau menjadi salah satu produk dari olahan biji kopi yang berkhasiat bagi kesehatan, karena menjadi sumber senyawa bioaktif yang kaya akan antioksidan (Preedy, 2014).

Hasil penelitian oleh Babova (2016), diketahui bahwa kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) merupakan jenis kopi dengan komponen fitokimia utama berupa fenolik asam klorogenat (5-CQA) dan kafein dari golongan alkaloid. Hal tersebut juga dikuatkan berdasarkan hasil NMR terdapat 16 senyawa utama yang larut dalam air dari biji kopi hijau yang diidentifikasi dari ekstrak biji kopi hijau berupa: asam klorogenat (5-CQA), asam asetat, kafein, kolin, asam sitrat, asam 1-glutamat, 1-alanin, 1-asparagin, asam kuinat, asam malat, mionositol, sukrosa dan trigonelin (Belay, 2011; Preedy, 2010).

Selain fenolik asam klorogenat (5-CGA) dan juga kafein, kopi hijau robusta memiliki kandungan senyawa bioaktif lain seperti seramid, sterol (stigmasterol, sitosterol), diterpen, diterpen pentasiklik (methyl kafestol, kafestol

dan kahweol), alkohol diterpen, tripteren ester yang larut dalam air (Isnindar *et al.*, 2017). Saponin, terpenoid, triterpenoid dan tanin yang larut dalam alkohol (Almaeda, 2015; Romadhano dkk., 2014).

1. Asam Klorogenat

Asam Klorogenat (ACG) adalah salah satu polifenol yang paling melimpah pada biji kopi hijau dengan sifat larut dalam air (Cliffort MN, 1999). ACG terbentuk antara asam trans-kinetinat dengan asam kuintat tertentu, paling sering adalah caffeic, p-coumaric, dan ferulic. Asam klorogenik yang paling melimpah dalam biji kopi hijau adalah isomer asam caffeoylquinic: asam 5 - caffeoylquinic yang saat ini dikenal dengan 5-CQA sesuai pedoman IUPAC (Naveed dkk., 2018). Struktur asam klorogenat representatif dalam biji kopi hijau ditunjukkan pada gambar 2.2.

Asam klorogenat merupakan salah satu senyawa polifenol yang melimpah dalam biji kopi hijau, total kandungan asam klorogenat dalam kopi robusta sebesar 7,1-14,4% lebih tinggi dibandingkan dengan kopi arabika dari 4-8,4% (Farah dkk., 2006; Naidu dkk., 2008). Asam klorogenat telah terbukti memiliki sifat aktivitas antioksidan yang mensuplai hingga 3.66 mg/ml, sifat antiinflamasi, antipiretik, dan antineoplastik dari ekstrak biji kopi hijau (Preedy, 2014; Isnindar, 2017).

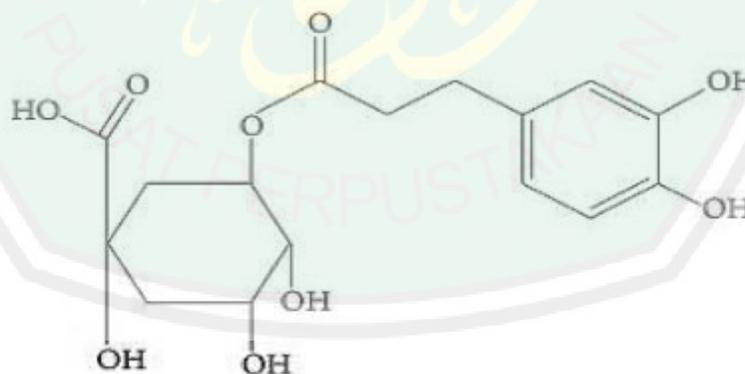


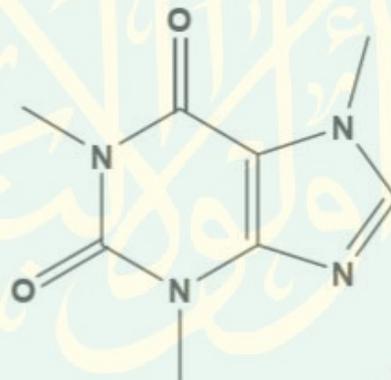
Fig. 1. The chemical structure of chlorogenic acid (CGA).

Gambar 2.2 Struktur kimia asam klorogenat (5-ACG) (Belay, 2011).

2. Kafein

Kafein atau 1,3,7-trimetilxantin adalah senyawa bioaktif terbanyak dalam kopi hijau robusta setelah asam klorogenat. Kafein merupakan alkaloid dari golongan xantin, memiliki efek sangat penting karena berhubungan dengan sifat fisiologis kopi dan menentukan karakter rasa pahit (Hastuti, 2018). Rumus kimia untuk kafein ditunjukkan pada gambar 2.3.

Kandungan kafein dari biji kopi hijau bervariasi sesuai dengan spesies. Kopi robusta mengandung sekitar 2,2– 2,8% kafein, dan arabika sekitar 0,6– 1,2% (Mumin *et al.*, 2006; Belay *et al.*, 2011). Secangkir minuman kopi biasa mengandung 70 - 140 mg kafein, tergantung pada sediaan, campuran, dan ukuran cangkir. Kafein larut dalam air, tetapi juga cukup hidrofobik, sehingga kafein dengan mudah melewati membran biologis melalui proses difusi pasif. Dengan demikian, kafein cepat dan sepenuhnya diserap dari saluran pencernaan (Preedy, 2010).



Gambar 2.3 Struktur kimia kafein (Preedy, 2010).

2.2.4. Manfaat dan Efek Samping

Kopi merupakan minuman yang telah banyak dikenal dan banyak dikonsumsi di dunia, dipuji karena aroma dan rasanya. Namun, kopi juga diketahui memiliki manfaat kesehatan yang potensial. Hal ini terbukti oleh banyaknya penelitian yang menguji khasiat dari kopi dalam bidang kesehatan, antara lain: kopi memiliki pengaruh terhadap penurunan dan perbaikan resiko penyakit kardiovaskuler (Jiang-an, 2006; Mostofsky, 2008), dapat menurunkan

resiko diabetes melitus tipe 2 (Loopstra, 2011; Wedick, 2011); menurunkan resiko kanker dan sirosis hati (Klasky, 2006); kopi dapat memperbaiki sistem neurotransmitter saraf serta daya ingat (Maia, 2002; Kopperlstatte, 2005); kopi juga memiliki efek pada sistem imunitas tubuh dan menurunkan efek infeksi (Ciptaningsih, 2012; Asti, 2015).

Potensi manfaat kesehatan yang dimiliki oleh kopi disebabkan karena kandungan fitokimia yang menunjukkan efek biologis. Senyawa Asam klorogenat serta kafein adalah senyawa yang berkontribusi besar terhadap efek yang menguntungkan setelah konsumsi kopi. Asam klorogenat adalah polifenol paling banyak dalam kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) dan memiliki fungsi sebagai antioksidan yang potensial. Studi epidemiologis menunjukkan bahwa asam klorogenat memiliki sifat antioksidan, antimutagenik, antikarsinogenik, antibiotik, antihiperkolesterolemia, antihipertensi dan antiinflamasi (Isnindar, 2017).

2.2.4.1 Asam Klorogenat Sebagai Antiinflamasi

Sehubungan dengan efek antiinflamasi atau imunologis, terdapat beberapa laporan tentang efek kopi pada fungsi imunologis. Asam klorogenat dilaporkan menghambat produksi histamin oleh sel mast yang distimulasi oleh imunoglobulin (Ig) E. Disisi lain, beberapa laporan menunjukkan bahwa konsumsi kopi berkaitan dengan kepekaan alergi (Habeda dkk., 2011). Penelitian lain yang dilakukan oleh Liang dan David (2015), telah terbukti memodulasi sistem imun secara *in-vitro*. Schulze *et al* (2014), juga melaporkan bahwa asupan kopi berbanding terbalik dengan sitokin inflamasi. Beberapa penelitian secara *in-vivo* dan *in-vitro* telah membuktikan bahwa, kandungan CGA yang diekstrak dari kopi memiliki aktivitas antiinflamasi yang signifikan (Liang dan Kitts, 2015).

Mekanisme asam klorogenat sebagai agen antiinflamasi berkaitan erat dengan produksi mediator inflamasi yang dihasilkan oleh aktivitas makrofag. Berdasarkan hasil perlakuan uji asam klorogenat pada sel-sel makrofag RAW264.7 yang distimulasi lipopolisakarida (LPS) sebagai rangsangan inflamasi, menunjukkan CGA dapat menurunkan produksi sitokin proinflamasi berupa interleukin (IL-1 β , IL-6) TNF- α dan IFN- γ (Chen & Wu, 2014; Hwang *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2017). Penurunan sitokin proinflamasi disebabkan senyawa

ACG memiliki sifat antioksidan yang dapat menghambat ekspresi COX-2 dan iNOS pada makrofag RAW264.7 melalui penurunan aktivitas jalur NF- κ B dan JNK/ AP-1 (Shan, J *et al.*, 2009). Oleh karena itu, efek antiinflamasi dari senyawa CGA telah dideskripsikan meregulasi mediator inflamasi yang dapat berpengaruh pada aktivitas fagositosis makrofag.

2.2.4.2 Kafein Sebagai Antioksidan

Kafein adalah salah satu fitokimia yang ditemukan dalam tanaman kopi yang dikenal memiliki karakteristik biologis serta memiliki beragam respon farmakologi (Hwang dkk., 2016). Kafein adalah alkaloid xanthine kristal putih yang diekstrak dari biji tanaman kopi yang berfungsi sebagai antioksidan, sehingga dapat menangkal efek kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas (Naidu dkk., 2008). Kerusakan akibat radikal bebas dapat menurunkan sistem kekebalan tubuh. Oleh karena itu, senyawa kafein dapat melindungi imunitas tubuh dari kerusakan sel yang berujung terjadinya inflamasi (Weinberg dkk., 2002). Penelitian oleh Ramanaviciene dkk., (2003), menyatakan bahwa senyawa kafein terbukti meningkatkan sistem imunitas tubuh untuk melawan agen infeksi dengan meningkatkan aktivitas lisozim. Hal ini juga dibuktikan oleh Asti (2015), membuktikan bahwa ekstrak kopi robusta (*Coffea canephora*) memiliki pengaruh dalam meningkatkan aktivitas fagositosis sel monosit yang diuji secara *in-vitro*.

Mekanisme senyawa kafein sebagai antioksidan sehingga dapat mempengaruhi sistem imun tubuh berkaitan erat dengan penurunan sitokin inflamasi yang dihasilkan oleh makrofag. Berdasarkan penelitian oleh Hwang dkk (2016), kafein memberikan efek antiinflamasi pada peradangan yang diinduksi lipopolisakarida (LPS) baik dalam keadaan *in vitro* dan *in vivo* pada sel makrofag (RAW264,7). Kafein menurunkan mediator inflamasi yang diinduksi LPS. Kafein juga mengurangi ekspresi gen pro-inflamasi, termasuk yang diinduksi *nitric oxide synthase* (iNOS) dan *cyclooxygenase-2* (COX-2) sehingga menurunkan produksi interleukin (IL)-3, IL-6 dan IL-12 yang disekresi oleh sel makrofag (RAW264.7). Hal tersebut disebabkan karena kafein menghambat translokasi *nuclear factor* κ B (NF- κ B) melalui fosforilasi I κ B α . Oleh karena itu kafein menunjukkan efek

antioksidan dengan menekan respon inflamasi yang diinduksi LPS dalam sel makrofag (RAW264.7) dengan mengatur aktivasi NF- κ B.

2.3. Imunomodulator

Imunomodulator adalah suatu agen yang dapat memiliki kemampuan memperbaiki dan mengembalikan fungsi sistem imun tubuh yang terganggu serta dapat menurunkan respon imun tubuh karena fungsi imun yang berlebih (Handayani, 2010), dan mampu merangsang sel-sel leukosit terutama makrofag untuk membentuk system kekebalan tubuh yang normal (Mahadi *et al.*, 2018). Imunomodulator secara umum memicu perubahan respon imun yang melibatkan induksi, ekspresi, amplifikasi atau penghambatan fase yang terjadi pada respon imun (Mohan *et al.*, 2019).

Dunia kesehatan mengklasifikasikan senyawa imunomodulator ke dalam tiga kategori berikut: imunorestorator, imunostimulator dan immunosupresan (Bratawidjaja, 2010). Senyawa yang bersifat imunomodulator memiliki peran yang sangat diperlukan oleh sistem kekebalan tubuh untuk mempertahankan tubuh agar terhindar dari patogen. Oleh karena itu, mekanisme sistem kekebalan tubuh yang oleh Allah *Subhanahu wa Ta'ala* ciptakan perlu dijaga karena merupakan nikmat yang telah diberikan-Nya kepada makhluknya.

Tubuh makhluk hidup khususnya manusia telah diciptakan Allah *Subhanahu wa Ta'ala* dengan sempurna. Allah *Subhanahu wa Ta'ala* telah menciptakan di dalam tubuh manusia yaitu sistem pertahanan yang menjaga tubuh dari penyakit disebut dengan sistem imun. Adanya sistem imun di dalam tubuh menjadi anugrah yang besar dan menunjukkan kasih sayang dari Allah *Subhanahu wa Ta'ala* kepada manusia. Sistem imun di dalam tubuh bekerja memusnahkan patogen secara sistematis dan rapi. Hal tersebut menunjukkan Kuasa Allah *Subhanahu wa Ta'ala* di dalam tubuh manusia, karena tidaklah mungkin semua sistem yang bekerja dengan rapi dalam tubuh bergerak dengan sendirinya, tidak lain bahwa Allah *Subhanahu wa Ta'ala* adalah Zat yang memiliki kuasa yang besar atas Bergeraknya sistem imun di dalam tubuh. Oleh karena itu, mempelajari sistem imun dapat menjadi jalan untuk meningkatkan

keimanan dan ketaqwaan kepada Allah *Subhanahu wa Ta'ala* Yang Maha Pencipta.

Al-Qur'an telah menjelaskan bahwa di dalam tubuh terdapat tanda-tanda kekuasaan Allah *Subhanahu wa Ta'ala* yang perlu diperhatikan. Allah *Subhanahu wa ta'la* berfirman di dalam Q.S Ad-Dzariyat ayat 20-21:

وَفِي الْأَرْضِ آيَاتٌ لِّلْمُؤْمِنِينَ ۚ وَفِي أَنفُسِكُمْ أَفَلَا تُبْصِرُونَ ۝

Artinya: “Dan di Bumi itu terdapat tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yakin, dan (juga) **pada dirimu sendiri**. Maka apakah kalian tidak memperhatikan?” (Q.S Ad-Dzariyat: 20-21).

Pada ayat ini Allah *Subhanahu wa Ta'ala* menyampaikan, bahwa tanda-tanda kekuasaan-Nya ada di Bumi dan di dalam diri manusia bagi orang-orang meyaqini. Bukti-bukti kebesaran Allah yang terdapat di Bumi antara lain sistem kerja bumi dan keseimbangan yang terdapat di dalamnya, disamping itu kejadiannya terjadi secara berulang-ulang, teratur dan konsisten. Bukti-bukti kekuasaan Allah *Subhanahu wa Ta'ala* yang terdapat pada diri manusia dapat dilihat pada mekanisme kerja di dalam tubuh manusia yang sangat unik, serta pada organ-organ tubuh yang demikian serasi tetapi kompleks serta pada sistem kerjanya yang demikian rumit (Shihab, 2009). Salah satu sistem kerja di dalam tubuh manusia yang rumit adalah sistem imun yang berfungsi sebagai pertahanan agar tubuh terjaga dari serangan penyakit.

Sistem imun dalam tubuh memiliki dua macam respon yang mungkin akan terjadi apabila terpapar oleh zat yang dianggap asing. Respon imun adalah serangkaian proses yang saling berkaitan dan diatur oleh suatu sistem yang saling menunjang. Respon imun bekerja sangat kompleks dan teratur dalam setiap lini yang melibatkan interaksi sejumlah jenis sel, produk sel, jaringan dan organ yang berbeda. Respon imun sering terjadi di organ-organ limfoid primer dan sekunder, terutama terdapat di tempat-tempat yang terpapar langsung ke luar, seperti mukosa, paru-paru, usus dan kulit. Respon imun diketahui terbagi menjadi dua

macam yaitu; respon imun bawaan (nonspesifik) dan respon imun didapat (spesifik) (Bratawidjaja, 2010; Kresno, 2010).

2.3.1. Respon Imun Bawaan

Respon imun bawaan (nonspesifik) merupakan sistem imun tubuh terdepan dalam menghadapi serangan mikroba secara langsung (Campbell dan Reece, 2010). Respon imun bawaan muncul akibat paparan antigen setelah infeksi, walaupun sebelumnya tubuh belum pernah terpapar oleh antigen tersebut (Kresno, 2010). Respon imun bawaan juga disebut dengan respon imun alami, hal ini disebabkan karena komponen imunitas bawaan terbentuk sejak seseorang dilahirkan dan akan selalu hadir dalam waktu yang singkat untuk melindungi tubuh dari serangan patogen (Coico dan Geoffrey, 2015).

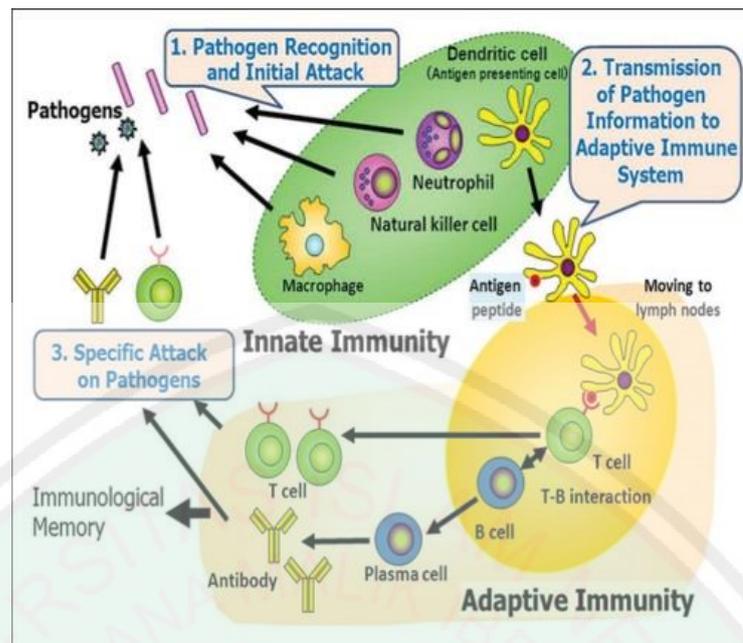
Komponen respon imun bawaan (nonspesifik) menjadi sistem imun sejak seseorang dilahirkan. Komponen tersebut meliputi; pertahanan permukaan tubuh dan komponen internal, seperti kulit, selaput lendir dan refleks batuk yang menjadi penghalang efektif terhadap agen lingkungan; pertahanan oleh komponen kimia, seperti pH dan asam lemak yang disekresikan dan efektif terhadap invasi oleh banyak mikroorganisme (Coico dan Geoffrey, 2015); dan komponen non-seluler lain dari sistem imun bawaan adalah sistem komplemen yang menghasilkan serangkaian reaksi biokimia berurutan sehingga menyebabkan lisisnya mikroba patogen (Campbell dan Reece, 2010).

Sejumlah komponen lain juga merupakan imunitas bawaan seperti: respon inflamasi, interferon, zat lain yang dilepaskan oleh leukosit, protein serum (β -lysin, enzim lisozim, poliamin, dan kinin) dan molekul pengenal atau reseptor yang dapat berikatan dengan berbagai mikroorganisme. misalnya, *Toll Like Receptore* (TLR). Semua komponen ini mempengaruhi patogen secara langsung atau meningkatkan efektivitas reaksi inang terhadap patogen. Komponen internal lain dari imunitas bawaan adalah sel-sel fagosit seperti granulosit, makrofag, sel *Natural Killer* (NK) dan sel mikroglia pada sistem saraf pusat. Sel-sel fagosit berpartisipasi dalam penghancuran bahan asing yang telah menembus pertahanan fisik dan kimia dengan cara fagositosis (Kresno, 2010; Coico dan Geoffrey, 2015).

2.3.2. Respon Imun Didapat

Respon imun didapat (spesifik) merupakan respon yang memiliki kemampuan mengenali benda asing yang berbeda-beda. Terbentuknya respon ini, diawali oleh aktivitas makrofag atau *antigen presenting cell* (APC) lain yang memproses antigen yang masuk ke tubuh kemudian akan menimbulkan interaksi dengan sel-sel imun didapat. Rangsangan antigen oleh APC mengakibatkan terjadinya proliferasi dan berdiferensiasi oleh sel-sel imun didapat, sehingga sel-sel imun memiliki kemampuan spesifik melawan antigen tersebut (Kresno, 2010).

Respon imun didapat terdiri atas respon imun humoral, respon imun seluler dan interaksi antara respon imun humoral dan respon imun seluler (Kresno, 2010). Pada imunitas humoral diperankan oleh sel limfosit B dan produknya, yakni antibodi. Respon ini diawali dengan sel limfosit B yang dirangsang oleh benda asing akan berproliferasi, berdiferensiasi dan berkembang menjadi sel plasma yang akan menghasilkan antibodi spesifik untuk menghilangkan mikroba ekstraseluler, virus dan bakteri. Sedangkan pada imunitas seluler, sel limfosit T memproduksi berbagai jenis limfokin termasuk interferon yang akan mengaktifkan makrofag sebagai efektor untuk melakukan fagositosis kepada mikroba patogen atau makrofag akan mengaktifkan CTC/Tc (sel T-sitostoksik) sebagai efektor yang menghancurkan sel terinfeksi (Bratawidjaja, 2010; Coico, 215). Berikut adalah gambar 2.4 hubungan antara respon imun spesifik dengan aktivitas fagositosis makrofag (respon imun non spesifik).



Gambar 2.4 Gambaran umum respon imun bawaan (non-spesifik) dan respon imun didapat (spesifik) (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

2.3.3. Faktor-Faktor Mempengaruhi Respon Imun

Banyak faktor yang memainkan peran penting dalam sistem imun sehingga terjadi perubahan efektivitas sistem imun, antara lain (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

1. Usia

Proses penuaan dapat melemahkan sistem imun tubuh dan membuat individu tersebut menjadi lebih rentan terhadap gangguan kekebalan tubuh dari patogen. Seringkali presentase kerentanan terhadap infeksi patogen pada usia lanjut lebih tinggi daripada kelompok usia muda. Hal tersebut terjadi karena penuaan berakibat pada penurunan efektivitas respon imun bawaan dan juga respon imun didapat.

2. Jenis kelamin

Jenis kelamin menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi kerentanan seseorang terhadap suatu penyakit. Dibandingkan dengan perempuan, laki-laki memiliki prevelensi yang lebih tinggi dalam hal penyakit menular. Hal ini disebabkan karena perempuan mampu meningkatkan respon imun yang lebih besar serta dapat menghilangkan infeksi lebih cepat. Dibuktikan juga dengan resiko

kematian karena kanker, diketahui bahwa laki-laki memiliki risiko 1,6 kali lebih tinggi dibandingkan perempuan.

3. Variabilitas Genetik

Variabilitas genetik diantara individu memainkan peran penting dalam pembentukan variasi respon imun tubuh yang muncul untuk melawan patogen.

4. Stres

Stres atau tekanan psikologis mengakibatkan penekanan pada sistem imun tubuh, sehingga terjadi penurunan respon imun tubuh yang berdampak pada peningkatan penularan penyakit resiko terinfeksi oleh patogen. Pada individu dengan stres kronis menunjukkan peningkatan angka infeksi. Hal tersebut karena stres kronis mengakibatkan total jumlah sel T yang beredar dalam tubuh berkurang hingga 20% di bawah nilai kontrol rata-rata, serta rasio CD4 dan rasio CD8 dapat berkurang sebanyak 40% serta aktivitas sel NK menurun sebesar 10-25% di bawah nilai rata-rata.

5. Penyalah Gunaan Obat dan Konsumsi Alkohol

Penyalah gunaan narkoba dan konsumsi alkohol dapat secara langsung menekan berbagai respon imun tubuh. Penggunaan obat terlarang dan konsumsi alkohol akan merusak sel limfosit T, limfosit B, sel NK, monosit dan makrofag yang berdampak pada perubahan respon imu untuk memproduksi sitokin. Hal tersebut menyebabkan penurunan pada respon imun bawaan dan didapat serta respon imun humoral dan seluler. Konsumsi alkohol serta narkoba juga dapat meningkatkan kerusakan jaringan tubuh akibat kegagalan dalam mengenal antigen secara selektif yang berakibat hilangnya *self-tolerance* sehingga sistem imun melawan sel sendiri.

6. Malnutrisi

Nutrisi berperan sangat penting dalam pembentukan dan pemeliharaan sistem imun tubuh yang optimal. Malnutrisi seperti protein dan kalori atau defisiensi mikronutrien akibat pola makan dan diet, mengakibatkan defensif tubuh, menurunkan jumlah leukosit dalam tubuh, serta menurunkan produksi protein-protein sistem imun tubuh yang sangat penting untuk respon imun bawaan dan respon imun didapat. Kekurangan gizi mikro tertentu seperti zat besi, yodium, vitamin A dan seng (Zn) menyebabkan efek yang buruk pada efektivitas fungsi imun tubuh untuk melawan patogen.

7. Polutan Lingkungan

Paparan polusi dari lingkungan memiliki dampak yang buruk dan merusak fungsi imun tubuh. Paparan jangka pendek oleh polutan dari lingkungan mempengaruhi kesehatan saluran pernapasan yang mengakibatkan infeksi saluran pernapasan atas dan asma. Bahan-bahan yang bersifat polutan lingkungan berdampak pada sistem imun disebut xenobiotik seperti herbisida, insektisida, fungisida dan bahan-bahan kimia yang dihasilkan industri seperti lateks, styren, timbal dan merkuri. Bahan-bahan tersebut dapat merusak hormon endogen dan mempengaruhi sistem endokrin, reproduksi serta sistem imun tubuh.

8. Gaya Hidup tidak Sehat

Gaya hidup yang tidak sehat memiliki dampak besar terhadap penurunan sistem kekebalan tubuh. konsumsi makanan yang tidak sehat serta olahraga yang tidak lagi aktif dilakukan, beresiko terhadap efektivitas fungsi kekebalan tubuh yang diakibatkan penurunan sistem imun tubuh untuk melawan patogen.

2.3.4. Macam-Macam Imunomodulator

Perkembangan penelitian Imunomodulator selama tiga dekade terakhir mendapatkan perhatian lebih oleh dunia, karena peran yang sangat diperlukan untuk mempertahankan sistem imun tubuh dari patogen. Banyak polisakarida, protein, asam amino, dan senyawa dari tumbuh-tumbuhan telah menunjukkan kemampuan yang signifikan untuk mengatur respons imun termasuk interferon- γ (IFN- γ) dan steroid (Mohan, 2019). Imunomodulator menjadi agen terapi pendukung berupa kemoterapi konvensional yang mengaktifkan mekanisme pertahanan tubuh inang, sehingga dapat membantu mempertahankan kondisi tubuh yang bebas dari penyakit pada orang normal atau tidak sehat seperti hepersensitifitas, autoimun yang berujung inflamasi (Amirghofran, 2012; Mohan, 2019). Zat-zat ini, yang dapat meningkatkan, menekan dan memodulasi sistem imun meliputi respon imun didapat dan sistem bawaan. Oleh karena itu, Imunomodulator dapat diklasifikasikan ke dalam tiga kategori berikut (Bratawidjaja, 2010; Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

2.3.4.1. Imunorestorator

Imunorestorator adalah agen imunofarmakologi yang dapat mengembalikan fungsi respon imun tubuh yang bergantung pada cara pemberian berbagai komponen dari sistem imun. Komponen imunorestorator seperti *Immune Serum Globulin (SIG)*, *Hyperimmune Serum Globulin (HSG)*, plasma, plasmaferesis, leukoferesis, transplantasi sumsum tulang, hati dan timus merupakan komponen yang berasal dari komponen imun yang sebelumnya sudah ada di dalam tubuh, namun pada orang yang memiliki kerusakan pada komponen tersebut, memerlukan injeksi dari luar agar fungsi imun tubuh yang terganggu dapat kembali dengan baik (Bratawidjaja, 2010).

1. ISG dan HSG

Imunoglobulin (Ig) seperti HSG dan ISG mampu diberikan efek sebagai imunorestorator pada penderita defisiensi respon imun humoral primer dan sekunder. Defisiensi ini terjadi apabila tubuh kehilangan Ig dengan jumlah yang banyak, misalnya pada kejadian luka bakar, dermatitis eksfoliatif dan sindrom nefrotik. Pemberian ISG dan HSG dapat membentuk kompleks imun dengan IgA, kompleks tersebut dapat mengaktifkan komplemen melalui jalur klasik atau jalur alternatif. Antibodi dapat terbentuk oleh β -lipoprotein yang berada dalam ISG (Bratawidjaja, 2010).

2. Plasma

Pemberian plasma melalui infus pada seorang dengan defisiensi fungsi imun sudah dilakukan sejak tahun 1960 untuk memperbaiki sistem imun. Infus plasma dapat memberikan komponen-komponen imun seperti imunoglobulin dalam jumlah besar, sehingga fungsi imun tetap terjaga. Pemberian infus plasma dapat memiliki efek samping penularan virus dan reaksi anafilaksis (Bratawidjaja, 2010).

Plasmaferesis merupakan terapi pemisahan darah berdasarkan komponen leukosit, eritrosit dan plasma darah yang dilakukan diluar tubuh. Plasma yang sudah dipisahkan akan diganti dengan isi plasma yang mengandung sedikit antibodi kemudian dimasukkan lagi ke dalam pembuluh darah. Penggunaan plasmaferesis disebabkan plasma mengandung banyak antibodi yang dapat

merusak jaringan atau sel. Hal tersebut dapat terjadi pada *miastenia gravis* dan Sindrom Goodpasture (Bratawidjaja, 2010).

3. Leukoferesis

Leukoferesis adalah terapi pemisahan komponen sel darah putih (leukosit) yang dilakukan diluar tubuh dan akan dimasukkan kembali ke dalam tubuh. Pemisahan leukosit secara selektif dilakukan sebagai usaha terapi penderita *arthritis reumatoid* (AR) (Hardayani, 2010).

2.3.4.2. Imunostimulator

Imunostimulator adalah suatu senyawa yang memiliki efek meningkatkan daya tahan tubuh terhadap infeksi, alergi, autoimun dan kanker. Imunostimulator berpengaruh terhadap respon imunitas bawaan dan juga adaptif, sehingga dapat meningkatkan level dasar respon imun pada individu dengan defisiensi imun primer dan sekunder (Venkatalakshmi *et al.*, 2016). Imunostimulator disebut juga dengan imunopotensiasi (Hardayani, 2010). Pada individu yang sehat, imunostimulator diharapkan berfungsi sebagai agen profilaksis dan promotor, yaitu, sebagai imunopotensiator, dengan meningkatkan tingkat dasar respons imun (Sethi dan Singh, 2015). Bahan-bahan yang dapat menjadi imunostimulator dapat bersumber dari: bahan biologis, bahan asal bakteri, bahan asal jamur dan bahan sintetik (Hardayani, 2010).

a. Bahan Biologis

1. Hormon timus

Timus memproduksi beberapa hormon yang berfungsi sebagai maturasi sel limfosit T serta modulasi sel limfosit T yang sudah matang. Terdapat 4 jenis hormon timus, yaitu timolin, timosin- α , timopoietin dan faktor humoral timus. Hormon-hormon tersebut ditemukan dalam darah dan kadarnya menurun pada berbagai penyakit, gangguan fungsi imun pada usia lanjut, kanker, autoimunitas dan penurunan sistem imun akibat pengobatan (Handarsula, 2011). Terapi hormon-hormon timus tersebut jelas menunjukkan peningkatan jumlah, fungsi dan reseptor sel T serta beberapa mekanisme yang terjadi pada respon seluler (Bratawidjaja, 2010).

2. Limfokin

Limfokin disebut juga interleukin (IL) merupakan sitokin yang diproduksi oleh limfosit yang aktif. Contohnya adalah MAF, MGF, IL-2, CSf dan IFN. Limfokin memiliki fungsi meningkatkan respon imunitas seluler, induksi enzim tertentu, peningkatan fagositosis oleh makrofag, aktivasi limfosit, eosinofil, trombositopenia dan pelepasan macam-macam sitokin lain serta meningkatkan deferensiasi myeloid. Limfokin digunakan sebagai terapi pada penderita AIDS usia lanjut dan autoimunitas (Bratawidjaja, 2010; Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

3. Antibodi monoklonal

Antibodi monoklonal didapat dari gabungan dua sel yaitu sel pembentuk antibodi dan sel yang dapat hidup terus menerus, sehingga antibodi dalam tubuh dapat dihasilkan dalam jumlah yang besar. Antibodi secara *in vivo* di dalam tubuh manusia dan tikus memiliki fungsi dapat mengikat komplemen dan membunuh sel tumor (Bratawidjaja, 2010).

4. *Transfer Factor*/ Ekstrak Leukosit

Transfer Factor (TF) dan ekstrak leukosit telah digunakan sebagai imunoterapi. TF dan ekstrak leukosit memperlihatkan fungsi sebagai imunostimulator yang spesifik yang dapat menjadi solusi penyakit seperti candidiasis kronik, koksidiomikosis, lepra dan tuberkulosis (Bratawidjaja, 2010).

5. *Lymphokin Activated Killer* (LAK) *cell*

Lymphokin Activated Killer (LAK) *cell* merupakan sel limfosit T-sitotoksik yang dihasilkan secara *in vitro* dengan proses penambahan IL-2 ke dalam sel seseorang yang kemudian di masukkan kemabali. Terapi ini dapat meningkatkan respon imun seluler dan humoral. Digunakan sebagai imunoterapi terhadap keganasan (Bratawidjaja, 2010).

b. Bahan asal bakteri

Mikroorganisme seperti halnya bakteri memiliki fungsi yang dapat mengaktifkan dan meningkatkan respon imun tubuh untuk melawan patogen. Beberapa bahan seperti *Bacillus Calmette Guerin* (BCG), *Corynebacterium parvum*, klebsiela dan brusela, *Bordetela pertusis* serta endotoksin adalah bahan-bahan yang telah diketahui memiliki aktivitas tersebut. BCG, Klebsiella dan Brucella diketahui dapat memperbaiki respon imun spesifik dan nonspesifik seperti dengan memproduksi limfokin serta mengaktifkan sel *natural killer* (NK).

Corynebacterium parvum sebagai imunostimulator pada respon imun non-spesifik. *Bordetella pertusis* dapat menghasilkan *lymphocytosis promoting factor* (LPF) merupakan mitogen untuk sel T dan menjadi imunostimulator, sedangkan pada endotoksin dapat mengaktifkan sel makrofag dan merangsang proliferasi limfosit B dan limfosit T.

c. Bahan asal jamur

Bahan asal jamur misal letin, kresin, glukukan dan schizophyllan diketahui dapat meningkatkan respon imun bawaan. Kresin dan lentinan dapat meningkatkan fungsi aktivitas makrofag. Bahan lain yaitu *muramil dipeptida* (MDP) adalah komponen aktif pada dinding sel micobakterium yang berefek baik pada peningkatan respon imun didapat (seluler dan humoral) pada pemberian oral. Bahan asal jamur digunakan sebagai pengobatan kanker, HIV dan kerusakan hati (Bratawidjaja, 2010).

d. Bahan sintetik

1. Levamisol

Levamisol merupakan derivat dari tetramizon yaitu Fenil imodotiazol yang dapat mengembalikan fungsi imunitas tubuh yang tertekan. Bahan ini meningkatkan proliferasi dan sitotoksitas sel limfosit T dan menjadi imunostimulator respon imun nonspesifik. Levamisol digunakan pada beberapa penderita kanker stadium C karena dapat berefek peningkatan antigen, limfokin, mitogen, dan faktor kemotaktik yang merangsang sel-sel limfosit, sel granulosit serta sel makrofag. Levamisol juga telah dijadikan obat penanggulangan penyakit artritis reumatoid dan virus (Bratawidjaja, 2010; Venkatalakshmi *et al.*, 2016). Penggunaan levamisol memiliki efek samping seperti mual, muntah, urtikaria dan agranulositosis (Hendarsula, 2011).

2. Isoprinosin

Isoprinosin atau inosiplex (ISO) atau metisoprinol merupakan agen imunostimulator dari bahan sintesis yang memiliki sifat antivirus. Isoprinosin dapat meningkatkan proliferasi dan toksitas dari sel limfosit T, membantu produksi IL-2 yang berperan dalam diferensiasi limfosit, makrofag dan meningkatkan fungsi sel NK (Handarsula, 2011). Isoprinosin juga dapat menambah produksi sitokin seperti IL-1, IL-2 dan IFN γ , sehingga meningkatkan

proliferasi limfosit sebagai respons terhadap rangsangan mitogenik atau antigenik. Efek samping yang biasa ditemukan adalah peningkatan kadar asam urat (Bratawidjaja, 2010; Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

3. Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang dapat menghambat oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas. Reaksi antioksidan yaitu dengan mentransfer elektron atau hidrogen dari satu bahan yang dapat mengoksidasi. Antioksidan memiliki berat molekul yang sangat kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, sehingga kerusakan sel terhambat (Bratawidjaja, 2010; Aher, *et al.*, 2011).

Antioksidan dapat berfungsi sebagai modulator kekebalan tubuh dan dapat digunakan bersama dengan terapi utama pada gangguan imunologis. Dalam Tubuh setiap sel telah memiliki mekanisme perlindungan yang memadai terhadap setiap efek berbahaya dari radikal bebas: SOD, glutathione peroksidase, glutathione reductase thioredoxin, ikatan tiol dan disulfida adalah sistem penyangga di setiap sel. Antioksidan non-enzimatik lainnya termasuk karotenoid, flavonoid dan polifenol terkait, asam α -lipoat dan glutathione, vitamin C dan E (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

4. Arginin

Arginin adalah salah satu asam amino yang diperlukan untuk mempertahankan keseimbangan nitrogen dan menunjukkan fungsi imunostimulator. Pemberian arginin pada hewan coba dapat meningkatkan volume timus, jumlah limfosit dan meningkatkan respon mitogenik limfosit terhadap mitogen dan antigen. Arginin juga dapat meningkatkan sintesis IL-2 sehingga dapat merangsang aktivitas fagositosis dan respon imun seluler, serta melindungi involusi timus akibat trauma dan gangguan fungsi sel T. Arginin adalah esensial untuk timosin, timopentin dan berbagai sel dan molekul pada sistem imun (Bratawidjaja, 2010).

5. *Biologic Response Modifier* (BRM)

Biologic Response Modifier (BRM) adalah kelas obat baru yang digunakan untuk mengobati gangguan imunologis seperti artritis idiopatik dan radang usus. Beberapa agen BRM memiliki efek terhadap sitokin proinflamasi seperti BMR abatacept atau orenicia (nama jual) dapat mengikat ke CD80 dan CD86 pada sel penyaji antigen, sehingga menghambat produksi TNF- α , IL-2 dan interferon- γ . BMR seperti certolizomab, etanercept, golimumab, infliximab dan adalimumab memiliki mekanisme berlawanan dengan TNF. Beberapa BMP juga dikenal sebagai penghambat sitokin, molekul yang dapat meningkatkan sistem imun, produksi sitokin, IFN, CSF, TNF, GF, limfotoksin MAF dan faktor kemotaktik. Terapi dengan BRM ini untuk merangsang pemulihan kemampuan sistem imun tubuh dalam menyingkirkan penyakit dan infeksi (Bratawidjaja, 2010; Le-Saux, *et al.*, 2012).

2.3.4.3. **Imunosupresan**

Imunosupresan adalah agen penekan respon imun yang digunakan untuk mengendalikan imunitas tubuh pada penyakit autoimun, penolakan organ dan jaringan transplantasi dan menekan reaksi hipersensitifitas (Venkatalakshmi *et al.*, 2016). Sejumlah obat herbal telah terbukti bermanfaat pada aktivitas biologi termasuk imunosupresan. Imunosupresan menggunakan produk herbal dapat memberikan alternatif kemoterapi konvensional, karena beberapa obat imunosupresan kimia telah menunjukkan berbagai efek samping, dan ada peningkatan kebutuhan untuk menemukan obat baru dengan efek samping yang lebih sedikit (Hardayani, 2010).

1. Glukokortikosteroid (GKS)

Glukokortikosteroid adalah molekul lipofilik yang ditemukan dalam darah yang diikat oleh globulin dan albumin. GKS seperti methylprednesolone dapat dijumpai dengan mudah dan dijual bebas. GKS menembus membran sel dengan efek antiinflamasi yang luas, produksi pengerahan aktivasi dan fungsi sel efektor. GKS juga dapat menghambat ekspresi gen dari sel limfosit yang menyandi beberapa jenis interleukin dan TNF- γ . Produksi sitokin yang berkurang akan menekan proliferasi sel T. GKS juga menekan imunitas humoral, sel B yang

mengekspresikan sedikit IL-2 dan reseptor IL-2, sehingga akan menurunkan klon sel B dan sintesis antibodi (Bratawidjaja, 2010).

Terapi pengobatan menggunakan GKS umum digunakan untuk penyakit autoimun, psoriasis, polimiositis, beberapa penyakit reumatik, hepatitis aktif, dan inflammatory bowel disease, penolakan transplantasi akut, penyakit graft-versus-host dalam transplantasi sumsum tulang, rheumatoid dan artritis lainnya, *systemic lupus erythematosus*, dermatomiositis sistemik, dan kondisi kulit lainnya, asma dan gangguan alergi lainnya seperti penyakit radang usus (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

2. Sirolimus

Sirolimus atau disebut rapamisin merupakan mikrolida yang dihasilkan dari isolasi *streptomyces hygroscopicus*. Obat ini memiliki efek untuk mencegah proliferasi sel T dan menghambat sinyal transduksi melalui IL-2 dan sitokin lain. Sirolimus hanya mencegah sel-sel yang sudah aktif, sel produksi Ig, degranulasi eosinofil. Sirolimus mengikat reseptor intraseluler yang sama dan mencegah diferensiasi sel B menjadi sel plasma, sehingga menurunkan produksi IgM, IgG dan IgA (Bratawidjaja, 2010).

3. Obat Sitostatik

Sitostatik adalah obat yang digunakan untuk kemoterapi sebagai pengobatan kanker. Sitostatik meliputi Cyclophosphamide atau Cytoxan dan chlorabucil dengan efek mengaktifkan agen-agen imunologis dan sebagai agen sitotoksik (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

4. Antibodi monoklonal dan poliklonal

Antibodi merupakan bahan biologi yang dapat digunakan sebagai immunosupresan dalam pencegahan dan penolakan akut pada penyakit limfoproliferasi (AL). Antibodi monoklonal diproduksi oleh sel limfosit B tunggal terhadap satu epitop spesifik serta menghambat interaksi antara limfosit T dan B dan sel APC sebagai immunosupresan biologis dalam penanganan berbagai penyakit. Sedangkan pada antibodi poliklonal dapat berpengaruh terhadap respon imun yang melibatkan aktivitas sel B multipel, sehingga dihasilkan sejumlah antibodi dengan spesifitas yang berbeda. Terapi antibodi monoklonal dan

poliklonal yaitu pada transplantasi organ dengan menekan respon imun tubuh melalui sel B (Bratawidjaja, 2010).

2.3.5. Imunomodulator dari Tumbuhan

Tumbuhan merupakan sumber dari fitokimia yang memiliki banyak potensi bioaktif salah satunya adalah potensi sebagai imunomodulator. Lebih dari 4000 senyawa fitokimia yang ditemukan saat ini dan telah dikelompokkan berdasarkan fungsi sebagai senyawa imunomodulator. Kelompok fitokimia dari golongan Polisakarida, terpenoid, fenolik dan alkaloid merupakan kelompok yang mendominasi memiliki potensi aktivitas imunomodulator (Venkatalakshmi *et al.*, 2016). Berikut adalah fitokimia dengan aktivitas imunomodulator:

2.3.5.1. Fitokimia yang Memiliki Efek Imunostimulator

1. Alkaloid

Alkaloid merupakan fitokimia yang paling efisien dan signifikan dijadikan terapi respon imun. alkaloid menunjukkan aktivitas fisiologis yang nyata ketika diberikan kepada hewan. Fitokimia ini memiliki aktivitas antitumor (vinblastine dan vincristine), antimikroba (cepharanthine), aktivitas analgesik (morfin) dan juga dikenal untuk meningkatkan respon imun (imunostimulator) (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

Alkaloid merupakan senyawa yang dapat menjadi agen imunostimulator pada sel-sel imun dalam sumsum tulang, dan produksi antibodi serta total WBC (Sunila dkk., 2004). Alkaloid berefek secara signifikan dalam produksi sitokin TNF- α dan IFN-plasma serta bereaksi dengan nitrit oksidan (NO). Produksi sitokin oleh alkaloid diakibatkan karena efek antiinflamasi yang dimediasi oleh jalur NF- κ B. produksi sitokin oleh alkaloid berefek pada penurunan aktivitas makrofag dan sel limfosit (Xue Y dkk., 2008). Oleh karena itu, alkaloid merupakan imunomodulator yang dapat memberikan rangsangan peningkatan respon imun seluler (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

2. Polisakaridan dan Glikosid

Polisakaridan dan glikosid menunjukkan sifat imunoterapeutik yang bermanfaat sebagai stimulasi respon imun dalam tubuh untuk menghalau patogen.

Efek polisakaridan memodulasi imunitas bawaan pada aktivitas makrofag (Venkatalakshmi *et al.*, 2016). Pada Glikosid yang merupakan sub kelompok dari gula dan aglycan (non-gula) memiliki efek aktivitas antimikroba dan stimulasi sistem kekebalan tubuh (Akbay, 2003). Beberapa senyawa seperti Isorhamnetin-3-O-glucoside (*Urtica dioica*), Eupalitin-3-O- β -D-galactopiranosida (*Boerhaavia diffusa*), Aucubin (sebagian besar tumbuhan) dan Mangiferin (*Mangifera indica*) menunjukkan sifat imunomodulator yang efektif (Schepetkit dkk., 2006).

Aktivitas imunomodulator dari senyawa glikosid dan polisakarida yaitu potensi imunomodulator secara *in vitro* dengan menghambat stimulasi proliferasi sel mononuklear dalam darah, serta menghambat penurunan IL-2 dan TNF- α . Senyawa glikosid meningkatkan proliferasi dan sekresi limfosit serta IFN- γ dan meningkatkan produksi IgG1 dan IgG2b. Hal tersebut sangat berpengaruh terhadap aktivitas sel-sel limfosit dan sel mononuklear seperti makrofag (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

3. Antosianin

Antosianin merupakan fitokimia yang mampu mengatur respon imun didalam tubuh. Antosianin dapat meningkatkan produksi sitokin dan menjadi agen antiinflamasi. Antosianin seperti Cyanida-3-glycoside dan Peonidin pada tanaman *Blackberry* telah terbukti memiliki kemampuan imunomodulator. Antosianin sebagai antioksidan menangkal radikal bebas yang merusak fungsi sel imun, sehingga sel imun meningkatkan produksi sitokin dan mengatur komponen lain dalam respon imun tubuh. Oleh karena itu aktivitas antioksidan dapat digunakan sebagai antiinflamasi (Rechner dkk., 2005; Wang dkk., 2008).

4. Flavonoid

Flavonoid merupakan fitokimia yang paling melimpah pada tanaman. flavonoid seperti kafein, centaurein, quersetin apigenin dan luteolin telah terbukti memiliki kemampuan sebagai imunomodulator. Hal ini disebabkan karena flavonoid memiliki efek antioksidan tinggi yang larut dalam air dan mencegah kerusakn sel dengan menghambat reaksi oksidasi akibat infeksi (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

Flavonoid menghambat enzim lipooksidase yang berperan dalam biositesis prostaglandin. Flavonoid mampu mengaktifkan IL-12 sehingga

meningkatkan proliferasi sel limfosit dan merangsang aktivitas sel Th1. Sel Th 1 yang teraktifasi, mengekspresikan IFN- γ , sehingga dapat memperkuat aktivitas fagositosis makrofag dengan memproduksi *nitrit oksidan* (NO) yang efektif untuk melawan patogen. Oleh karena itu, flavonoid merupakan imunostimulator yang dapat memberikan rangsangan intra seluler yaitu pada makrofag dan sel T, sehingga bekerja lebih efisien (Abror dkk., 2018).

5. Terpenoid

Terpenoid adalah fitokimia yang juga memiliki kemampuan dalam memediasi sistem imunologis tubuh. Efek terpenoid pada sistem imun tubuh adalah meningkatkan produksi antibodi serta dapat menekan respon sel limfosit T, sehingga dapat meningkatkan respon imun seluler dalam membunuh patogen. Selain itu, Terpenoid dapat meningkatkan ekspresi IL-2 dan menghambat reaksi *nitrit oksidan* (NO), sehingga terpenoid dapat memstimulasi sel fagosit intraseluler yaitu makrofag selama infeksi bakteri. Terpenoid juga secara signifikan dapat menghambat degradasi pada sel mast yang berfungsi menjaga pertahanan tubuh pada mekanisme peradangan (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

6. Sterol

Sterol adalah fitokimia yang diketahui memiliki kemampuan dalam menjaga keseimbangan sistem imun tubuh sehingga tubuh terhindar dari patogen. Senyawa ini meningkatkan kemampuan sitotoksik sel NK pada sel target, serta dapat mengembalikan keseimbangan respon imun tubuh dengan mengembalikan fungsi sel Th dan meningkatkan proliferasi limfosit. Sterol pada *Withanolid* (*withania somnifera*) juga telah terbukti mengaktifasi respon imun bawaan yaitu meningkatkan daya fagositosis makrofag dan aktivitas enzim lisosomal untuk melawan infeksi bakteri (Bouic dkk., 1996; Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

2.3.5.2. Fitokimia yang Memiliki Efek Imunosupresor

1. Fenolik

Fenolik adalah fitokimia dengan cincin aromatik dan mengandung satu atau lebih ikatan hidroksil. Fenolik yang umumnya terletak di dalam vakuola, berpotensi sebagai toksik bagi pertumbuhan dan perkembangan patogen. Beberapa senyawa dari golongan fenolik seperti Asam klorogenat (CGA), Asam gallik,

Asam ellagik, Asam ferulik, asam P-Coumarik, Asam vanilik, Curcumin serta Gingerol telah terbukti memiliki aktivitas imunomodulator yang efektif pada respon imun bawaan dan respon imun didapat (Okwu dkk., 2004).

Fenolik secara umum diketahui berperan sebagai immunosupresan yakni dengan menurunkan sitokin proinflamasi seperti IL-2, IL-6, TNF dan IFN (Chiang dkk., 2003; Liang dkk., 2015). Fenolik juga berperan dalam proliferasi sel B dan penghambatan degranulasi sel mast serta dapat meningkatkan sel limfosit pada sumsum tulang. Penurunan sitokin oleh fenolik melalui jalur NF-kB, berujung pada pengaturan mekanisme respon imun seluler seperti aktivitas makrofag baik sebagai *scavenger cell* dan APC (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

2. Tanin

Tanin merupakan fenolik kompleks yang dapat larut dalam air dan alkohol serta memiliki rasa yang pahit. Fitokimia ini umum ditemukan pada tumbuhan vaskuler *angiospermae*. Tanin diketahui memiliki kemampuan untuk mengatur respon imun seluler sebagai immunosupresan. Seperti pada senyawa Asam Chebulagik dan corilagin dari *Terminalia chebula* dapat menurunkan produksi sitokin TNF dan IL-6 yang akan mempengaruhi aktivitas fagositosis oleh sel mononuklear seperti makrofag, sehingga dapat menekan inflamasi. Tanin juga memiliki aktivitas antiinfeksi sehingga mampu menjaga tubuh dari serangan patogen (Venkatalakshmi *et al.*, 2016).

3. Saponin

Saponin sering ditemukan pada berbagai tanaman tingkat tinggi dan biasanya ditemukan di akar, umbi, daun serta biji. Penelitian modern menemukan bahwa saponin memiliki potensi mengatur sistem imun tubuh. Saponin memiliki aktivitas antitumor dengan menghentikan siklus sel dan apoptosis. Saponin seperti asiaticosid pada *Centella asiatica* diketahui dapat meningkatkan sistem imun dengan meningkatkan indeks fagositosis dan total WBC, sedangkan saponin dari jenis glycyrrhizin pada *Glycyrrhiza glabra* dapat menghambat aktivitas komplemen (Sparg dkk., 2004).

2.4. Aktivitas Fagositosis Makrofag Peritoneal

2.4.1. Fagositosis

Istilah fagositosis berasal dari bahasa Yunani, “*fagos*” yang berarti “makan” dan “*kytos*” yang berarti “rongga”. Fagositosis merupakan mekanisme pertahanan tubuh oleh sel-sel fagosit untuk melawan partikel asing yang menyerang dengan proses; mengenal antigen, menelan, mencerna serta mendegradasi pada partikel tersebut (Coico dan Geoffrey, 2015). Fagositosis termasuk respon imun non-spesifik yang berperan penting dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap serangan mikroorganisme. Melalui fagositosis, sel-sel fagosit yang tersebar diseluruh tubuh akan memakan mikroorganisme yang menjadi sebab suatu penyakit, sehingga tubuh terlindungi oleh unsur-unsur patogen tersebut (Kresno, 2010).

Fagositosis pada sistem imun tubuh memiliki mekanisme yang kompleks serta melibatkan sejumlah molekul perantara untuk mengatur sel-sel fagosit untuk memusnakan mikroorganisme patogen. Hal ini menunjukkan Kekuasaan Allah *Subhanahu wa Ta'ala* yang merupakan Pencipta alam semesta dan makhluk-makhluk di dalamnya, serta menyempurnakan dan menentukan kadar ciptaan-Nya. Allah *Subhanahu wata'la* telah berfirman dalam Al-Qur'an surat Al-A'la (87) ayat 2-3 yaitu:

الَّذِي خَلَقَ فَسَوَّىٰ ۚ وَالَّذِي قَدَّرَ فَهَدَىٰ ۚ

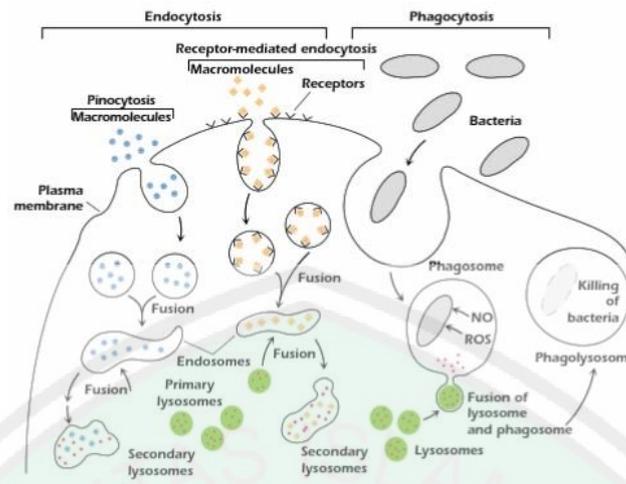
Artinya “Dialah zat yang telah menciptakan dan menyempurnakan (penciptaan Nya), dan **menentukan kadar (masing-masing)** dan memberi petunjuk” (Q.S. Al-A'la (87): 2-3).

Ayat ini menjelaskan bahwa sesungguhnya Allah *Subhanahu wa Ta'ala* yang menciptakan dan menyempurnakan, serta menentukan kadar ciptaan-Nya; memberikan petunjuk kepada jalan-jalan yang membahagiakan di dunia dan akhirat (YPM Salman ITB, 2014).

Kata “خلق فسوى” dalam ayat ini berarti “yang menciptakan dan menyempurnakan” memiliki makna yakni menciptakan makhluknya dan menyempurnakannya dengan bentuk yang sebaik-baiknya (Abdullah, 2013). Salah satunya adalah aktivitas fagositosis pada sistem imun tubuh, yang Allah SWT

kemudian menyempurnakan tubuh manusia dengan mekanisme kompleks dan sempurna tersebut untuk menjaga tubuh dari serangan patogen. Kata “قَدْر” berasal dari kata *قدر* diartikan “ukuran”, “memberi kadar”, atau “mengukur”, berarti seluruh makhluk yang Allah SWT ciptakan diberinya kadar, ukuran serta batas-batas tertentu dalam diri, sifat dan kemampuan maksimal (Shihab, 2009). Sepertihalnya pada fagositosis, aktivitasnya diperantarai sejumlah molekul pensinyalan yang mengatur sel-sel fagositik untuk memfagosit mikroorganisme patogen.

Sistem imun non-spesifik melalui mekanisme fagositosis terjadi apabila sel-sel fagosit diaktivasi oleh molekul-molekul perantara. Molekul perantara disebut juga faktor leukotaktik atau kemotaktik yang bersal dari bakteri maupun yang dilepaskan oleh sel fagosit. Produksi faktor leukotaktik terjadi apabila sel-sel fagosit berada dalam jarak dekat dengan partikel bakteri atau bakteri melekat pada permukaan fagosit. Proses fagositosis selanjutnya yaitu opsonisasi bakteri oleh imunoglobulin atau komplemen (C3). Opsonisasi adalah mekanisme pelapisan mikroba atau antigen oleh Ig dan komplemen yang memberikan tanda untuk reseptor permukaan sel fagosit, sehingga meningkatkan aktivitas fagositosis. Bakteri kemudian masuk ke dalam sel fagosit dengan cara endositosis sehingga terbentuk fagosom. Bakteri dalam fagosom kemudian dihancurkan melalui proses oksidasi-reduksi (ROS) ataupun dengan derajat keasaman nitrit oksidan (NO) yang ada dalam fagosit atau penghancuran oleh lisozim dari fusi fagosom dengan lisosom disebut fagolisosom (Gambar 2.5) (Kresno, 2010; Coico dan Geoffrey, 2015).

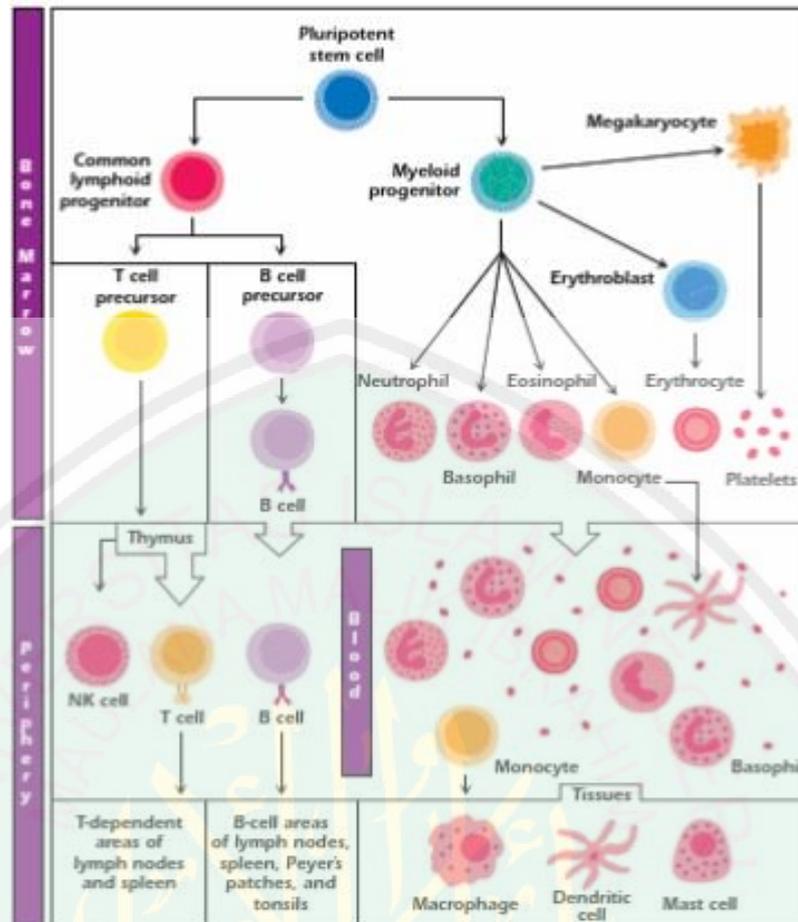


Gambar 2.5 Mekanisme fagositosis (Coico dan Geoffrey, 2015)

Fagositosis mikroba patogen merupakan sistem imun bawaan yang diperankan oleh sel-sel fagosit. Sel leukosit yang termasuk fagosit memiliki peran yang sangat penting untuk mempertahankan tubuh terhadap antigen. sel-sel fagosit meliputi sel polymorfonuklear (neutrofil), makrofag, sel dendritik (SD) dan *natural killer* (NK). Meskipun berbagai sel-sel tersebut dapat melakukan fagositosis, akan tetapi sel utama yang berperan penting dalam pertahanan non-spesifik adalah makrofag sehingga makrofag diberi julukkan *scavenger* utama untuk melawan patogen (Bratawidjaja, 2010; Kresno, 2010).

2.4.2. Makrofag

Sistem fagositosis yang dilakukan oleh sel mononuklear terdiri atas sel monosit yang ada dalam sirkulasi darah dan sel makrofag yang ada di dalam jaringan. Monosit dan makrofag berasal dari sel asal hematopoietik yang sama, selama hematopoiesis dalam sumsum tulang, sel progenitor granulosit berdiferensiasi menjadi premonosit yang kemudian meninggalkan sumsum tulang dan masuk kedalam sirkulasi menjadi monosit matang (Bratawidjaja, 2010). Berikut adalah gambar 2.6 hematopoietik sel mononuklear makrofag dari sel induk pluripoten dalam sumsum tulang.



Gambar 2.6 Hematopoietik sel mononuklear (monosit dan makrofag) dari sel induk pluripoten dalam sumsum tulang (Coico dan Geoffrey, 2015).

Makrofag mempunyai peran penting dalam respon imun. Fungsi utama makrofag dalam imunitas bawaan adalah: (1) makrofag memfagositosis partikel asing seperti mikroorganisme, makromolekul termasuk antigen bahkan sel atau jaringan sendiri yang mengalami kerusakan atau apoptosis, sehingga makrofag disebut sebagai “*scavenger cells*” utama dalam tubuh. (2) makrofag juga memiliki fungsi untuk memproduksi sejumlah sitokin yang berdampak pada sel-sel inflamasi lain, khususnya neutrofil dan bertanggung jawab atas berbagai dampak sistemik inflamasi (Kresno, 2010).

Makrofag dalam jaringan berasal dari monosit atau dari proliferasi sel monosit yang membentuk koloni makrofag resident. Monosit akan berdeferensiasi menjadi makrofag setelah meninggalkan sirkulasi dan masuk ke jaringan. Di

dalam jaringan makrofag dapat teraktivasi dengan adanya rangsangan dan dapat mengubah aktivitas fisiologisnya (Zhang X,dkk., 2008). Fisiologi makrofag dapat berubah tergantung lingkungan atau jaringan yang ditempati makrofag serta rangsangan lokal yang terjadi (Bratawidjaja, 2010). Berikut adalah tabel 2.5 yang menunjukkan jenis makrofag residen dalam beberapa jaringan.

Tabel 2.5 Jenis sel makrofag residen dalam beberapa jaringan yang berbeda (Bratawidjaja, 2010).

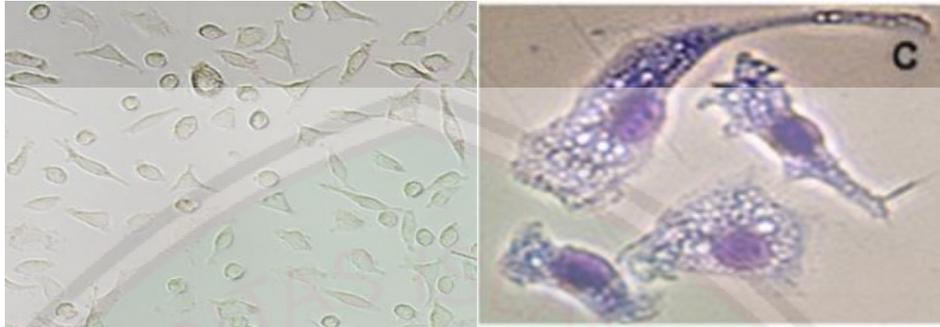
Sel Makrofag Residen dalam Beberapa Jaringan Tubuh	
Lokasi	Nama Sel
Otak	Sel mikroglia
Ginjal	Sel mesangial
Tulang	Osteoklas
Hati	Sel Kuppfer
Jaringan ikat	Histiosit
Paru-paru	Makrofag alveolar dan sel Langerhans
Kulit	Sel dendritik/ sel Langerhans
Usus	Makrofag intestinal
Peritoneal	Makrofag peritoneal

2.4.3. Makrofag Peritoneal

Resident Peritoneal Makrofag (RPM) merupakan sel fagosit yang hidup bebas pada rongga peritoneal (Gambar 2.7). Rongga peritoneum merupakan tempat yang mudah untuk memanen makrofag resident yang belum mengalami manipulasi. Resident makrofag peritoneal dapat diambil dari satu mencit dengan jumlah sel yang banyak. Menurut Susanti (2015) bahwa, hasil rata-rata jumlah makrofag yang diisolasi dari rongga peritoneal berkisar $1,03 \times 10^6$ sel/ mL. Menurut Wang *et al.*, (2008) bahwa, makrofag peritoneal lebih matur dibandingkan makrofag yang didapat dari jaringan lain.

Makrofag peritoneal memiliki ekspresi MHC II dan CD 86 dalam jumlah yang tinggi dan menunjukkan fungsi optimal. Menurut Bratawidjaja (2010) bahwa makrofag peritoneal bergerak bebas dalam cairan peritoneal. Kehadirannya

memungkinkan menangkap patogen dan antigen yang masuk ke dalam tubuh, kemudian mengikat dan memakan partikel tersebut serta mempresentasikannya ke pada sel T. Oleh karena itu, makrofag peritoneal dibagi menjadi dua golongan, pertama sebagai fagosit dan kedua sebagai APC (*Antigen Presenting Cell*).



Gambar 2.7 Kultur sel makrofag peritoneal pada media RPMI1640, (a) isolat sel makrofag sebelum diwarnai, (b) isolat sel makrofag dengan pewarna Giemsa (Susanti dkk., 2015; Wang dkk., 2013).

2.4.4. Faktor-Faktor Aktivasi Fagositosis

Makrofag melaksanakan sebagian besar fungsi efektor hanya setelah sel makrofag diaktivasi oleh mikroba, sitokin dan stimulus lain. Makrofag yang teraktivasi menunjukkan kemampuan yang meningkat untuk membunuh beberapa jenis mikroorganisme, tetapi peningkatan kemampuan membunuh ini tidak berlaku bagi sasaran yang lain. Hal ini disebabkan karena makrofag dapat melakukan berbagai efektor serta aktivitasnya berlangsung dalam beberapa fase yang memerlukan stimulasi berurutan, mencakup limfokin, endotoksin, berbagai mediator dan regulator inflamasi berupa sitokin pro-inflamasi dan antiinflamasi (Kresno, 2010).

Produksi sitokin $TNF-\alpha$ dan $IFN-\gamma$ akan berefek pada aktivitas fagositosis makrofag (Cheng *et al.*, 2019). Hal tersebut dikarenakan dua jenis sitokin tersebut berperan penting dalam mediator respon imun bawaan yang dapat mengaktivasi fagositosis makrofag (Baratawijaja, 2010). TNF (*Tumor Necrosis Factor*) merupakan mediator utama pada respon inflamasi akut yang dapat merangsang makrofag untuk memproduksi $IL-1$ dan $IL-6$. Sedangkan $IFN-\gamma$ memiliki fungsi poten sebagai aktivator fagosit mononuklear seperti makrofag. $IFN-\gamma$ mengaktifkan faktor transkripsi $Ap-1$ dan $NF-kB$ menginduksi ekspresi gen untuk

mensintesis ROI enzim yang berperan dalam *respiratory burst*, sehingga makrofag dapat membunuh bakteri. Oleh karena itu, TNF- α dan IFN- γ meningkatkan fungsi fagositosis makrofag (Kresno, 2010).

IFN- γ juga merangsang produksi isotop antibodi IgG2 yang mengaktifkan komplemen untuk opsonisasi bakteri. Aktivitas fagositosis makrofag akan lebih efisien dengan hadirnya antibodi zat kimia sebagai opsonin yang membungkus permukaan bakteri. Opsonin adalah makro molekul yang diikat pada permukaan mikroba dan dapat dikenal oleh reseptor permukaan sel makrofag. Opsonin membantu sel fagosit untuk memakan bakteri. Contoh opsonin adalah IgG yang dikenal sebagai Fc γ -R pada fagosit dan fragmen komplemen yang dikenal oleh reseptor komplemen tipe 1 dan integrin Mac-1 pada leukosit (Bratawidjaja, 2010).

Opsonin dapat terjadi melalui tiga mekanisme. Pertama adalah antibodi zat kimia sendiri dapat berperan sebagai opsonin. Dua yaitu antibodi zat kimia ditambah dengan antigen dapat mengaktifkan komplemen melalui jalur klasik untuk menghasilkan opsonin dan tiga yaitu opsonin dapat dihasilkan oleh sistem yang tidak tahan panas, dimana imunoglobulin atau faktor lain mengaktifkan C3 melalui jalur alternatif. Pada selaput makrofag terdapat reseptor bagian Fc dari antibodi dan reseptor untuk komplemen C3 dari komplemen. Hal ini membantu fagositosis oleh makrofag terhadap partikel-partikel asing (Brook dkk., 2009).

Aktivasi fagositosis makrofag sebagian besar juga dipengaruhi oleh stimulan lain yang dihasilkan oleh senyawa metabolik sekunder seperti pada tumbuhan. Senyawa metabolik sekunder yang dapat mengaktifasi respon imun ini disebut dengan imunomodulator, yang sudah dipaparkan sebelumnya (Venkatalakshmi *et al.*, 2016). Senyawa imunomodulator umumnya memiliki sifat antioksidan dan dapat menjadi *Macrophage Activating Factor* (MAF). Sifat antioksidan ini dapat menghambat ekspresi COX-2 dan iNOS pada sel makrofag RAW264.7 melalui penurunan aktivitas jalur NF-kB dan JNK/ AP-1 (Shan, J *et al.*, 2009), sehingga dapat menghambat produksi sitokin pro-inflamasi yang diperlukan sebagai aktivator fagositosis makrofag.

Penelitian aktivasi fagositosis makrofag merupakan salah satu metode yang banyak dilakukan untuk mengetahui respon imunologis dari senyawa bioaktif yang memiliki daya imunomodulator. Prinsip pengukuran kemampuan

fagositosis adalah mengukur jumlah partikel bakteri atau antigen lain yang difagositosis oleh makrofag atau sel fagosit lain setelah inkubasi selama waktu tertentu. Pengukuran partikel yang difagositosis dapat dilakukan dengan berbagai cara, diantaranya menghitung proporsi sel fagosit yang mengandung partikel di bawah mikroskop, atau dengan menggunakan flowsitometri (Kresno, 2010).

2.4.5. Antigen Lateks

Antigen merupakan partikel yang mampu merangsang respon imun, baik respon imun seluler maupun respon imun humoral ketika senyawa tersebut berada dalam jaringan tubuh atau pembuluh darah. Partikel ini secara genetik tidak dapat dikenali tubuh, sehingga dapat merangsang sistem imun untuk memproduksi antibodi (Brooks, 2009). Antigen dapat berasal dari protein, asam nukleat, karbohidrat dan lipid yang lebih lanjut dapat mengaktivasi respon imun tubuh (Coico dan Geoffrey, 2015).

Lateks merupakan karet alam yang mengandung protein, ditemukan dalam getah pohon karet *Havea brasiliensis*. Lateks adalah partikel yang mengandung 60% air, 35% senyawa cis 1,4 polysoprene (karet), dan 5-10% bahan lain seperti protein, karbohidrat, resin, dan lain-lain. Protein yang terkandung di dalam lateks berkisar 1-1,8% yang berbeda bergantung dari spesies, tempat tumbuh, dan tempat penyemaian. Saat ini telah terdeteksi kurang lebih sebanyak 200 jenis protein yang dapat menyebabkan reaksi alergi (Kahn dkk, 2016).

Protein yang ditemukan dalam karet alam atau bahan kimia dalam lateks komersial dapat menyebabkan beberapa orang memiliki reaksi alergi terhadap lateks. Jenis reaksi alergi dapat terjadi karena penggunaan lateks karet alam, antara lain; Iritasi dermatis adalah reaksi paling umum akibat kontak dengan produk atau benda berbahan lateks. Hal ini disebabkan, bahan kimia yang ditambahkan ke lateks selama manufaktur, secara langsung menembus kulit yang menyebabkan kemerahan, bengkak, kering, gatal, dan terbakar, atau masuk ke dalam sistem pernapasan yang menyebabkan gejala pernapasan seperti pilek dan bersin (Kahn dkk, 2016; Gathen dkk., 2017). Beberapa kasus juga menunjukkan reaksi anafilaksis yaitu pembekakan wajah, kesulitan bernafas dan penurunan tekanan darah akibat protein lateks masuk langsung ke dalam darah. Reaksi ini

juga dapat terjadi dari bubuk yang ditambahkan ke sarung tangan lateks (Gathen dkk., 2017).

Penolakan tubuh terhadap lateks, menjadikan lateks sebagai antigen oleh para peneliti dalam pengujian respon imun tubuh terhadap antigen yang menginfeksi (Asti, 2015). Pengujian aktivitas respon imun dapat menggunakan bahan lateks, karena lateks memiliki bentuk homogen dan dapat terlihat jelas pada hasil pewarnaan. Dalam uji imunologi di laboratorium, antigen latek juga digunakan dalam tes aglutinasi untuk mengidentifikasi bakteri. Selain itu, dalam pengujian respon imun bawaan pada aktivitas fagositosis yang diperantarai oleh sel-sel fagositik, lateks polistyren digunakan untuk pengukuran kemampuan fagositosis pada sel fagosit seperti makrofag, neutrofil, monosit dan sel dentritik (Kresno, 2010).

2.5. Mencit (*Mus musculus*)

2.5.1. Deskripsi

Mencit merupakan hewan bertulang belakang yang tergolong dalam kelas mamalia pengerat (rodentia). Hewan ini memiliki ciri-ciri bertunuh kecil dengan rambut-rambut putih menutupi tubuhnya. Ekor mencit berwarna kemerahan dan memiliki berat badan saat dewasa sekitar 20-40 gram (akbar, 2010). Selain itu, mencit merupakan hewan yang jinak, takut cahaya, aktif pada malam hari, perkembangbiakannya mudah dengan siklus estrus teratur yaitu 4-5 hari. Mencit memiliki umur hidup yang pendek antar 1-3 tahun (Hasanah, 2015).

Mencit banyak digunakan sebagai hewan coba dalam beberapa penelitian di laboratorium, sekitar 40-80 %. Mencit mudah didapat dengan harga yang relatif murah serta biaya pakan yang rendah. Mencit digunakan sebagai model dalam penelitian berbagai penyakit termasuk dengan metabolismenya, perkembangan, kelainan saraf, imunitas dan lainnya. (Hasanah, 2015). Selain itu, mencit juga berkembang baik dengan cepat, mudah dipelihara, genetiknya bervariasi serta memiliki sifat anatomi dan fisiologi yang terkarakteristik dengan baik (Akbar, 2010). Penciptaan mencit dan pemanfaatannya sebagai hewan percobaan adalah salah satu nikmat dari Allah SWT kepada manusia. Hal tersebut secara tersirat dijelaskan dalam Al-Qur'an surah Luqman (31) ayat 20:

أَلَمْ تَرَوْا أَنَّ اللَّهَ سَخَّرَ لَكُمْ مَّا فِي السَّمَوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ وَأَسْبَغَ عَلَيْكُمْ نِعْمَهُ ظَهْرَهُ وَبَاطِنَهُ وَمِنَ النَّاسِ مَن يُجَادِلُ فِي اللَّهِ بِغَيْرِ عِلْمٍ وَلَا هُدًى وَلَا كِتَابٍ مُّنِيرٍ ۝

Artinya: “**Tidakkah kamu perhatikan sesungguhnya Allah telah menundukkan untuk (kepentingan) mu apa yang di langit dan apa yang di Bumi dan menyempurnakan untukmu nikmat-Nya lahir dan batin. Dan diantara manusia ada yang membantah tentang (ke-Esaan) Allah tanpa ilmu pengetahuan atau petunjuk dan tanpa kitab yang memberi penerangan**” (Q.S. Luqman (31): 20).

Kata “سَخَّرَ” memiliki arti “*menundukkan*” (Shihab, 2009), bahwa Allah SWT telah menundukkan sesuatu yang ada di muka Bumi ini untuk dimanfaatkan sebaik-baiknya untuk kepentingan manusia. Salah satunya yaitu dengan ditundukkan mencit, hewan yang tergolong liar namun atas izin dan kuasa Allah SWT dapat dikendalikan oleh manusia untuk berbagai kepentingan, salah satunya adalah penelitian. Ditundukkannya mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan coba dalam penelitian dapat menghasilkan sebuah pengetahuan seperti kata “ظَهْرَهُ”, berarti kenikmatan dunia atau apa yang tampak dilihat mata dan kata “وَبَاطِنَهُ” memiliki makna apa yang didapatkan manusia untuk dirinya (Qurthubi, 2009). Pengetahuan yang didapat dari sebuah penelitian yang didukung dengan penggunaan hewan coba seperti mencit (*Mus musculus*) adalah bermanfaat bagi manusia.

2.5.2. Taksonomi

Taksonomi hewan mencit (*Mus musculus*) berdasarkan *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) (2019) sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub Filum	: Vertebrata
Intrafilum	: Tetrapoda
Superkelas	: Mamalia
Sub kelas	: Theria
Ordo	: Rodentia (Pengerat)
Famili	: Muridae

Sub famili : Murinae
Genus : Mus
Spesies : *Mus musculus*. Linnaeus.



BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian berjudul, “Efek imunomodulator ekstrak kopi hijau robusta terhadap aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit secara *in vitro*” merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari perlakuan kontrol positif dan 4 perlakuan ekstrak dengan 5 kali ulangan pada masing-masing perlakuan, antara lain:

1. Kelompok kontrol (+) yaitu kelompok isolat sel makrofag peritoneal yang diberi perlakuan produk imunomodulator dengan konsentrasi 100 µg/mL.
2. Kelompok perlakuan P0 yaitu kelompok isolat sel makrofag peritoneal yang diberi perlakuan ekstrak kopi hijau robusta dengan konsentrasi 0 µg/ml.
3. Kelompok Perlakuan (P1) yaitu kelompok isolat sel makrofag peritoneal yang diberi ekstrak kopi hijau robusta dengan konsentrasi 25 µg/ml.
4. Kelompok Perlakuan (P2) yaitu kelompok isolat sel makrofag peritoneal yang diberi ekstrak kopi hijau robusta dengan konsentrasi 50 µg/ml.
5. Kelompok perlakuan (P3) yaitu kelompok isolat sel makrofag peritoneal yang diberi ekstrak biji kopi hijau robusta dengan konsentrasi 75 µg/ml.

3.2. Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan 3 variabel terdiri dari: (1) variabel bebas, (2) variabel terikat dan (3) variabel terkontrol. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak biji kopi hijau (*Coffea canephora*) yang diberikan pada sel makrofag peritoneal dengan varian konsentrasi antara lain: 0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml dan 75 µg/ml. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas fagositosis sel makrofag peritoneal yang dibagi menjadi dua parameter antara lain; persentase fagositosis (PF) dan kapasitas fagositosis (KF) sel makrofag peritoneal. Variabel terkontrol yaitu isolat sel makrofag peritoneal dari mencit (*Mus musculus*) Balb/C yang berumur 6 sampai 8 minggu, media kultur sel yaitu

RPMI1640 dengan 10% serum FBS, tempat inkubasi sel dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37⁰C.

3.3. Waktu dan Tempat

Penelitian ini InsyAllah dilaksanakan pada bulan Februari - Desember tahun 2020. Penelitian dilakukan di laboratorium kultur jaringan hewan sebagai laboratorium utama, laboratorium fisiologi hewan, laboratorium biokimia dan laboratorium hewan coba sebagai laboratorium pendukung, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ; *Lamina Air Flow* (LAF), inkubator CO₂ 5%, mikroskop inverted, haemositometer, sel *count test* autoklaf, oven, timbangan analitik, *plate Culture* (24 well *F-Base*), sentrifus suhu, *hot plate stirel*, *water bath* mikro pipet 20-200 µl dan 100-1000 µl (Biorad), tube sentrifus 15 ml, botol tutup ulir (scot), *filter single use* 0.22 µm, spuit 19 G dan 25 G (*onemad*), gunting bedah, pinset, *blue tip* dan *yellow tip*, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, *beaker glass*, *cover glass*, *hand glove*, masker, penutup kepala, kertas label, tisu, alumunium foil, bunsen, korek dan karet.

3.4.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah isolat sel makrofag peritoneal *Mus musculus* strain Ba1b/C yang berumur 1,5 bulan, biji kopi hijau (*Coffea canephora*), alkohol 70%, media RPMI 1640, DMSO, *latex polystyrene beads*, *Phospat Buffer Saline* (PBS), TC230 (natrium bikarbonat), Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin, streptomycin, DI *water*, tripan blue, pewarna giemsa, NaCl fisiologis, ice balok dan aquades, methanol absolut, wepol, tepol, media NA dan PDA.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Populasi dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan biji kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) varietas robusta (Kopi Robusta). Sampel diperoleh dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia (PUSLIT KAKAO) kota Jember Jawa Timur, sedangkan hewan coba berupa mencit (*Mus musculus*) strain Balb/C jantan berumur 6-8 minggu. Hal ini berdasarkan Susanti (2015). Mencit diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Coba (UPHP) Jalan Soekarno Hatta kota Malang Jawa Timur. Adapun perhitungan jumlah sampel penelitian menggunakan rumus federer yaitu: $(t-1)(n-1) \geq 15$ (Hanafiah, 2015). Tanda “(t)” adalah jumlah kelompok perlakuan dan “(n)” adalah jumlah sampel perkelompok perlakuan. Berdasarkan rumus di atas maka diperoleh perhitungan sebagai berikut:

$$(t - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$5n - 5 - 1n + 1 \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$n \geq 19/4$$

$$n \geq 4.75$$

$$n = 5$$

Jadi jumlah kelompok sampel perlakuan ada 5 kelompok dan masing – masing kelompok terdiri dari 5 kali ulangan.

3.5.2. Preparasi Ruang

Preparasi ruang dilakukan dengan mensterilkan ruang yang akan digunakan sebagai tempat penelitian (kultur sel). Proses sterilisasi diawali dengan membersihkan seluruh ruangan kemudian dibersihkan dengan alkohol 70% dan diusap dengan lap bersih. Lantai ruangan dibersihkan dengan wipol sebanyak tiga kali kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan sinar UV selama 1 x 24 jam. Setelah itu dilakukan uji sterilisasi menggunakan media NA dan PDA untuk mengetahui adanya kontaminasi bakteri dan jamur.

3.5.3. Preparasi Alat

Preparasi alat dilakukan dengan melakukan sterilisasi pada alat-alat yang digunakan untuk penelitian. Langkah dalam sterilisasi alat meliputi alat-alat yang *dissecting* seperti pinset gunting dan alat alat gelas, *non-gelas* dan logam direndam dengan tipol selama 1x24 jam. Alat tersebut digosok kemudian dibilas sebanyak 21 kali dengan air mengalir, untuk mengoptimalkan gunakan aquades pada bilasan terakhir. Alat-alat yang sudah dicuci dikeringkan dalam oven dengan suhu 50⁰ C. Semua peralatan dibungkus rapat dengan alumunium foil. Peralatan gelas dan logam disterilisasi kering dalam oven dengan suhu 125⁰ C selama 3 jam. Sedangkan peralatan yang sifatnya plastik disterilisasi basah dalam autoklaf dengan suhu 121⁰C bertekanan 1.5 atm selama 15 menit.

3.5.4. Preparasi Bahan

3.5.4.1. Pembuatan Ekstrak Aquades Kopi Hijau Robusta

Biji kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) yang sudah dikeringkan, dijadikan serbuk dengan grider. Serbuk kopi hijau sebanyak 100 gram kemudian diekstraksi menggunakan metode infus dengan suhu. Pelarut yang digunakan adalah aquades 6000 ml (rasio1:6), dilakukan selama 2 jam dengan suhu pelarut 70⁰C serta pengadukan berkala menggunakan *magnetic stirer*. Maserat kemudian disaring menggunakan kertas saring sebanyak 3 kali. Ampas yang dihasilkan dari proses penyaringan kemudian diinfus kembali selama 3 jam kemudian direinfus kedua dengan waktu yang sama. Perendaman dihentikan ketika pelarut sudah berwarna bening. Untuk mendapatkan serbuk ekstrak biji kopi hijau, hasil ekstraksi yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40⁰C, Hal ini berdasarkan penelitian oleh Handoyo (2017) yang telah dimodifikasi. selanjutnya serbuk ekstrak aquades kopi hijau robusta yang diperoleh dapat digunakan atau disimpan di dalam lemari pendingin.

3.5.4.2. Pembuatan Media Stok RPMI 1640

Pembuatan media stok dilakukan di LAF (*Laminar Air Flow*). Media kultur yang digunakan untuk sel makrofag peritoneal pada penelitian ini yaitu media RPMI1640 (*with L-Glutamine without glucose and sodium bicarbonate*).

Pembuatan media stok diawali dengan melarutkan 0,84 gram media kultur RPMI1640 dalam 100 ml DI (*Deionized Water*) pada tabung erlenmeyer kemudian ditambahkan 0,2 gram NaHCO₃, 0,01 gram streptomisin dan 0,01 gram penisilin. Aduk semua bahan perlahan sampai benar-benar larut atau dapat juga menggunakan *stirrer* sampai menjadi larutan yang homogen. Sterilkan media dengan menggunakan *filter membrane (millipore)* dengan porositas 0,22 µm. Simpan media dalam *Freezer* dengan suhu 2-4° C sampai digunakan Hal ini berdasarkan informasi produk oleh Vandani (2011) yang telah dimodifikasi.

3.5.4.3. Pembuatan Media Kultur dan Media Washing

Media kultur yang digunakan pada saat isolasi sel makrofag dari rongga peritoneal Balb/c adalah media RPMI 1640 dingin, sedangkan untuk media kultur sel makrofag peritoneal pada *well* berupa media RPMI 1640 dengan 10% FBS serta antibakteria streptomisin dan fungisida penisilin. Media yang digunakan untuk *washing* adalah PBS dan media RPMI *non-serum*.

3.5.5. Isolasi Sel Makrofag Peritoneal

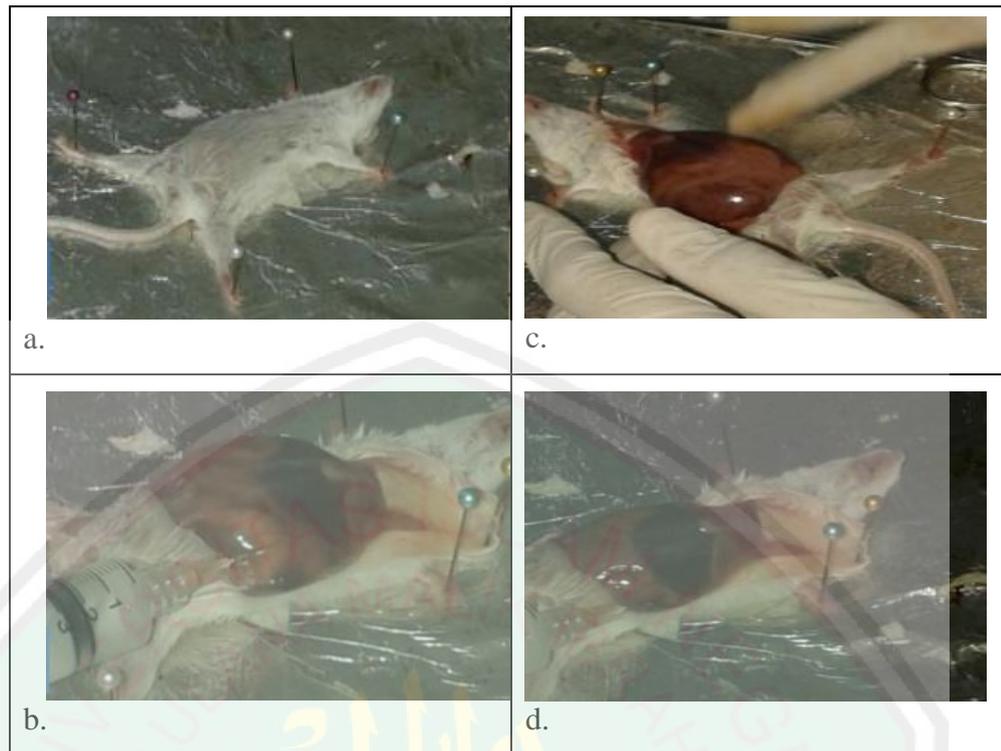
Proses isolasi makrofag dari cairan peritoneal mencit (*Mus musculus*) dilakukan di dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Berikut langkah isolasi makrofag dari cairan peritoneal (Susanti, dkk, 2015):

1. Mencit (*Mus musculus*) berusia 6-8 minggu dinekropsi secara dislokasi *cervical*, kemudian bagian abdomen disterilkan dengan alkohol 70%.
2. Bagian abdomen dibedah hanya pada bagian kulit luar abdomen saja, sedangkan bagian kulit dalam disterilkan lagi dengan alkohol 70%.
3. Rongga perut diinjeksikan media dingin RPMI *non-serum* sebanyak 10 ml menggunakan spuit 25 G, kemudian ditunggu selama 3 menit sambil menepuk-nepuk pada bagian abdomen secara perlahan.
4. Cairan peritoneal mencit diambil menggunakan spuit 19 G dengan cara menekan rongga peritoneal ke dalam dengan 2 jari dan dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus.

5. Cairan peritoneal dimasukkan pada tabung sentrifus 15 ml, kemudian dilakukan setrifugasi pada putaran 1200 rpm, 4⁰ C selama 10 menit, Hasil sentrifugasi berupa supernatan dapat disisihkan.
6. Sentrifugasi ulang secara bertahap dengan putaran 1200 rpm, 4⁰ C selama 10 menit pada isolat sel makrofag peritoneal menggunakan media dingin RPMI 0% serum, kemudian RPMI 5% serum dan RPMI 10% serum. Diambil 100 µl isolat makrofag yang diperoleh dan diresuspensi dengan medium komplit (RPMI+10%FBS) sebanyak 900 µl.
7. Dihitung Jumlah sel makrofag peritoneal menggunakan haemositometer atau *countest cell*, kemudian dihitung konsentrasi sel makrofag yang digunakan untuk pengujian fagositosis yaitu sebanyak 2,5x10⁵ sel atau sekitar 50 µl.

3.5.6. Kultur Sel Makrofag Peritoneal

1. Dilakukam *Thawing* pada Isolat sel makrofag hasil sentrifugasi di dalam *water bath* dengan suhu 37⁰ C hingga merata.
2. Isolat sel makrofag peritoneal ditanam ke dalam mikroplate 24 well yang terlebih dahulu dimasukkan 1 ml media RPMI 10% (sudah diinkubasi), sel makrofag peritoneal yang dimasukkan sebanyak 2,5x10⁵sel/well.
3. Diinkubasi dengan suhu 37⁰C, CO₂ 5% selama 1x24 jam sampai kultur sel makrofag peritoneal menempel pada bagian dasar *well*, setelah inkubasi, kultur sel makrofag peritoneal siap digunakan untuk uji aktivitas fagosistosis.



Gambar 3.1 Isolasi makrofag peritoneal mencit (*Mus musculus*): (a) mencit yang sudah didislokasi kemudian disemprot dengan alkohol 70% pada bagian abdomen untuk dibedah kulit luarnya. (b) menginjeksi media kultur RPMI *non-serum* dingin 10 mL pada rongga abdomen. (c) ditunggu selama 3 menit dan rongga peritoneal ditepuk-tepuk perlahan. (d) cairan peritoneal dan media kultur diambil jauh dari organ usus dan tidak berlemak (Susanti *et al.*, 2015).

3.5.7. Uji Aktivitas Fagositosis

Pengujian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) pada aktivitas fagositosis makrofag dapat diawali dengan menghilangkan media kultur RPMI yang ada pada *well*, sehingga tersisa hanya kultur sel makrofag peritoneal dalam *well* yang menempel bagian dasar *plate*, kemudian tutup *plate* diberi identitas sesuai dengan bahan uji serta konsentrasi ekstrak yang akan dimasukkan pada masing-masing *well*. Masing-masing *well* diberi 1 mL media RPMI komplet yang ditambahkan bahan uji, yakni ekstrak aquades biji kopi hijau robusta dengan variasi kadar yaitu: 0 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ dan 75 $\mu\text{g/mL}$. pada kontrol positif diberi 100 $\mu\text{g/mL}$ produk imunomodulator. Kultur sel makrofag peritoneal

yang sudah diberi perlakuan diinkubasi selama 6 jam dengan suhu 37°C dan CO₂ 5%.

Uji aktivitas fagositosis dilakukan dengan meresuspense *latex beads* dalam PBS kemudian sebanyak 400 µl/well dengan kepadatan 2,5 x 10⁷ latex/mL dimasukkan pada *plate* kultur sel makrofag peritoneal yang sudah diberi perlakuan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan CO₂ 5% selama 60 menit. Setelah inkubasi selesai, media yang berisi bahan uji dan *latex beads* dihilangkan dengan menggunakan mikropipet, kemudian dicuci dengan 1 mL PBS sebanyak 3 kali untuk menghilangkan *latex beads* yang tidak terfagositosis. Dikeringkan pada suhu ruang untuk masuk dalam proses pewarnaan, hal ini berdasarkan Arifah (2014).

Pewarnaan pada aktivitas fagositosis makrofag peritoneal menggunakan pewarna Giemsa 20%. Proses pewarnaan diawali dengan memfiksasi sel kultur dengan metanol sebanyak 300 µl pada setiap *well*. Setelah fiksasi selama 30 detik larutan metanol dibuang, kemudian ditunggu hingga kering. Ditambahkan 1000 µl/well pewarna giemsa 10% kemudian ditunggu pada suhu kamar selama 20 menit. Dicuci dengan aquades sampai bersih (4-5 kali hingga aquades menjadi jernih). *Cover slip* diangkat dari *well* kemudian dikeringkan pada suhu ruang. Aktivitas fagositosis makrofag peritoneal diamati dengan mikroskop *inverted* atau mikroskop cahaya, hal ini berdasarkan Hartini (2013) dan Arifah (2014) yang telah dimodifikasi.

3.5.8. Pengamatan dan Pengambilan Data

a. Persentase Fagositosis (PF)

Persentase fagositosis (PF) merupakan jumlah sel makrofag yang memakan (memfagositosis) minimal satu *latex beads* kemudian dibagi dengan jumlah 200 makrofag (Hartini, 2013):

$$PF = \frac{\sum \text{makrofag yang aktif memfagositosis } latex \text{ beads}}{200 \text{ sel makrofag peritoneal}} \times 100\%$$

b. Kapasitas Fagositosis (KF)

Kapasitas fagositosis (KF) merupakan jumlah *latex beads* yang dimakan (difagositosis) oleh 50 sel makrofag peritoneal (Hartini 2013):

$$KF = \sum \text{latex beads yang difagositosis oleh 50 sel makrofag peritoneal}$$

3.5.9. Analisis Data

Analisis data hasil pengamatan pada penelitian ini dengan menggunakan uji *statistic Analysis of Variance (ANOVA) One Way*. Bertujuan untuk mengetahui perbedaan hasil yang diperoleh dari masing-masing perlakuan secara statistik. Beberapa hal yang harus dipenuhi untuk uji ANOVA-*One Way* adalah sampel yang diujikan harus bersifat independen, distribusi sampel yang diuji normal dan masing-masing populasi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikansi satu sama lain. Data yang tidak memenuhi syarat parametrik maka akan dianalisis menggunakan uji Kruskall-wallis (Hanafia, 2015).

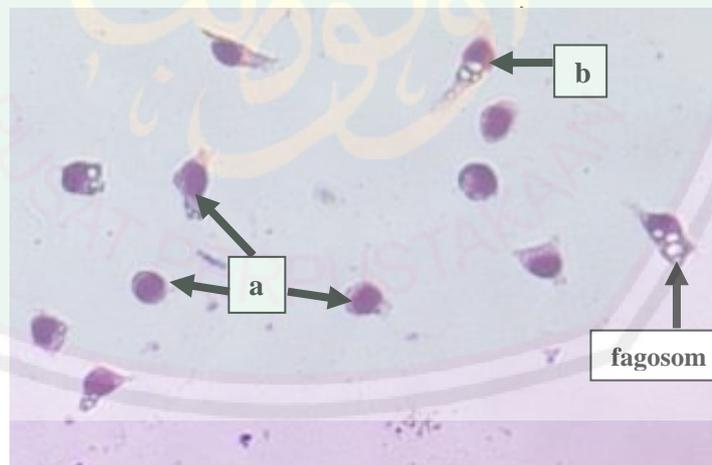
Apabila hasil uji ANOVA-*One Way* terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilakukan uji lanjut dengan $\alpha = 0.05$. Apabila nilai koefisien keragaman (KK) kecil, maka dilakukan uji lanjut beda nyata jujur (BNJ), nilai KK sedang, dilakukan uji lanjut beda nyata terkini (BNT) dan nilai KK besar, maka uji lanjut dilakukan dengan menggunakan uji lanjut Duncan (Hanafia, 2015).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji efek imunomodulator ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit Balb/c dilakukan secara *in vitro* menggunakan partikel lateks berdiameter 3 μm . Lateks merupakan salah satu makromolekul yang dapat mengaktifkan respon imun non spesifik sel makrofag melalui mekanisme fagositosis (Arifah & Nurkhasanah, 2014). Oleh karena itu, pada penelitian ini partikel lateks dipakai sebagai model uji imunomodulator terhadap kemampuan fagositosis makrofag (Hartini *et al.*, 2014).

Pengamatan dengan mikroskop dapat mempermudah membedakan antara sel makrofag yang aktif memfagositosis lateks dengan sel makrofag yang tidak memfagositosis lateks. Hasil pengamatan secara mikroskopis terlihat pada gambar 4.1, bahwa sel makrofag yang tidak memfagositosis lateks tidak ada fagosom lateks, yang tampak hanya inti selnya saja. Sedangkan makrofag yang memfagositosis lateks memiliki fagosom lateks. Partikel lateks yang terfagositosis oleh makrofag akan tampak berbentuk bulat putih cerah berpendar (Rosnizar *et al.*, 2017).



Gambar 4.1 Aktivitas fagositosis makrofag peritoneal mencit Balb/c yang diamati dengan mikroskop inverted perbesaran 200X dan pewarnaan Giemsa 20% (a) adalah sel makrofag yang tidak aktif memfagositosis sehingga tidak ada fagosom, (b) adalah sel makrofag yang aktif memfagositosis lateks sehingga ada fagosom lateks berwarna putih.

Kemampuan fagositosis adalah fungsi yang melekat pada sel makrofag dan penting untuk perlindungan inang serta sebagai permulaan dari respon imun bawaan dan respon imun didapat. Oleh karena itu, makrofag peritoneal sering digunakan dalam studi imunologi untuk mempelajari aktivitas fagositik (Pavlou dkk, 2017). Kemampuan fagositosis sel makrofag dapat diukur menggunakan parameter persentase fagositosis (PF) dan kapasitas fagositosis (KF). Parameter PF dapat diketahui dari jumlah sel makrofag yang aktif memfagositosis minimal satu partikel lateks. Sedangkan parameter KF merupakan jumlah partikel lateks yang terfagositosis oleh sel makrofag yang telah aktif (Safri, 2018). Berikut adalah hasil penelitian efek imunomodulator ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap dua parameter aktivitas fagositosis yaitu PF dan KF makrofag peritoneal mencit (*Mus musculus*) secara *in vitro*.

4.1. Efek Imunomodulator Ekstrak Kopi Hijau Robusta (*Coffeacanephora*) Terhadap Persentase Fagositosis Makrofag Peritoneal Secara *in vitro*

Perhitungan parameter PF sel makrofag peritoneal dilakukan untuk menunjukkan gambaran aktivasi fungsi (peningkatan aktivitas) fagositosis sel makrofag dalam menghancurkan antigen asing yang masuk ke dalam tubuh setelah diinduksi ekstrak kopi hijau robusta (Rosnizar, 2017 dan Greogory dkk., 1999). Nilai PF diperoleh dari jumlah sel makrofag yang aktif memfagositosis partikel lateks dari total 200 sel makrofag yang dihitung kemudian dipersentasakan (Makiyah dkk., 2016). Hasil perhitungan PF menunjukkan nilai rerata PF berbeda pada masing-masing kelompok perlakuan, kemudian data nilai PF dianalisis secara statistika menggunakan SPSS v25. Hasil perhitungan PF sel makrofag peritoneal pada setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada lampiran 2.1.

Berdasarkan analisis statistika, uji normalitas *One Sample Kolmogorov Smirnov* menunjukkan bahwa, nilai PF yang dihasilkan pada masing-masing kelompok perlakuan terdistribusi normal. Nilai signifikansi normalitas sebesar 0.200 ($P > 0.05$) (Lampiran 3.1). Selanjutnya, pada uji homogenitas *Levene* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.252 ($P > 0.05$), sehingga data pada

penelitian ini homogen (Lampiran 4.1). Hasil analisis statistika uji normalitas serta homogenitas secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 2.1 Setelah data yang diuji terbukti berdistribusi normal dan homogen, maka selanjutnya dilakukan uji *One Way*-ANOVA dengan taraf signifikansi 5% untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh ekstrak kopi hijau robusta terhadap aktivitas PF makrofag.

Hasil uji *One Way*-ANOVA menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.00 ($P < 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa hipotesa nol (H_0) ditolak dan hipotesa 1 (H_1) diterima. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) secara signifikan dapat mempengaruhi aktivitas fagositosis makrofag peritoneal secara *in vitro* pada parameter PF (Lampiran 5.1). Oleh karena itu, data diuji lebih lanjut untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari masing-masing perlakuan. Jenis uji lanjut yang digunakan tergantung pada besar nilai koefisien keragaman (KK). Hasil uji *One Way*-ANOVA yang dapat dilihat dalam lampiran 5.1.

Uji lanjut yang digunakan adalah uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan terhadap persentase fagositosis sel makrofag. Hal ini disebabkan hasil perhitungan nilai KK yang diperoleh sebesar 7.75% (Lampiran 2.1), sehingga uji lanjut yang digunakan adalah BNT. Uji lanjut BNT digunakan apabila nilai KK pada data homogen antara 5-10% (Hanafiah, 2016). Hasil uji lanjut BNT pada taraf signifikansi 0.05 disajikan dalam tabel 4.3., sedangkan hasil analisis statistika dengan SPSSv25 secara lengkap dapat dilihat dalam lampiran 6.1.

Tabel 4.1 Hasil uji BNT pemberian ekstra kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap aktivitas PF makrofag peritoneal secara *in vitro*

Perlakuan	Rata-Rata PF \pm SD (%)	Notasi ($\alpha = 0.05$)
P0 (0 $\mu\text{g/ml}$)	45.60 \pm 3.543	a
P1 (25 $\mu\text{g/ml}$)	48.40 \pm 5.572	a
P3 (75 $\mu\text{g/ml}$)	54.60 \pm 2.725	b
Kontrol (+)	54.90 \pm 3.324	b
P2 (50 $\mu\text{g/ml}$)	61.70 \pm 4.738	c

Keterangan: Notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata atau signifikan.

Tabel 4.3 di atas menunjukkan pada P2 menyebabkan PF sel makrofag yang berbeda secara nyata dibandingkan keempat perlakuan yang lainnya (P0, K+, P1 dan P3). Hal ini dapat dilihat dari notasi pada P2 yang memiliki notasi yang berbeda dari perlakuan yang lainnya. Selain itu, pada P3 juga menunjukkan perbedaan secara nyata dengan P0, tetapi tidak berbeda nyata dengan K+. Sedangkan K+ berbeda secara nyata dengan P0. Dengan demikian, P2 dan P3 menunjukkan pengaruh yang berbeda secara nyata dengan P0. Berdasarkan uji lanjut di atas, pemberian ekstrak kopi hijau robusta pada kelompok perlakuan P2 memiliki pengaruh yang berbeda secara nyata dengan dengan P0, K+, P1 dan P3 terhadap aktivitas PF makrofag dalam keadaan *in vitro*.

Tingkat aktivitas makrofag pada kontrol (+) produk-X imunomodulator berdasarkan hasil penelitian mampu meningkatkan PF sebesar 54.60% dibandingkan dengan perlakuan P0 yaitu sebesar 48.4%. Hal tersebut menunjukkan bahwa, terjadinya aktivitas fagositosis makrofag selain berasal dari imunitas alami sel makrofag, juga berasal dari efek imunomodulator dalam produk yang diinduksikan ke dalam lingkungan kultur sel makrofag. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Puspitasari (2010), bahwa ekstrak *Phyllanthus niruri* dalam produk imunomodulator tersebut memiliki kandungan flavonoid dan alkaloid yang tinggi yang mampu mengaktifkan sel imun. Pada konsentrasi 100 µg/ml ekstrak *Phyllanthus niruri* terbukti mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag secara *in vitro* (Santoso dkk, 2013 dan Aldi dkk, 2014).

Aktivitas fagositosis pada perlakuan P0 (0 µg/ml) menunjukkan adanya respon imun bawaan yang diperankan sel makrofag. Hal ini sesuai dengan Coico dan Geoffrey (2015), bahwa respon imun bawaan juga disebut dengan respon imun alami yang muncul sejak lahir dan bekerja cepat untuk melindungi tubuh dari serangan patogen. Rosales dan Eileen (2017) juga menambahkan, bahwa respon imun oleh sel makrofag memiliki peran penting dalam imunitas bawaan berupa fagositosis, sehingga dapat mempertahankan tubuh dari antigen yang masuk kedalam tubuh. Oleh karena itu aktivitas PF makrofag pada P0 merupakan

respon alami sel makrofag peritoneal yang muncul akibat paparan partikel lateks sebagai antigen yang masuk ke dalam tubuh.

Hal tersebut disebabkan karena lateks memiliki kandungan protein alergen berkisar antara 1-1.8% yang dapat mengaktifkan respon imun tubuh secara alami (Kahn dkk, 2016). Berdasarkan Kresno (2010) makrofag yang aktif memfagositosis lateks meningkatkan pembentukan IL-1 baik di dalam sel maupun yang dilepas, sehingga akan merangsang makrofag lain untuk memfagositosis partikel lateks. Hal ini sesuai dengan Bratawidjaja (2010), bahwa IL-1 merupakan mediator respon inflamasi pada imunitas bawaan (non-spesifik) yang dapat merangsang aktivitas sel makrofag (*leukocyte activating factor*). Oleh karena itu pada perlakuan P0 makrofag dapat merespon partikel lateks sebagai antigen, sehingga dapat mengaktifkan makrofag untuk melakukan fagositosis.

Berdasarkan hasil uji lanjut BNT pada setiap perlakuan (P1, P2 dan P3) dapat dijelaskan, belum ada efek imunomodulator yang bermakna pada konsentrasi 25 µg/ml (P1) terhadap peningkatan aktivitas PF makrofag. Hal tersebut ditunjukkan pada konsentrasi 25 µg/ml (P1) memiliki PF sebesar 45.6% yang tidak jauh berbeda dengan PF pada P0 yaitu sebesar 48.4%. sedangkan pada konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi 50 µg/ml (P2) dan 75 µg/ml (P3) menunjukkan efek imunomodulator yang bermakna, ditunjukkan pada peningkatan aktivitas PF makrofag yang signifikan yaitu sebesar 61.7% dan 54.9% dibandingkan dengan P0.

Namun, pada perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 75 µg/ml (P3) menunjukkan aktivitas PF makrofag yang tidak jauh berbeda dengan aktivitas PF makrofag pada perlakuan kontrol (+). Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa, hasil uji lanjut BNT pemberian ekstrak kopi hijau robusta dengan konsentrasi 50 µg/ml (P2) dalam penelitian ini efektif meningkatkan aktivitas PF makrofag secara *in vitro*.

Tingkat aktivitas makrofag peritoneal pada perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 25 µg/ml (P1) menunjukkan aktivitas PF yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain (P2, P3 dan K+). Artinya perlakuan ekstrak dengan konsentrasi tersebut belum menunjukkan peningkatan efek imunomodulator yang bermakna terhadap aktivitas PF makrofag peritoneal secara *in vitro*. Hal ini sesuai

dengan penelitian oleh Nurhasanah (2017) bahwa, pada konsentrasi perlakuan ekstrak yang rendah menunjukkan pengaruh yang tidak signifikan terhadap PF makrofag dibandingkan kelompok perlakuan normal.

Tingkat aktivitas PF yang rendah pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ (P1) ditunjukkan dengan banyak makrofag yang mengalami lisis. Lisis merupakan proses pecahnya sel yang disebabkan kerusakan membran sel (Cannon dan Joel, 2015). Menurut Azzahra (2014), Kresno (2010) dan Bratawidjaja (2010) menyatakan bahwa, sel fagositik yang mengalami lisis disebabkan karena terjadi peningkatan ROS, sehingga mengakibatkan sel makrofag mengalami stres oksidatif dan memproduksi radikal bebas berlebih. Terjadinya stres oksidatif cenderung merusak komponen lipid pada membran, protein, asam nukleat dan DNA sel makrofag.

Hal tersebut dibuktikan berdasarkan penelitian Nurhasanah (2017) bahwa, pada konsentrasi ekstrak yang rendah, kandungan antioksidan tidak mampu menurunkan produksi ROI dan NO pada makrofag yang diinduksi partikel lateks, sehingga sel makrofag mengalami stres oksidatif. Radikal bebas yang dihasilkan akibat stres oksidatif, dalam jumlah besar melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan endogen bersifat toksik bagi sel, cenderung merusak sel makrofag serta menyebabkan gangguan fungsi makrofag (Chapter, 2015; Rosales dan Eileen, 2017). Oleh karena itu kandungan dalam ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) pada konsentrasi rendah memiliki efek imunomodulator yang rendah pada PF makrofag secara *in vitro*.

Sedangkan pada penelitian ini kelompok perlakuan dengan konsentrasi tinggi yaitu 75 $\mu\text{g/ml}$ (P3) menunjukkan efek imunomodulator yang meningkat terhadap aktivitas PF makrofag. Efek imunomodulator pada konsentrasi ini menunjukkan efek yang sama dengan kelompok perlakuan kontrol (+) (Produk-X imunomodulator). Hal ini disebabkan pada dosis 75 $\mu\text{g/ml}$ kandungan polifenol, alkaloid dan flavonoid dalam keadaan *in vitro* mampu meningkatkan aktifitas fagositosis makrofag setara dengan produk-X imunomodulator 100 $\mu\text{g/ml}$ (Hartini (2015).

Namun, pada konsentrasi ini (75 $\mu\text{g/ml}$ / P3) menunjukkan kemampuan aktivitas PF yang menurun dibandingkan dengan kelompok perlakuan P2 (50

µg/ml). Hal ini disebabkan karena ekstrak kopi hijau robusta pada dosis 62.5 µg/ml -125 µg/ml memiliki sifat sitotoksik yang lebih dominan daripada sifat imunomodulatornya (Dewi, 2018). Hal ini sesuai dengan Arifah (2014) bahwa peningkatan dosis ekstrak (50 µg/ml - 100 µg/ml) menurunkan kemampuan imunostimulator dari ekstrak yang disebabkan pada dosis tinggi sifat sitotoksik ekstrak lebih dominan dibandingkan dengan sifat imunomodulator.

Sifat sitotoksik ekstrak yang lebih dominan pada konsentrasi tinggi, mengakibatkan penurunan pertahanan viabilitas sel makrofag (Syarah, 2016), sehingga menurunkan jumlah sel makrofag yang aktif memfagositosis antigen asing. Penurunan PF makrofag oleh ekstrak kopi robusta menurut Agestin, (2019) disebabkan karena pada konsentrasi tinggi ekstrak kopi hijau robusta belum efektif mengurangi ekspresi TNF- α pada sel fagositik yang mengalami inflamasi, sehingga mengakibatkan penurunan aktifitas fungsi fagositosis pada sel makrofag (Kresno, 2010). Oleh karena itu semakin tinggi konsentrasi ekstrak kopi hijau robusta yang diberikan, mengakibatkan PF makrofag semakin menurun.

Pada penelitian ini diperoleh bahwa, konsentrasi yang efektif untuk meningkatkan aktifitas PF adalah pada konsentrasi 50 µg/ml (P2). Hal tersebut ditunjukkan oleh peningkatan yang signifikan dibandingkan keempat kelompok perlakuan yang lainnya (P0, P1, P3 dan K+). Hal tersebut sesuai dengan penelitian oleh Asti (2015) bahwa, pada konsentrasi 25% - 50% ekstrak biji kopi robusta memiliki efek imunostimulator yang efektif meningkatkan PF sel monosit secara *in vitro*. Penelitian oleh Safri (2018) juga membuktikan bahwa, aneka seduhan kopi robusta dengan konsentrasi yang lebih tinggi berpengaruh terhadap aktivitas PF sel makrofag peritoneal yang sebelumnya diinduksi *Bacillus cereus*.

Peningkatan aktivitas PF makrofag pada kelompok perlakuan P2 (50 µg/ml) dan P3 (75 µg/ml) disebabkan karena pada ekstrak kopi hijau robusta memiliki kandungan senyawa yang kaya antioksidan. Hal ini sesuai dengan Preedy (2010) dan Affonso dkk (2016), bahwa ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) tinggi akan senyawa asam klorogenat, kafein dan flavonoid yang memiliki potensi sebagai imunomodulator. Penelitian oleh Percival (1998) dan Birben dkk. (2012) membuktikan bahwa antioksidan dari kopi robusta telah terbukti menstabilkan *Reactive Oxidative Species* (ROS) yang dihasilkan dari

proses aktivitas seluler seperti aktivitas fagositosis makrofag, sehingga sel makrofag terjaga dari kerusakan sel yang diakibatkan oleh radikal bebas. Menurut Kresno (2010) Produksi ROS yang tidak berlebih meningkatkan fungsi fagositosis makrofag dalam melawan partikel asing (Hwang *et al.*, 2014 dan Kim *et al.*, 2017).

Peningkatan aktivitas PF makrofag pada penelitian ini juga disebabkan karena pada ekstrak kopi hijau robusta memiliki kandungan senyawa bioaktif yang memiliki efek antiinflamasi (Hwang *et al.*, 2014). Menurut Chen & Wu (2014) kandungan asam klorogenat dan kafein dalam kopi terbukti dapat mempengaruhi produksi sitokin inflamasi aktivitas sel makrofag (RAW264.7). Kedua senyawa tersebut dapat menurunkan produksi sitokin proinflamasi berupa interleukin IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α dan IFN- γ . Hal ini terjadi karena secara molekuler, senyawa asam klorogenat serta kafein dapat menghambat translokasi *nuclear factor* κ B (NF- κ B) melalui fosforilasi I κ B α , sehingga menurunkan produksi sitokin dan interleukin proinflamasi oleh sel makrofag (RAW264.7) (Shan, J *et al.*, 2009). Oleh karena itu penurunan produksi sitokin proinflamasi pada makrofag dapat menstabilkan aktivitas fagositosis makrofag (Liang dan David, 2015).

Sedangkan kandungan flavonoid dalam ekstrak kopi hijau robusta yang cukup tinggi, terbukti memiliki kemampuan imunomodulator untuk memperbaiki sistem imun (Kusmadi, 2007; Kartika, 2016), sehingga mampu meningkatkan PF sel fagositik (Asti, 2015). Hal tersebut dijelaskan dalam penelitian oleh Venkatalakshmi *et al.*, (2016) bahwa, kandungan flavonoid memiliki efek antioksidan yang mampu memperbaiki respon imun dan mencegah kerusakan sel fagositik dengan menghambat reaksi oksidasi akibat infeksi. Hal tersebut disebabkan karena kandungan flavonoid telah terbukti mampu mengaktifkan makrofag untuk memproduksi IL-12 dan meningkatkan IFN- γ , sehingga flavonoid memperkuat aktivitas fagositosis makrofag dengan memproduksi *nitric oxide* (NO) yang efektif untuk melawan patogen (Abror, 2018). Oleh karena itu kandungan flavonoid pada ekstrak kopi hijau robusta dapat meningkatkan aktivitas PF makrofag peritoneal secara *in vitro*.

Berdasarkan penjelasan di atas, pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) dapat mempengaruhi aktivitas fagositosis makrofag peritoneal dalam keadaan *in vitro* secara signifikan pada parameter PF. Hal tersebut dibuktikan dalam hasil Uji *One Way*-ANOVA.

Perbedaan kelompok konsentrasi ekstrak yang diberikan menunjukkan pengaruh yang beragam. Pada uji lanjut BNT menunjukkan bahwa, pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) dengan konsentrasi 50 µg/ml merupakan konsentrasi yang efektif dalam meningkatkan aktivitas PF makrofag. Sedangkan pada konsentrasi yang lebih rendah atau konsentrasi yang terlalu tinggi menunjukkan aktivitas PF yang lebih rendah, sehingga belum menunjukkan efek imunomodulator yang bermakna terhadap aktivitas PF makrofag peritoneal secara *in vitro*.

4.2. Efek Imunomodulator Ekstrak Kopi Hijau robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Kapasitas Fagositosis Makrofag Peritoneal secara *in vitro*

Perhitungan parameter kapasitas fagositosis (KF) sel makrofag peritoneal dilakukan untuk mengamati kemampuan maksimal sel makrofag untuk memfagositosis antigen asing yang masuk ke dalam tubuh setelah diinduksi ekstrak kopi hijau robusta (Gregory dkk., 1999; Rosnizar, 2017). Pengamatan KF pada uji aktivitas fagositosis makrofag peritoneal secara *in vitro* diperoleh dari jumlah antigen lateks yang difagositosis oleh 50 makrofag yang teraktivasi (Rosnizar dkk, 2017). Hasil pengamatan menunjukkan nilai rerata KF berbeda pada setiap kelompok perlakuan, yang kemudian data dianalisis statistika untuk menguji normalitas dan homogenitas pada data tersebut. Adapun nilai rerata KF disajikan pada lampiran 2.2.

Berdasarkan analisis statistika, uji normalitas *One Sample Kolmogorov Smirnov* menunjukkan, bahwa nilai KF yang dihasilkan pada masing-masing kelompok perlakuan terdistribusi normal. Nilai signifikansi normalitas sebesar 0.200 ($P > 0.05$) (Lampiran 3.2). Selanjutnya, pada uji homogenitas *Levene* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,299 ($P > 0.05$), sehingga data pada penelitian ini telah homogen (Lampiran 4.2). Hasil analisis statistika uji

normalitas serta homogenitas secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 2.2. Setelah data yang diuji terbukti berdistribusi normal dan homogen, selanjutnya dilakukan uji *One Way*-ANOVA dengan taraf signifikansi 5% untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh ekstrak kopi hijau robusta terhadap aktivitas fagositosis pada parameter KF.

Berdasarkan hasil uji *One Way*-ANOVA menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.032 ($P < 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa hipotesa nol (H_0) ditolak dan hipotesa 1 (H_1) diterima. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) secara signifikan dapat mempengaruhi aktivitas fagositosis makrofag peritoneal dalam keadaan *in vitro* pada parameter KF (Lampiran 5.2). Oleh karena itu, data diuji lanjut untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari masing-masing perlakuan. Jenis uji lanjut yang digunakan tergantung pada besar nilai koefisien keragaman (KK). Hasil uji *One Way*-ANOVA yang dapat dilihat pada lampiran 5.2.

Uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan untuk mengetahui perbedaan antara kelompok perlakuan yang berpengaruh terhadap KF makrofag. Hal ini disebabkan hasil perhitungan nilai KK yang diperoleh sebesar 15.37% (Lampiran 2.2), sehingga uji lanjut yang digunakan adalah Duncan. Hal ini sesuai dengan Hanafiah (2016), Uji lanjut Duncan digunakan apabila nilai KK pada data homogen minimal 10%. Hasil uji lanjut Duncan pada taraf signifikansi 0.05 disajikan dalam tabel 4.6. Sedangkan hasil analisis statistika dengan SPSSv25 dapat dilihat dalam lampiran 6.3.

Tabel 4.6 Hasil uji lanjut Duncan pemberian ekstra kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) terhadap KF sel makrofag peritoneal mencit Balb/c secara *in vitro*

Perlakuan	Rerata KF \pm SD (lateks/ml)	Notasi ($\alpha = 0.05$)
P1 (25 μ g/ml)	151.60 \pm 21.721	a
P0 (0 μ g/ml)	163.00 \pm 33.963	ab
P3 (75 μ g/ml)	188.00 \pm 12.124	abc
Kontrol (+)	194.40 \pm 31.389	bc
P2 (50 μ g/ml)	205.60 \pm 33.063	c

Keterangan: Notasi dengan huruf yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata atau signifikan.

Tabel 4.6 di atas menunjukkan pada P2 menyebabkan KF makrofag yang berbeda nyata dibandingkan P0 dan P1. Hal ini dapat dilihat dari notasi pada P2 yang memiliki notasi yang berbeda dengan P0 dan P1. Akan tetapi, P2 menunjukkan notasi yang sama dengan K+ dan P3. Hal tersebut menunjukkan pengaruh yang tidak berbeda nyata dengan K+ dan P3. Oleh karena itu, berdasarkan uji lanjut di atas pemberian ekstrak kopi hijau robusta pada kelompok perlakuan P2 memiliki pengaruh yang berbeda secara nyata dengan perlakuan P0 dan P1. Namun, tidak berbeda nyata dengan perlakuan P3 dan K+.

Aktivitas fagositosis pada perlakuan P0 (0 µg/ml) mampu memfagositosis lateks dengan jumlah 163.0 lateks/ml. Hal tersebut menunjukkan adanya respon imun alami yang diperankan sel makrofag. Hal tersebut disebabkan karena partikel lateks yang diinduksikan diketahui memiliki protein alergen yang mampu mengaktifkan respon sel imun (Khan dkk., 2016). Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Kresno (2010) partikel lateks dapat mengaktifkan makrofag untuk memproduksi interleukin (IL)-1 yang kemudian dilepaskan ke lingkungan sebagai *leukocyte activating factor*, sehingga makrofag memproduksi beberapa sitokin proinflamasi lain seperti TNF- α dan IFN- γ (Bratawidjaja, 2010 dan Kresno, 2010). Oleh karena itu pada perlakuan P0 makrofag dapat merespon lateks sebagai antigen, sehingga mengaktifkan makrofag untuk melakukan fagositosis.

Aktivitas makrofag pada kontrol (+) (produk-X imunomodulator) dengan konsentrasi 100µg/ml pada penelitian ini mampu meningkatkan jumlah lateks yang terfagositosis sebanyak 194.4 lateks/mL dibandingkan dengan perlakuan P0 (0µg/ml). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Susanto dkk. (2013) Pada konsentrasi 100µg/ml ekstrak dari produk-X imunomodulator terbukti mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag peritoneal secara *in vitro*. Produk-X imunomodulator pada penelitian ini mengandung ekstrak *Phyllanthus niruri* yang sudah dipatenkan menjadi obat imunomodulator alami (Sunarno, 2009; Widayanti, 2008). Hal tersebut disebabkan karena ekstrak *Phyllanthus niruri* memiliki kandungan flavonoid dan alkaloid yang terbukti meningkatkan respon

imun (Farhan, 2013) serat mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag (Aldi dkk., 2014).

Berdasarkan uji lanjut Duncan pada setiap perlakuan ekstrak (P1, P2 dan P3) dapat dijelaskan, belum ada peningkatan efek imunomodulator yang bermakna pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ (P1) terhadap KF makrofag. Hal tersebut ditunjukkan pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ (P1) mampu memfagositosis lateks sebanyak 151.6 lateks/ml yang lebih rendah dengan KF pada P0 (0 $\mu\text{g/ml}$) yaitu sebanyak 163.0 lateks/ml. Sedangkan, pada konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi yaitu 50 $\mu\text{g/ml}$ (P2) 75 $\mu\text{g/ml}$ (P3) menunjukkan peningkatan efek imunomodulator yang ditunjukkan dengan peningkatan KF makrofag yang bermakna yaitu sebanyak 205.60 lateks/ml dan 188.00 lateks/ml dibandingkan P0 (0 $\mu\text{g/ml}$).

Namun, pada perlakuan konsentrasi ekstrak 75 $\mu\text{g/ml}$ (P3) menunjukkan KF makrofag yang tidak jauh berbeda dengan KF makrofag pada perlakuan kontrol (+) dan P1. Oleh karena itu hasil uji lanjut Duncan pada penelitian ini menunjukkan bahwa, semakin tinggi konsentrasi ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) yang diberikan pada sel makrofag peritoneal secara *in vitro*, mengakibatkan KF makrofag peritoneal semakin meningkat.

Tingkat KF makrofag peritoneal pada konsentrasi ekstrak 25 $\mu\text{g/ml}$ (P1) menunjukkan KF yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lainnya (P0, P2, P3 dan K+). Hal ini menjelaskan bahwa pada konsentrasi rendah, efek imunomodulator ekstrak kopi hijau robusta belum dapat meningkatkan kemampuan makrofag peritoneal untuk memfagositosis partikel asing dengan jumlah yang lebih banyak dibandingkan keempat perlakuan yang lainnya. Hal tersebut dapat disebabkan karena senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak tidak cukup memiliki aktivitas antioksidan untuk menghambat terbentuknya radikal bebas yang disebabkan aktivitas fagositosis, sehingga banyak sel makrofag yang mengalami kerusakan atau lisis (Asti, 2015).

Menurut Azzahra (2014), Kresno (2010) dan Bratawidjaja (2010) sel fagositik yang mengalami lisis disebabkan karena sel mengalami stres oksidatif akibat produksi ROS dan NO berlebih. Peningkatan ROS dan NO pada makrofag disebabkan induksi lateks (Rauf dkk., 2016), sehingga radikal bebas yang

dihasilkan merusak fungsi fagositosis makrofag. Hal ini sesuai dengan Chapter, (2015) dan Rosales dan Eileen, (2017) bahwa radikal bebas dalam jumlah besar melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan endogen bersifat toksik bagi sel, cenderung merusak sel serta menyebabkan gangguan fungsi sel. Oleh karena itu ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) pada konsentrasi rendah memiliki efek imunomodulator yang rendah pada KF makrofag secara *in vitro*.

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh bahwa, konsentrasi yang efektif untuk meningkatkan KF makrofag adalah pada konsentrasi 50 µg/ml (P2). Hal tersebut ditunjukkan dengan terjadi peningkatan KF dibandingkan keempat kelompok perlakuan yang lainnya (P0, P1, P3 dan K+). Hal tersebut sesuai dengan penelitian oleh Asti (2015) bahwa, pada konsentrasi 25% - 50% ekstrak biji kopi robusta memiliki efek imunostimulator yang efektif meningkatkan aktivitas fagositosis secara *in vitro*. Penelitian oleh Safri (2018) juga membuktikan bahwa, aneka seduhan kopi robusta dengan konsentrasi yang lebih tinggi berpengaruh terhadap aktivitas KF sel makrofag peritoneal yang sebelumnya diinduksi *Bacillus cereus*.

Peningkatan aktivitas KF makrofag pada kelompok perlakuan P2 (50 µg/ml) disebabkan karena ekstrak kopi hijau robusta memiliki kandungan senyawa flavonoid dan fenol yang dapat meningkatkan fungsi opsonisasi (penempelan antigen pada protein reseptor) pada sel fagositik (Brooks dkk., 2009), sehingga dapat mempermudah makrofag untuk memfagositosis partikel asing (Asti, 2015) serta meningkatkan jumlah antigen terfagositosis (Safri, 2018).

Selain fungsi opsonisasi, kandungan bioaktif dalam ekstrak kopi robusta mampu meningkatkan KF makrofag karena memiliki efek antioksidan. Penelitian oleh Percival (1998) dan Birben dkk. (2012) membuktikan bahwa senyawa asam klorogenat dan kafein terbukti menstabilkan *Reactive Oxidative Species* (ROS) yang dihasilkan dari proses aktivitas fagositosis makrofag, sehingga mencegah kerusakan pada sel makrofag yang diakibatkan oleh radikal bebas. Hal ini sesuai dengan Syarah (2019) dan Asti (2015) bahwa senyawa antioksidan dalam kopi robusta mampu mempertahankan keutuhan bentuk membran sel dan fungsi sel terhadap antigen asing, sehingga meningkatkan viabilitas sel makrofag yang secara tidak langsung meningkatkan PF dan KF makrofag.

Peningkatan KF makrofag pada penelitian ini juga disebabkan karena kandungan asam klorogenat dan kafein dalam kopi telah terbukti dapat mempengaruhi produksi sitokin inflamasi oleh aktivitas sel makrofag RAW264.7 (Chen dan Wu, 2014). Menurut Cannon dan Joel (2015) produksi sitokin inflamasi mempengaruhi pemanjangan pseudopodia makrofag, sehingga meningkatkan jumlah lateks yang terfagositosis. Hal ini sesuai dengan Djodibroto (2009) bahwa pembentukan pseudopodia dapat membantu makrofag dalam melakukan pergerakan sel dan perluasan fagositosis, serta dapat mengoptimalkan proses opsonisasi.

Menurut McWhortera dkk. (2013) perpanjangan makrofag (pseudopodia makrofag) terjadi karena peningkatan IL-4 dan IL-13. Sedangkan pada induksi IFN, mengakibatkan makrofag membesar yang menandakan terjadi peningkatan aktivitas makrofag. Hal ini sesuai Jung *et al.* (2017) dan Shan *et al.* (2009) bahwa kandungan asam klorogenat serta kafein menghambat translokasi *nuclear factor* κ B (NF- κ B) melalui fosforilasi I κ B α , sehingga menurunkan produksi sitokin proinflamasi pada sel makrofag (RAW264.7). Oleh karena itu, ekstrak kopi hijau robusta memiliki efek antiinflamasi dan imunomodulator pada penelitian ini mampu meningkatkan KF makrofag peritoneal secara *in vitro*.

Sedangkan. Pada konsentrasi yang lebih tinggi (75 μ g/ml/ P3) menunjukkan kemampuan KF yang menurun dibandingkan dengan kelompok perlakuan P2 (50 μ g/ml). Hal ini disebabkan karena ekstrak kopi hijau robusta pada konsentrasi tinggi memiliki sifat sitotoksik yang lebih dominan daripada sifat imunomodulatornya (Dewi, 2018). Hal ini sesuai dengan Arifah (2014) bahwa peningkatan dosis ekstrak (50 μ g/ml - 100 μ g/ml) menurunkan kemampuan imunostimulator dari ekstrak yang disebabkan karena pada dosis tinggi sifat sitotoksik ekstrak lebih dominan dibandingkan dengan sifat imunomodulator.

Berdasarkan penjelasan di atas, pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) dapat mempengaruhi aktivitas fagositosis makrofag peritoneal dalam keadaan *in vitro* secara signifikan pada parameter KF. Hal tersebut dibuktikan dalam hasil Uji *One Way* ANOVA.

Perbedaan kelompok konsentrasi ekstrak yang diberikan menunjukkan pengaruh yang beragam. Pada uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa, pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) dengan konsentrasi 50µg/ml merupakan konsentrasi yang optimal dalam meningkatkan aktivitas KF makrofag. Sedangkan pada konsentrasi yang lebih rendah atau konsentrasi yang terlalu tinggi menunjukkan KF yang lebih rendah, sehingga belum menunjukkan efek imunomodulator yang bermakna terhadap KF makrofag peritoneal secara *in vitro*.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa dalam konsentrasi ekstrak tertentu memiliki efek imunomodulator yang lebih efektif untuk meningkatkan jumlah sel makrofag yang aktif memfagositosis dan meningkatkan jumlah antigen yang difagositosis. Konsentrasi tertentu pada aktivitas makrofag yang lebih efektif merupakan salah satu bentuk tanda kebesaran Allah SWT sebagai Pencipta yang telah menciptakan segala sesuatu dengan ukurannya. Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an Surat Al-Qomar (54) ayat 49,

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya: "Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran"

Kata كُلَّ شَيْءٍ memiliki makna "segala sesuatu" yang Allah SWT ciptakan. Sedangkan dalam kata "بِقَدَرٍ" memiliki makna "kadar tertentu" yang tidak bertambah dan berkurang (Shihab, 2003). Menurut Sayyid Quthub (2004) dalam tafsirnya menjelaskan bahwa segala makhluk yang diciptakan-Nya, diatur oleh-Nya kadarnya dan keseimbangannya masing-masing. Serta Allah tentukan dan tetapkan ukurannya (Basyir dkk., 2011).

Berdasarkan hal tersebut, ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan sesuatu dengan ukurannya, bukan karena suatu hal kebetulan. Seperti halnya penerapan konsentrasi ekstrak dalam penelitian ini terhadap PF dan KF sel makrofag. Pada konsentrasi yang lebih rendah (25 µg/ml) atau konsentrasi yang terlalu tinggi (75 µg/ml) menunjukkan aktivitas PF dan KF yang lebih rendah dibandingkan pada konsentrasi 50µg/ml yang menunjukkan aktivitas PF dan KF yang tinggi. Berdasarkan hal tersebut, konsentrasi ekstrak yang tepat dapat

memberikan manfaat interaksi yang lebih optimal antar kandungan bioaktif ekstrak dengan aktivitas fagositosis makrofag.

Ekstrak kopi hijau robusta memiliki kandungan bioaktif yang kaya antioksidan dan antiinflamasi, sehingga mampu meningkatkan PF dan KF makrofag. Meningkatkan jumlah makrofag yang aktif serta jumlah partikel lateks yang terfagositasi, menunjukkan kandungan bioaktif pada ekstrak kopi hijau robusta menjadi jalan keseimbangan aktivitas makrofag, sehingga makrofag dapat mengoptimalkan aktivitasnya.

Allah SWT telah menjelaskan secara implisit mengenai keseimbangan di alam ini dalam Surat Al-Mulk (67) ayat 3,

الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا مَّا تَرَى فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفْوُتٍ فَارْجِعِ الْبَصَرَ هَلْ تَرَى مِن فُطُورٍ ۚ

Artinya: “Yang telah menciptakan tujuh langit berlapi-lapis. Kamu sekali-kali tidak melihat pada ciptaan Tuhan yang Maha Pemurah sesuatu yang tidak seimbang. Maka hendaklah kamu melihat berulang-ulang. Adakah kamu lihat sesuatu yang tidak seimbang?”

Maksud dari kalimat *الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا مَّا تَرَى فِي خَلْقِ الرَّحْمَنِ مِن تَفْوُتٍ* adalah semua ciptaan Allah SWT saling bersesuaian dan seimbang. Tidak ada pertentangan, benturan, ketidakcocokkan, kekurangan dan kerusakan (Abdullah, 2006). Hal tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan seluruh makhluk dalam keadaan seimbang sebagai rahmat, karena seandainya ciptaan-Nya tidak seimbang, maka tentulah akan terjadi kekacauan (Shihab, 2013). Sedangkan dalam kalimat “*فَارْجِعِ الْبَصَرَ*” memiliki makna “*Maka lihatlah berulang-ulang*”. Maksud dari kalimat tersebut adalah telitilah berulang-ulang apakah terdapat ketidaksimbangan padanya (ciptaan-Nya) (Abdullah, 2006).

Berdasarkan Surat Al-Mulk (67): 3, Allah SWT telah menjelaskan bahwa tidak ada sesuatu apapun dari ciptaan Allah SWT yang tidak seimbang yang menunjukkan kekuasaan-Nya (Al-Jazairi, 2017). Hal tersebut juga berlaku untuk aktivitas fagositosis sel makrofag yang merupakan salah satu respon imun untuk menjaga homeostasis tubuh dari antigen asing yang masuk ke dalam tubuh. Pada

penelitian ini sel makrofag aktif memfagositosis partikel lateks yang dapat menjadi sumber kerusakan sel. Lateks dapat memicu radikal bebas di dalam sel makrofag, sehingga sel mengalami stres oksidatif dan berakibat pada penurunan aktivitas fagositosis.

Sedangkan, kandungan ekstrak kopi hijau robusta dapat menghambat kerusakan sel makrofag dengan menstabilkan *Reactive Oxidative Species* (ROS) dan menurunkan produksi sitokin proinflamasi pada makrofag yang mengalami stres oksidatif (Sukma, 2018; Naveed dkk., 2018). Oleh karena itu aktivitas fagositosis makrofag menjadi lebih stabil dan optimal. Hal ini ditunjukkan pada kelompok perlakuan P2 (50 µg/ml) mampu meningkatkan KF makrofag paling efektif dibandingkan perlakuan yang lebih rendah (P1) dan tinggi (P3). Berdasarkan hal tersebut, menunjukkan segala sesuatu yang Allah SWT ciptakan baik itu di dalam sel sekalipun tidak ada yang diciptakan tidak seimbang, sehingga bagi orang yang mau berfikir terhadap hal-hal tersebut dapat menjadi pembelajaran untuk meningkatkan keimanan dan ketaqwaan kepada Allah SWT.

BAB V

PENUTUP

5.1. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian di atas dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) berpengaruh terhadap aktivitas persentase fagositosis (PF) makrofag peritoneal mencit secara *in vitro*. Konsentrasi ekstrak yang paling efektif dalam meningkatkan PF makrofag peritoneal mencit secara *in vitro* adalah 50 µg/ml.
2. Pemberian ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) berpengaruh terhadap aktivitas kapasitas fagositosis (KF) makrofag peritoneal mencit secara *in vitro*. Konsentrasi ekstrak yang paling efektif dalam meningkatkan KF makrofag peritoneal mencit secara *in vitro* adalah 50 µg/ml.

5.2. SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka beberapa saran yang dapat diambil yaitu:

1. Penelitian selanjutnya disarankan menggunakan *range* konsentrasi yang lebih sempit pada ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) berdasarkan konsentrasi ekstrak yang paling efektif dari hasil penelitian ini, sehingga dapat mengetahui efek imunomodulator yang lebih optima.
2. Penelitian selanjutnya dapat menggunakan ekstrak kopi hijau robusta (*Coffea canephora*) untuk mengetahui aktivitas fagositosis makrofag pada parameter yang berbeda seperti IL-1.
3. Perlu dilakukan optimasi ukuran partikel lateks yang tepat, sehingga mengetahui kemampuan KF makrofag peritoneal yang lebih optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2013. “ *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 3* ”. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi’i.
- Abror, Yogi Khoirul, Evy Diah Woelansari, and Suhariyadi Suhariyadi. 2018. “Immunomodulator of Ethanol Extracts of The Leaves *Azadirachta Indica* Against Macrophage Peritoneal Cell in Mice Induced The Vaccine BCG.” *Jurnal Teknologi Laboratorium* 7(1): 8.
- Agesti.H, W. (2019). Analisis Efek Sudaan Green Coffee dan Black Coffee Terhadap Ekspresi TNF-alfa Pada Human Monosit Yang Dipapar *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Universitas Negeri Jember.
- Akbar, Budhi. 2010. *Tumbuhan dengan kandungan senyawa aktif Yang Berpotensi Sebagai Bahan Anti Fertilitas*. Jakarta: Adabia Press.
- An, Hyo Jin *et al.* 2004. “Xanthii Fructus Inhibits Inflammatory Responses in LPS-Stimulated Mouse Peritoneal Macrophages.” *Inflammation* 28(5): 263–70.
- Andriyanti, W, *et al.* 2010. Study of Natural Rubber Latex Method Free Nitromines and Protein Allergens. *Journal*. ISSN 0216-3128: 161-169.
- Affonso, Regina Celis Lopes *et al.* 2016. “Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effect of the Aqueous Extract of Coffee (*Coffea Arabica* L.) Bean Residual Press Cake on the Skin Wound Healing.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 1–10.
- Aher, V. D., *et al.* 2011. Antioxidants as immunomodulator : An expanding research avenue. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(1), 8–10.
- Aldi, Y, *et al.* 2015. Aktivitas Beberapa Subfraksi Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag. *Scientia : Jurnal Farmasi Dan Kesehatan*.
- Al-Jazairi, Abu Bakar Jabir. 2004. *Tafsir Al-Qur’an Al-Aisar*. Jakarta: Darus Sunah.
- Alonso-Salces, Rosa M., Francesca Serra, Fabiano Remero, and Karoly Heberger. 2009. “Botanical and Geographical Characterization of Green Coffee (*Coffea Arabica* and *Coffea Canephora*): Chemometric Evaluation of Phenolic and Methylxanthine Contents.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(10): 4224–35.

- Altavilla, Domenica *et al.* 2008. "Anti-Inflammatory Effects of the Methanol Extract of *Sedum Telephium* Ssp. Maximum in Lipopolysaccharide Stimulated Rat Peritoneal Macrophages." *Pharmacology* 82(4): 250–56.
- Amirghofran, Zahra. 2012. "Herbal Medicines for Immunosuppression." *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology* 11(2): 111–19.
- Arifah, Aminda Nur, and Nurkhasanah. 2014. "Efek Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Akar Pasak Bumi (*Eurycoma Longifolia*, Jack) Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag Secara In Vitro." *Pharmaciana* 4(1): 9–14.
- Asosiasi Eksportir Kopi Indonesia. 2005. Statistik Kopi Tahun 2003-2005. Asosiasi Eksportir Kopi Indonesia, Jakarta.
- Asti Sariwiwit Intan Permata. 2015. "Pengaruh Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea Robusta*) Terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Monosit." *Skripsi*. Universitas Negeri Jember.
- Azzahra, H.Pujiastuti, P, dan Purwanto. 2014. Potensi Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Buatan Pabrik Terhadap Peningkatan Aktivitas Mikrobisida Sel Neutrofil yang Dipapar *Streptococcus mutans*. *Jurnal Pustaka Kesehatan*. Vol.2 (1): 161-166.
- Babova, Oxana, *et al.* 2016. "Chemical Partitioning and Antioxidant Capacity of Green Coffee (*Coffea Arabica* and *Coffea Canephora*) of Different Geographical Origin." *Phytochemistry* 123: 33–39.
- Barbosa, Antony de Paula. 2014. "Anti-Inflammatory Properties and Immunoadjuvant Activity of *Samanea Saman* Extract." *Emirates Journal of Food and Agriculture* 26(9): 818–21.
- Belay, Abebe. 2011. "Some Biochemical Compounds in Coffee Beans and Methods Developed for Their Analysis." *International Journal of the Physical Sciences* 6(28): 6373–78.
- Bicho, N. C, *et al.* 2013. Quality assessment of Arabica and Robusta green and roasted coffees - A review. *Emir. J. Food Agr* 25, 945-950.
- Birben E, *et al.* 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO Journal*. 5: 9-19.
- Bratawidjaja, Karnen Garna. 2010. *Imunologi Dasar edisi ke-11 (Cetakan ke-2)*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Brooks, G. F, *et al.* 2009. *Medical Microbiology*. Edisi 20. Alih bahasa oleh Edi Nugroho dan R.F. Maulany. Jakarta: EGC.

- Campbell, Neil A, dan Jane B. Reece. 2010. *Biologi: Edisi Kesepuluh, jilid 3* (Alih bahasa: Damaring Tyas Wulandari). Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Cannon, G. J., & Swanson, J. A. (2015). The macrophage capacity for phagocytosis. *Journal of Cell Science*, *101*, 907–913.
- Chapter, A, *et al.* 2015. *Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods*. 7293–7302.
- Chai, Limin *et al.* 2016. “Chlorogenic Acid Induces Apoptosis to Inhibit Inflammatory Proliferation of IL-6-Induced Fibroblast-like Synoviocytes through Modulating the Activation of JAK/STAT and NF-KB Signaling Pathways.” *Experimental and Therapeutic Medicine* *11*(5): 2054–60.
- Charrier A, Berthaud J. 1987. *Coffee botany, biochemistry and production of beans and beverage*. In: Clifford MN, Willson KC, editors. *Botanical classification of coffee* . (Connecticut, USA): The AVI Publishing Company.
- Chen, Wei Ping, dan Li Dong Wu. 2014. “Chlorogenic Acid Suppresses Interleukin-1 β -Induced Inflammatory Mediators in Human Chondrocytes.” *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* *7*(12): 8797–8801.
- Cheng, Dai *et al.* 2019. “Chlorogenic Acid Protects against Aluminum Toxicity via MAPK/Akt Signaling Pathway in Murine RAW264.7 Macrophages.” *Journal of Inorganic Biochemistry* *190*(29): 113–20.
- Chiang LC, Ng LT, *et al.* 2003. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med* *69* (4).
- Ciptaningsih, Erna. 2012. “Uji Aktivitas Antioksidan Dan Karakteristik Fitokimia Pada Kopi Luwak Arabika Dan Pengaruhnya Terhadap Tekanan Darah Tikus Normal Dan Tikus Hipertensi.” *Skripsi*: Universitas Indonesia;1–128.
- Coico, Richard, and Geoffrey Sunshine. 2015. *Immunology: A Short Course*, John Wiley & Sons, Incorporated, ProQuest Ebook Central.
- Davis AP, *et al.* 2007. Searching for the relatives of *Coffea (rubiaceae, ixoroideae)*: the circumscription and phylogeny of *Coffeae* based on plastid sequence data and morphology. *Am J Bot* *94* (3):313– 29. 2.
- Dewi, I. P. A. (2019). Uji Sitotoksitas Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) Pada Sel Mononuklear Darah Tepi (Pbmc). *Skripsi*: UNEJ.

- Dibert, K., E. Cros, and J. Andrieu. 1989. "Solvent Extraction of Oil and Chlorogenic Acid from Green Coffee. Part II: Kinetic Data." *Journal of Food Engineering* 10(3): 199–214.
- Farah A, *et al.* 2006. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *J Agric Food Chem* 54:374–381.
- Farhan, I. 2013. Uji aktivitas subfraksi dari tumbuhan merican (*Phyllanthus niruri* Linn.) terhadap titer antibody dan jumlah sel leukosit. Skripsi. Fakultas farmas. Universitas ANDALAS Padang.
- Farhaty, Naeli, and Muchtaridi. 2016. "Tinjauan Kimia Dan Aspek Farmakologi Senyawa Asam Klorogenat Pada Biji Kopi." *Farmaka* 14(1): 214–27.
- Fitri, Loeki Enggar *et al.* 2003. "Laporan Kasus Effect Of Combined Therapy Using Chloroquine And Vitamin C To The Peritoneal Macrophage Function In Balb/C Strain Mice Infected By *Plasmodium Berghei*." *Maj.Kedok.Unibraw*. Vol: 19 (1).
- Francisco, Vera *et al.* 2013. "Anti-Inflammatory Activity of *Cymbopogon Citratus* Leaves Infusion via Proteasome and Nuclear Factor-KB Pathway Inhibition: Contribution of Chlorogenic Acid." *Journal of Ethnopharmacology* 148(1): 126–34.
- Gathen, Y. von der *et al.* 2017. "Quantification of Protein and Latex Allergen Content of Various Natural Rubber Latex Products." *Allergologie select* 1(2): 109–19.
- Gu, Sun Mi *et al.* 2018. "Piperlongumine Improves Lipopolysaccharide-Induced Amyloidogenesis by Suppressing NF-KappaB Pathway." *NeuroMolecular Medicine* 20(3): 312–27.
- Han, JanHui, and Islam Md. Monirul. 2012. "Perceived Quality and Attitude Toward Tea & Coffee by Consumers." *International Journal of Business Research and Management* 3(3): 100–112.
- Hanafiah. 2016. "Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi". Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Haniastuti, Tetiana. 2009. "Reducing of Phagocytosis Activity of Mouse Macrophage Cell After." *Dentika Dental Journal* 14(1): 11–14.
- Hariyanti, *et al.* 2015. "Efek Imunomodulator Fraksi Etanol Dari Ekstrak Etanol 70% Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.) Berdasarkan Peningkatan Aktivitas Dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag Peritoneum Mencit Secara In Vitro." *PHARMACY* 12(01): 2014–15.
- Handayani dan Gemi Nastiti. 2010. "Imunomodulator." *AL-FIKR* 14(1): 150–66.

- Handoyo, Pebri. 2017. “Ekstraksi Dan Karakterisasi Green Coffee Extract (GCE) Dari Kopi Robusta Lampung.” Skripsi. *Departemen Teknologi Pertanian: Institut Pertanian Bogor*.
- Hartini, Yustina S R I, *et al.* 2013. “Uji Aktivitas Fagositosis Makrofag Fraksi-Fraksi Dari Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav) Secara In Vitro (Phagocytic Macrophage Activity of Fractions from Methanolic Leaf Extract of Red Betel (*Piper Crocatum* Ruiz & Pav .) In.” *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 11(2): 108–15.
- Hasanah, Uswatul, *et al.* 2015. “Analisis Pertumbuhan Mencit (*Mus Musculus* L.) ICR Dari Hasil Perkawinan Inbreeding Dengan Pemberian Pakan AD1 Dan AD2.” Prosiding Seminar nasional Mikrobiologi Kesehatan dan Lingkungan 1(1): 140–45.
- Hicks, Greg, and Zongchao Jia. 2018. “Structural Basis for the Lipopolysaccharide Export Activity of the Bacterial Lipopolysaccharide Transport System.” *International Journal of Molecular Sciences* 19(9).
- Hwang, Ji Hyun, *et al.* 2016. “Caffeine Prevents LPS-Induced Inflammatory Responses in RAW264.7 Cells and Zebrafish.” *Chemico-Biological Interactions* 248: 1–7.
- Hwang, Su Jung, *et al.* 2014. “Anti-Inflammatory Effects of Chlorogenic Acid in Lipopolysaccharide- Stimulated RAW 264.7 Cells.” *Inflammation Research* 63(1): 81–90.
- International Coffee Organization. 2017. *Total Production by Exporting Countries*. http://www.ico.org/trade_statistics.asp. [2 November 2019].
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 2019. Taxonomi Hierarchy. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_ch. Diakses pada tanggal 1 Januari 2019.
- Isnindar, S, *et al.* 2017. “Aktivitas Antioksidan Buah Kopi Hijau Merapi.” *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research* Vol 2: 130–36.
- Isnindar, *et al.* 2016. “Optimization Method of Caffeine Isolation of Merapi Green Coffee Beans.” *International Journal of PharmTech Research* 9(5): 255–59.
- Kahn, Steven L, *et al.* 2016. “Natural Rubber Latex Allergy.” *Disease-a-Month* 62(1): 5–17.
- Kartika, D. A. 2016. *Pengaruh Ekstrak Biji Kopi Robusta Terhadap Daya Fagositosis Sel Monosit Yang Dipapar Candida albicans*. Skripsi: Universitas Negeri Jember.

- Khojah, Ebtihal Y. 2016. "Effect of Arabic and Green Coffee Beans on Lowering Lipid Profile Parameters in Male Rats." *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 10(December): 310–17.
- Kim, Sang Hun *et al.* 2017. "Chlorogenic Acid Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide and Interleukin-1 β Expression by Inhibiting JAK2/STAT3 Activation in RAW264.7 Cells." *Molecular Medicine Reports* 16(6): 9224–32.
- Kresno, Siti Boedina. 2010. *Imunologi: diagnosa dan prosedur laboratorium edisi kelima*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kumar S, *et al.* 2011. A review on immunostimulatory plants. *Journal of Chinese Interactive Medicine*; 9(2): 117.
- Kwak, Han Sub *et al.* 2016. "Antioxidant Activity and Total Polyphenol Content of Coffee Extracted by Three Extraction Methods." *Agro FOOD Industry Hi Tech* 27(1): 15–18.
- Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an. 2016. *Tafsir ringkas al-qur'an al-karim (jilid 2)*. Jakarta: Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an RI.
- Le Saux, N. (2012). Biologic response modifiers to decrease inflammation: Focus on infection risks. *Paediatrics and Child Health*, 17(3), 147–150.
- Liang, Ningjian, and David Kitts. 2018. "Chlorogenic Acid (CGA) Isomers Alleviate Interleukin 8 (IL-8) Production in Caco-2 Cells by Decreasing Phosphorylation of P38 and Increasing Cell Integrity." *International Journal of Molecular Sciences* 19(12): 3873.
- Liang, Ningjian, and David D. Kitts. 2015. "Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions." *Nutrients* 8(1): 1–20.
- Lu, Yin *et al.* 2007. "Immunomodulatory Activity of Aqueous Extract of *Actinidia Macrocarpa*." *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16(SUPPL.1): 261–65.
- Makiyah, A., *et al.* (2016). Efek Immunostimulasi Ekstrak Etanol Umbi Iles-iles Terhadap Aktivitas Fagositosis Sel Makrofag pada Tikus Putih Strain Wistar yang Diinokulasi *Staphylococcus aureus*. *Majalah Kedokteran Bandung*, 48(2), 68–77. <https://doi.org/10.15395/mkb.v48n2.759>
- McWhorter, F. Y., *et al.* 2013. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17253–17258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308887110>

- Meiliana, Anna, and Andi Wijaya. 2013. "Macrophage Polarization in Metabolism and Metabolic Disease." *The Indonesian Biomedical Journal* 5(2): 81–90.
- Melok, Tin H, *et al.* 2005. "Peran Vitamin C Terhadap Fagositosis Makrofag Terhadap *C. Albicans*." *Berkala Ilmu Kedokteran* 37(2): 62–67.
- Mohan, Manda Ram *et al.* 2019. "Indian Medicinal Plants Used as Immunomodulatory Agents: A Review." 13(4): 2–6.
- Mumin MA, *et al.* 2006. Determination and characterization of caffeine in tea coffee and soft drink by solid phase extraction and HPLC, Malaysian. *J. Chem.*, 8(1): 045- 051.
- Murthy PS, Naidu MM. 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition. *J. review. Resour Conserv Recycl* 66: 45– 58.
- Mustafiah, Siti Eva, Dina Fatmawati, and Iwang Yusuf. 2011. "Indeks Daya Fagosit Makrofag Peritoneum Setelah Pemberian Propolis Pada Mencit (*Mus musculus*)". 3(2): 121–28.
- Nagoba, Basavraj, and Milind Davane. 2018. "Natural Immunomodulators." *Journal of Immunology and Microbiology* 2(1): 3–4.
- Naidu, M Madhava, *et al.* 2008. "Studies on Extraction and Antioxidant Potential of Green Coffee CGA Content Total Phenolic Content." *Food Chemistry* 107: 377–84.
- Naveed, Muhammad *et al.* 2018. "Chlorogenic Acid (CGA): A Pharmacological Review and Call for Further Research." *Biomedicine and Pharmacotherapy* 97(October 2017): 67–74.
- Nurkhasanah, R. D. Santoso, and R. Fauziah. 2017. "The Immunomodulatory Effect of Zingiber Cassumunar Ethanolic Extract on Phagocytic Activity, Nitrit Oxide and Reaxtive Oxygen Intermediate Secretions of Macrophage in Mice." *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 259(1): 07.
- Ochiai, Ryuji *et al.* 2004. "Green Coffee Bean Extract Improves Human Vasoreactivity." *Hypertens. Res.* 27(10): 731–37.
- Oestreich-Janzen, S. 2010. "Vol3_Chemistry_of_Coffee_lr.Pdf." *Chemistry of Coffee*: 1085–96.
- Onakpoya I, *et al.* 2011. The use of green coffee extract as a weight loss supplement: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *Gastroenterology Research and Practice*. 1-7.

- Patriche S, *et al.* 2015. Extraction and evaluation of bioactive compounds with antioxidant potential from green arabica coffee extract. *Journal of Food Technology*. 39(2): 88-95.
- Panggabean, E. 2011. “*Buku Pintar Kopi*”. Jakarta: AgroMedia Pustaka.
- Pavlou, S., *et al.* (2017). Higher phagocytic activity of thioglycollate-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, 14(1).
- Percival Mark., 1998. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insight*. 31: 1-4.
- Puspitaningrum, Ika, Lia Kusmita, and Yuvianti Dwi Franyoto. 2017. “Aktivitas Imunomodulator Fraksi Etil Asetat Daun Som Jawa (*Talinum triangulare* (Jacq.) Willd) Terhadap Respon Imun Spesifik.”. *PHARMASI SEMARAG* 15(2): 24–29.
- Ponkshe CA dan Indap MM. 2002. In vivo and in vitro evaluation for immunomodulatory activity of three marine animal extracts with reference to phagocytosis. *Indian Journal of Experimental Biology*. 40:1399- 400.
- Preedy, V. R. (Ed.). 2014. *Coffee in health and disease prevention*. USA : Academic Press is an imprint of Elsevier. Retrieved from <https://search.proquest.com>
- Quthb, Sayyid.. 2016. *TAFSIR FI ZILALIL QUR'AN*. Jakarta: Darusy-Syuruq, Beirut.
- Ramadiana, Sri, *et al.* 2018. “Morphological Variation Among Fifteen Superior Robusta Coffee Clones in Lampung Province, Indonesia.” *Biodiversitas* 19(4): 1475–81.
- Ramalakshmi, K., I. R. Kubra, and L. J M Rao. 2007. “Physicochemical Characteristics of Green Coffee: Comparison of Graded and Defective Beans.” *Journal of Food Science* 72(5).
- Rauf, A., Haeria, & Anas, D. D. (2016). Efek Imunostimulator Fraksi Daun Katuk (*Sauropus androgynus* L. MEER.) Terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag Pada Mencit Jantan (*Mus musculus*). *JF FIK UINAM*, 4(1), 3345–3356.
- Rosales, C., & Uribe-Querol, E. 2017. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. In *BioMed Research International* (Vol. 2017). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>
- Rosnizar, R., *et al.* 2017. The potential of flamboyan leaf extract against the increasing activity and capacity of macrofag. *BIOLEUSER*, 1(3), 104–115.

- Safri, S. F. 2018. *Pengaruh Aneka Sajian Minuman Kopi Robusta Terhadap Aktivitas Dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag Peritonium Mencit Yang Diinduksi Bacillus Cereus*. Skripsi: Universitas Negeri Jember.
- Sangi, M., et al. 2008. Analisa Fitokimia Tumbuhan Obat Di Minahasa Utara. *Chem. Prog.* 1(1): 47-53.
- Santoso, Tresna Asih, et al. 2013. “Efek Imunostimulator Ekstrak Etanol (*Sauropus androgynus* L.Mer) Terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag.” *PHARMACY* 10(01): 55–60.
- Sari, I. N. 2016. Aktivitas Imunostimulan Ekstrak Buah Bakau Hitam (*Rhizophora mucronata*) Secara *In Vivo* Pada Tikus (*Rattus Norvegicus*) Intan Nabilla Sari. In *Skripsi*. IPB.
- Sentkowska, Aleksandra, et al. 2016. “Comparative Studies on the Antioxidant Properties of Different Green Coffee Extracts.” *MOJ Food Processing & Technology* 3(2): 296–302.
- Shan, Jianhua et al. 2009. “Chlorogenic Acid Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in RAW264.7 Cells through Suppressing NF-KB and JNK/AP-1 Activation.” *International Immunopharmacology* 9(9): 1042–48.
- Shihab, Quraish. 2009. *Tafsir al-misbah. Pesan, kesan dan keserasian al-qur'an volume 13*. Jakarta: Lentera Hati.
- Singh Chauhan, Prashant et al. 2011. “Amelioration of Inflammatory Responses by Chlorogenic Acid via Suppression of Pro-Inflammatory Mediators.” *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01(2011): 67–75.
- Shin, Hee Soon et al. 2015. “Anti-Inflammatory Effect of Chlorogenic Acid on the IL-8 Production in Caco-2 Cells and the Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis Symptoms in C57BL/6 Mice.” *Food Chemistry* 168. (February 2015): 167–75.
- Siregar, Silvia V. 2008. “Produksi, Konsumsi, Harga Dan Ekspor Kopi Indonesia Ke Negara Tujuan Ekspor Utama Di Asia, Amerika Dan Eropa.”. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor.
- Sukma, P. V. (2018). Aktivitas Antioksidan Seduhan Bubuk Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) Terhadap Produksi Radikal Superoksida Monosit *In Vitro*. *Skripsi*: UNEJ.
- Sunarno, R. N. 2009. *Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ketepeng Cina (Cassia Alata L.) Terhadap Jumlah Leukosit Dan Titer Antibodi Mencit (Mus Musculus) Yang Diinfeksi Salmonella Typhimurium*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.

- Sunitha, V S, *et al.* 2015. "Immunomodulatory Activity of *Caesalpinia Sappan* L . Extracts on Peritoneal Macrophage of Albino Mice ." *International Journal of Science and Research* 4(12): 2013–16.
- Susanti, Erna, *et al.* 2015. "Karakterisasi Kultur Makrofag Hasil Isolasi Mouse Peritoneum Makrofag (MPM)." *El-Hayah* 5(3): 103–9.
- Susanti, R, A Yuniastuti, and R S Iswari. 2012. "Aktivitas Reactive Oxygen Species Makrofag Akibat Stimulasi Gel Lidah Buaya Pada Infeksi *Salmonella Typhimurium*." *jurnal MIPA* 35(1): 1–10.
- Syarah, F. (2019). Seduhan Kopi Robusta Spray Drying Meningkatkan Viabilitas Monosit Yang Dipapar *Streptococcus* Mutans Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Universitas Negeri Jember.
- Tjahajati, Ida, *et al.* 2007. "Vaksinasi BCG Meningkatkan Aktivitas Makrofag Dalam Sekresi Reactive Oxygen Intermediate (ROI) Pada Anjing Yang Diinfeksi *Mycobacterium Tuberculosis*." *Media Kedokteran Hewan* 23(3): 173–78.
- Ukers WH. 2012. All about coffee. In: The tea and coffee trade journal. (New York, USA): The Tea and Coffee Trade Journal Company 1922. 3.
- Vandhani, Via. 2011. "RPMI-1640." *HiMedia Cell Culture*: 1–3.
- Wang, Changqi *et al.* 2013. "Characterization of Murine Macrophages from Bone Marrow, Spleen and Peritoneum." *BMC Immunology* 14(1): 1.
- Wang, Kai, *et al.* 2018. "Natural Products as Targeted Modulators of the Immune System." *Journal of Immunology Research* 2018: 1–2.
- Widayati, P. (2008). Efek Ekstrak Etanol Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) Terhadap PENurunan Kadar Asam Urat Mencit Putih Jahat Galur BALB-C Hiperurisemia. *Skripsi*. Universitas Muhammdiyah Surakarta.
- Wijaya, Willy, *et al.* 2017. "Antibacterial Ability of Arabica (*Coffea Arabica*) and Robusta (*Coffea Canephora*) Coffee Extract on *Lactobacillus Acidophilus*." *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)* 49(2): 99.
- Wu, Chongming *et al.* 2014. "Chlorogenic Acid Protects Against Atherosclerosis in ApoE^{-/-}Mice and Promotes Cholesterol Efflux from RAW264.7 Macrophages." *PLoS ONE* 9(9): 1–9.
- Xu, Qingsong, *et al.* 2017. "The Inhibition of LPS-Induced Inflammation in RAW264.7 Macrophages via the PI3K/Akt Pathway by Highly N-Acetylated Chitooligosaccharide." *Carbohydrate Polymers* 174: 1138–43.
- YS Bintari, *et al.* 2010. "Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanolik Rimpang Jahe Merah Terhadap Fagositosis Makrofag Pada Mencit Jantan Yang Diinfeksi

Dengan *Listeria Monocytogenes*.” *Majalah Obat Tradisional* 15(2): 80–88.

Zaimeche, Salah. 2004. “The Coffee Trail : A Muslim Beverage Exported to the West.” *Fondation for Science Tecnology and Civilisation* 4042: 2–10.

Zhang, Xia, *et al.* 2008. “The Isolation and Characterization of Murine Macrophages.” *Current Protocols in Immunology* (SUPPL. 83): 1–14.



LAMPIRAN

Lampiran 1.1 Hasil Perhitungan PF dan KF Makrofag

a. Perlakuan P0 (0 µg/ml)

No	ULANGAN 1			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktiv	
1	Gambar 1	24	9	
2	Gambar 2	26	12	
3	Gambar 3	29	10	
4	Gambar 4	20	7	
5	Gambar 5	30	11	
6	Gambar 6	39	17	
7	Gambar 7	32	19	
TOTAL		200 sel	79	115 lateks/ml
%			39,5%	

No	ULANGAN 2			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktiv	
1	Gambar 1	30	11	
2	Gambar 2	31	15	
3	Gambar 3	34	20	
4	Gambar 4	24	13	
5	Gambar 5	25	10	
6	Gambar 6	18	7	
7	Gambar 7	19	11	
8	Gambar 8	20	7	
TOTAL		200 sel	95	171 lateks/ml
%			47,5%	

No	ULANGAN 3			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktiv	
1	Gambar 1	27	16	
2	Gambar 2	21	12	
3	Gambar 3	19	9	
4	Gambar 4	27	10	
5	Gambar 5	10	3	
6	Gambar 6	10	6	

7	Gambar 7	12	8	
8	Gambar 8	18	6	
9	Gambar 9	12	7	
10	Gambar 10	26	11	
11	Gambar 11	18	5	
TOTAL		200 sel	93	
%			46,5%	

No	ULANGAN 4			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktiv	
1	Gambar 1	27	8	
2	Gambar 2	20	6	
3	Gambar 3	22	12	
4	Gambar 4	21	10	
5	Gambar 5	25	10	
6	Gambar 6	25	14	
7	Gambar 7	16	10	
8	Gambar 8	21	11	
9	Gambar 9	23	11	
TOTAL		200 sel	92	144 lateks/ml
%			46%	

No	ULANGAN 5			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktiv	
1	Gambar 1	17	12	
2	Gambar 2	25	13	
3	Gambar 3	21	13	
4	Gambar 4	17	8	
5	Gambar 5	17	12	
6	Gambar 6	26	12	
7	Gambar 7	18	9	
8	Gambar 8	14	8	
9	Gambar 9	17	7	
10	Gambar 10	18	9	
11	Gambar 11	10	5	
TOTAL		200 sel	97	201 lateks/ml
%			48,5%	

b. Perlakuan P1 (25 μ g/ml)

No	ULANGAN 1			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	41	14	
2	Gambar 2	22	11	
3	Gambar 3	40	15	
4	Gambar 4	22	6	
5	Gambar 5	23	9	
6	Gambar 6	21	9	
7	Gambar 7	26	8	
8	Gambar 8	10	8	
TOTAL		200 sel	80	125 lateks/ml
%			40%	

No	ULANGAN 2			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	23	13	
2	Gambar 2	21	10	
3	Gambar 3	19	9	
4	Gambar 4	17	8	
5	Gambar 5	13	10	
6	Gambar 6	13	5	
7	Gambar 7	14	8	
8	Gambar 8	8	4	
9	Gambar 9	11	4	
10	Gambar 10	4	2	
11	Gambar 11	6	3	
12	Gambar 12	9	4	
13	Gambar 13	16	8	
14	Gambar 14	14	5	
15	Gambar 15	22	11	
16	Gambar 16	3	3	
TOTAL		200 sel	107	183 lateks/ml
%			53,5%	

No	ULANGAN 3			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	23	14	
2	Gambar 2	10	7	

3	Gambar 3	15	7		
4	Gambar 4	17	10		
5	Gambar 5	30	15		
6	Gambar 6	24	9		
7	Gambar 7	25	14		
8	Gambar 8	14	10		
9	Gambar 9	9	3		
10	Gambar 10	18	7		
11	Gambar 11	15	7		
TOTAL		200 sel	103		154 lateks/ml
%			51,5%		

No	ULANGAN 4			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	10	4	
2	Gambar 2	14	8	
3	Gambar 3	15	11	
4	Gambar 4	18	8	
5	Gambar 5	18	7	
6	Gambar 6	21	13	
7	Gambar 7	13	9	
8	Gambar 8	28	15	
9	Gambar 9	14	8	
10	Gambar 10	22	5	
11	Gambar 11	7	4	
TOTAL		200 sel	91	139 lateks/ml
%			45,5%	

No	ULANGAN 5			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	21	5	
2	Gambar 2	28	17	
3	Gambar 3	20	10	
4	Gambar 4	20	9	
5	Gambar 5	20	12	
6	Gambar 6	17	10	
7	Gambar 7	15	9	
8	Gambar 8	29	17	
9	Gambar 9	30	14	
TOTAL		200 sel	103	157 lateks/ml
%			51,5%	

c. Perlakuan P2 (50 µg/ml)

No	ULANGAN 1			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktiv	
1	Gambar 1	24	7	
2	Gambar 2	17	7	
3	Gambar 3	20	12	
4	Gambar 4	9	15	
5	Gambar 5	21	14	
6	Gambar 6	26	18	
7	Gambar 7	17	9	
8	Gambar 8	17	10	
9	Gambar 9	13	4	
10	Gambar 10	20	5	
11	Gambar 11	16	13	
TOTAL		200 sel	114	193 lateks/ml
%			57%	

No	ULANGAN 2			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktiv	
1	Gambar 1	18	11	
2	Gambar 2	16	11	
3	Gambar 3	24	14	
4	Gambar 4	20	10	
5	Gambar 5	25	14	
6	Gambar 6	13	11	
7	Gambar 7	17	11	
8	Gambar 8	18	8	
9	Gambar 9	14	10	
10	Gambar 10	7	6	
11	Gambar 11	12	8	
12	Gambar 12	16	12	
TOTAL		200 sel	130	218 lateks/ml
%			65%	

No	ULANGAN 3			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktiv	
1	Gambar 1	19	9	
2	Gambar 2	33	17	
3	Gambar 3	18	14	

4	Gambar 4	10	7	
5	Gambar 5	5	3	
6	Gambar 6	16	13	
7	Gambar 7	18	14	
8	Gambar 8	15	11	
9	Gambar 9	9	7	
10	Gambar 10	28	18	
11	Gambar 11	30	21	
TOTAL		200 sel	134	257 lateks/ml
%			67%	

No	ULANGAN 4			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	30	17	
2	Gambar 2	6	3	
3	Gambar 3	22	14	
4	Gambar 4	14	9	
5	Gambar 5	15	10	
6	Gambar 6	18	13	
7	Gambar 7	20	14	
8	Gambar 8	21	11	
9	Gambar 9	26	17	
10	Gambar 10	28	18	
TOTAL		200 sel	126	162 lateks/ml
%			63%	

No	ULANGAN 5			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	36	17	
2	Gambar 2	30	18	
3	Gambar 3	17	7	
4	Gambar 4	18	13	
5	Gambar 5	16	11	
6	Gambar 6	26	14	
7	Gambar 7	13	9	
8	Gambar 8	19	10	
9	Gambar 9	27	14	
TOTAL		200 sel	113	203 lateks/ml
%			56,5%	

d. Perlakuan P3 (75 µg/ml)

No	ULANGAN 1			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	36	22	
2	Gambar 2	34	15	
3	Gambar 3	33	20	
4	Gambar 4	30	16	
5	Gambar 5	32	19	
6	Gambar 6	35	16	
TOTAL		200 sel	118	177 lateks/ml
%			59%	

No	ULANGAN 2			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	35	17	
2	Gambar 2	40	26	
3	Gambar 3	33	19	
4	Gambar 4	27	15	
5	Gambar 5	32	21	
6	Gambar 6	33	13	
TOTAL		200 sel	111	195 lateks/ml
%			55,5%	

No	ULANGAN 3			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	39	24	
2	Gambar 2	40	25	
3	Gambar 3	55	25	
4	Gambar 4	40	18	
5	Gambar 5	26	14	
TOTAL		200 sel	106	173 lateks/ml
%			53%	

No	ULANGAN 4			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	18	10	
2	Gambar 2	25	13	

3	Gambar 3	44	24	
4	Gambar 4	26	13	
5	Gambar 5	34	20	
6	Gambar 6	40	20	
7	Gambar 7	17	6	
TOTAL		200 sel	106	
%			53%	

No	ULANGAN 5			
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktiv	Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
1	Gambar 1	19	10	
2	Gambar 2	41	21	
3	Gambar 3	29	15	
4	Gambar 4	28	16	
5	Gambar 5	34	20	
6	Gambar 6	31	14	
7	Gambar 7	18	9	
TOTAL		200 sel	105	200 lateks/ml
%			52,5%	

e. Perlakuan Kontrol + (Produks X-Modulator)

No	ULANGAN 1			
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktiv	Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
1	Gambar 1	17	6	
2	Gambar 2	16	9	
3	Gambar 3	20	7	
4	Gambar 4	21	11	
5	Gambar 5	28	20	
6	Gambar 6	53	23	
7	Gambar 7	36	19	
8	Gambar 8	9	6	
TOTAL		200 sel	101	150 lateks/ml
%			50,5%	

No	ULANGAN 2			
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktiv	Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
1	Gambar 1	28	13	
2	Gambar 2	14	8	
3	Gambar 3	10	7	

4	Gambar 4	12	6		
5	Gambar 5	13	7		
6	Gambar 6	18	9		
7	Gambar 7	12	9		
8	Gambar 8	14	8		
9	Gambar 9	10	3		
10	Gambar 10	6	5		
11	Gambar 11	11	7		
12	Gambar 12	13	6		
13	Gambar 13	17	9		
14	Gambar 14	22	13		
TOTAL		200 sel	110		223 lateks/ml
%			55%		

No	ULANGAN 3			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	20	14	
2	Gambar 2	16	6	
3	Gambar 3	14	9	
4	Gambar 4	25	15	
5	Gambar 5	20	14	
6	Gambar 6	27	16	
7	Gambar 7	20	8	
8	Gambar 8	14	8	
9	Gambar 9	26	13	
10	Gambar 10	18	11	
TOTAL		200 sel	114	212 lateks/ml
%			57%	

No	ULANGAN 4			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	21	15	
2	Gambar 2	36	27	
3	Gambar 3	38	19	
4	Gambar 4	43	23	
5	Gambar 5	46	21	
6	Gambar 6	16	13	
TOTAL		200 sel	118	214 lateks/ml
%			59%	

No	ULANGAN 5			Σ Lateks Yang Difagositosis 50 sel makrofag
	Gambar Ke-	Jumlah Sel Makrofag	Sel Makrofag Yang Aktif	
1	Gambar 1	39	24	
2	Gambar 2	40	25	
3	Gambar 3	55	25	
4	Gambar 4	40	18	
5	Gambar 5	26	14	
TOTAL		200 sel	106	173 lateks/ml
%			53%	

Lampiran 2 Hasil Uji Statistika PF dan KF Makrofag Peritoneal

Lampiran 2.1 Hasil Uji Statistika PF

Perlakuan	Persentase Fagositosis (%)					Mean \pm SD
	1	2	3	4	5	
P0 25 μ g/mL	39.5	47.5	46.5	46	48.5	45.6 \pm 3.543
Kontrol (+)	50.5	55	57	59	53	54.9 \pm 3.324
P1 25 μ g/mL	40	53.5	51.5	45.5	51.5	48.4 \pm 5.572
P2 50 μ g/mL	57	65	67	63	56.5	61.7 \pm 4.738
P3 75 μ g/mL	59	55.5	53	53	52.5	54.6 \pm 2.725

- Faktor Koreksi (FK)= 70331.04
- Jumlah Kuadrat Total (JKT)= 1126.960
- Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)= 788.860
- Jumlah Kuadrat Galat (JKG) = 338.100
- Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP) = 197.215
- Kuadrat Tengah Galat (KTG) = 16.905
- F hitung = KTP/KTG = 11.666
- Tabel Ansir ANOVA

SK	Db	JK	KT	F Hitung	F Tabel (5%)
Perlakuan	4	788.860	197.215	11.666	2.776
Galat	20	338.100	16.905		
Total	24	1126.960			

Nilai KK= $\sqrt{KTG/ \bar{Y}}$ (rata-rata dari rata-rata) X 100% = 7.7518%

Lampiran 2.2 Hasil Uji Statistika KF

Perlakuan	Kapasitas Fagositosis 50 Sel Makrofag yang Aktif (lateks/ml)					Mean±SD
	1	2	3	4	5	
P0	115	171	184	144	201	163±33.963
Kontrol (+)	150	223	212	214	173	194.4±31.389
P1	125	183	154	139	157	151.6±21.721
P2	193	218	252	162	203	205.6±33.063
P3	177	195	173	195	200	188±12.124

Hasil Uji Statistika

- Faktor Koreksi (FK) = 814686.76
- Jumlah Kuadrat Total (JKT) = 25508.240
- Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP) = 10104.640
- Jumlah Kuadrat Galat (JKG) = 15403.600
- Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP) = 2526.160
- Kuadrat Tengah Galat (KTG) = 770.180
- F hitung = $KTP/KTG = 3.280$
- Tabel Ansir ANOVA

SK	Db	JK	KT	F Hitung	F Tabel (5%)
Perlakuan	4	10104.64	2526.160	3.280*	2.776
Galat	20	15403.40	770.180		
Total	24	25508.24			

- Nilai KK = $\sqrt{KTG/ Y}$ (rata-rata dari rata-rata) X 100%
= 15.3734306%

Lampiran 3 Hasil SPSS Uji Normalitas PF dan KF Makrofag Peritoneal

Lampiran 3.1 Uji Normalitas PF

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		PF
N		25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	53.0400
	Std. Deviation	6.85249
Most Extreme Differences	Absolute	.091
	Positive	.082
	Negative	-.091
Test Statistic		.091

Asymp. Sig. (2-tailed)	.200 ^{c,d}
------------------------	---------------------

- Test distribution is Normal.
- Calculated from data.
- Lilliefors Significance Correction.
- This is a lower bound of the true significance.

Lampiran 3.1 Uji Normalitas KF

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		KF
N		25
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	180.52
	Std. Deviation	32.601
Most Extreme Differences	Absolute	.089
	Positive	.056
	Negative	-.089
Test Statistic		.089
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}

- Test distribution is Normal.
- Calculated from data.
- Lilliefors Significance Correction.
- This is a lower bound of the true significance.

Lampiran 4 Hasil SPSS Uji Homogenitas PF dan KF Makrofag Peritoneal

Lampiran 4.1 Hasil SPSS Uji Homogenitas PF

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
PF	Based on Mean	1.525	4	20	.233
	Based on Median	.456	4	20	.767
	Based on Median and with adjusted df	.456	4	12.959	.767
	Based on trimmed mean	1.458	4	20	.252

Lampiran 4.2 Hasil SPSS Uji Homogenitas KF

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
KF	Based on Mean	1.363	4	20	.282
	Based on Median	.603	4	20	.665
	Based on Median and with adjusted df	.603	4	15.086	.666

Based on trimmed mean	1.312	4	20	.299
-----------------------	-------	---	----	------

Lampiran 5 Hasil SPSS Uji One-Way ANOVA PF dan KF Makrofag Peritoneal

Lampiran 5.1 Hasil SPSS Uji One-Way ANOVA PF

Oneway

ANOVA

PF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	788.860	4	197.215	11.666	.000
Within Groups	338.100	20	16.905		
Total	1126.960	24			

Lampiran 5.2 Hasil SPSS Uji One-Way ANOVA KF

Oneway

ANOVA

KF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10104.640	4	2526.160	3.280	.032
Within Groups	15403.600	20	770.180		
Total	25508.240	24			

Lampiran 6 Hasil SPSS Uji Lanjut PF dan KF Makrofag Peritoneal

Lampiran 6.1 Hasil SPSS Uji Lanjut BNT PF

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PF

	(I)	(J)	Mean		Sig.	99% Confidence Interval	
			Difference (I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
LSD	Normal	K+	-9.30000*	2.60038	.002	-16.6990	-1.9010
		P1	-2.80000	2.60038	.294	-10.1990	4.5990
		P2	-16.10000*	2.60038	.000	-23.4990	-8.7010
		P3	-9.00000*	2.60038	.002	-16.3990	-1.6010
	K+	Normal	9.30000*	2.60038	.002	1.9010	16.6990

P1	P1	6.50000	2.60038	.021	-.8990	13.8990
	P2	-6.80000	2.60038	.017	-14.1990	.5990
	P3	.30000	2.60038	.909	-7.0990	7.6990
	Normal	2.80000	2.60038	.294	-4.5990	10.1990
	K+	-6.50000	2.60038	.021	-13.8990	.8990
	P2	-13.30000*	2.60038	.000	-20.6990	-5.9010
P2	P3	-6.20000	2.60038	.027	-13.5990	1.1990
	Normal	16.10000*	2.60038	.000	8.7010	23.4990
	K+	6.80000	2.60038	.017	-.5990	14.1990
	P1	13.30000*	2.60038	.000	5.9010	20.6990
P3	P3	7.10000	2.60038	.013	-.2990	14.4990
	Normal	9.00000*	2.60038	.002	1.6010	16.3990
	K+	-.30000	2.60038	.909	-7.6990	7.0990
	P1	6.20000	2.60038	.027	-1.1990	13.5990
	P2	-7.10000	2.60038	.013	-14.4990	.2990

*. The mean difference is significant at the 0.05 level

Lampiran 6.2 Hasil SPSS Uji Lanjut Duncan KF

Post Hoc Tests Homogeneous Subsets

		KF			
		Subset for alpha = 0.05			
	Perlakuan	N	1	2	3
Tukey B ^a	P1	5	151.60		
	Normal	5	163.00	163.00	
	P3	5	188.00	188.00	
	K+	5	194.40	194.40	
	P2	5		205.60	
	Duncan ^a	P1	5	151.60	
	Normal	5	163.00	163.00	
	P3	5	188.00	188.00	188.00
	K+	5		194.40	194.40
	P2	5			205.60
	Sig.		.062	.105	.355



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

Form Checklist Plagiasi

Nama : Habilei
NIM : 15620001
Judul : Efek Immunomodulator Ekstrak Kopi Hijau Robusta Terhadap
Aktivitas fagositosis Makrofag Peritoneal Mencit secara
In - Vitro

No	Tim Checkplagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si	22 %	

Mengetahui
Ketua Program Studi
Biologi

Evika Sandi Savitri, M. P
19741018 200312 2 002



BUKTI KONSULTASI AGAMA SKRIPSI

Nama : Habibi
NIM : 15620081
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil / Genap TA. 2020/2021
Pembimbing : Kholifah Holil. M.Si
Judul Skripsi : **EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK KOPI HIJAU ROBUSTA TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PERITONEAL MENCIT SECARA IN VITRO**

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	10 September 19	konsultasi Integrasi Literatur Beledug	
2.	21 November 19	konsultasi Integrasi Literatur Beledug	
2.	10 Des. 2019	konsultasi Integrasi Bab 2	
4.	15 April 2020	konsultasi Integrasi bab I & 2	
5.	17 April 2020	konsultasi Integrasi bab I & 2	
6.	23 Nov 2020	konsultasi Bab IV Integrasi	
7.	25 Nov 2020	konsultasi Hasil & pembahasan	
8.	27 Nov 2020	konsultasi Hasil & pembahasan	
9.			
10.			
11.			

Pembimbing Skripsi,

Mujahidin Ahmad, M.Sc.
NIP. 19860512 201903 1 002

Malang, 03 Desember 2020
Ketua Program studi Biologi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP 197410182003122002



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp/ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Habibi
NIM : 15620081
Program Studi : S1 Biologi
Semester : Ganjil / Genap TA. 2020/2021
Pembimbing : Kholifah Holil. M.Si
Judul Skripsi : EFEK IMUNOMODULATOR EKSTRAK KOPI HIJAU ROBUSTA TERHADAP AKTIVITAS FAGOSITOSIS MAKROFAG PERITONEAL MENCIT SECARA IN VITRO

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	8 September 2019	konsultasi menentukan judul & L.B	/
2.	21 Nov - 2019	penulisan LB Bab I	/
3.	10 Desember 2019	penulisan Bab I, Rumusan masalah..	/
4.	19. Januari 2020	penulisan Bab II	/
5.	9 Februari 2020	penulisan Bab II	/
6.	29 Februari 2020	penulisan Bab II	/
7.	26 Februari 2020	penulisan Bab II.	/
8.	10 Maret 2020	penulisan Bab III	/
9.	23 Juli 2020	penulisan Bab III	/
10.	12 September 2020	penulisan pembahasan Bab IV - par 1	/
11.	18 September 2020	penulisan pembahasan Bab IV par 2	/
12.	20 Sept -2020	penulisan pembahasan Bab IV par 3	/
13.	5 Oktober 2020	penulisan pembahasan Bab IV Par-1	/
14.	15 Nov -2020	penulisan pembahasan parameter -2.	/
15.	16 Nov -2020	penulisan pembahasan parameter -2.	/
16.	1 Desember 2020	penulisan Bab IV, Abstrak, Bab V	/

Pembimbing Skripsi,

Kholifah Holil, M.Si
NIP. 19751106 200912 2 002

Malang, 03 Desember 2020
Ketua Program Studi Biologi,

Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
NIP 19741018 200312 2 002