

**PENGARUH PEMBERIAN KRIM KOSMETIK KOPI TERHADAP
KAPASITAS TOTAL KADAR *SUPEROXIDE DISMUTASE* (SOD)
DAN JUMLAH KOLAGEN (TIPE I DAN III) PADA PROSES
PENUAAN KULIT WISTAR BETINA**

TESIS

Untuk memenuhi persyaratan mencapai derajat Sarjana S-2

Magister Ilmu Biomedik



Arief Mukti Mindiroeseno

MBK 1913010146

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG
SEMARANG
2021**

TESIS

**EFEKTIVITAS PEMBERIAN KRIM KOSMETIK KOPI TERHADAP
KAPASITAS TOTAL KADAR *SUPEROXIDE DISMUTASE* (SOD)
DAN JUMLAH KOLAGEN (TIPE I DAN III) PADA PROSES
PENUAAN KULIT WISTAR BETINA**

Disusun oleh

Arief Mukti Mindiroeseno

MBK.1913010146



Menyetujui,

Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. dr. Hj. Chodidjah, M.kes

Dr. Ir.Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes

Mengetahui,
a.n. Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Sekretaris Prodi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung



Dr. Ir.Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Arief Mukti Mindiroeseno
Tempat/Tanggal Lahir : Surakarta, 03 Maret 1984
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-Laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Ngringo 9 Karanganyar : Lulus tahun 1995
2. SMP Muhammadiyah 1 Surakarta : Lulus tahun 1998
3. SMA Muhammadiyah 3 Surakarta : Lulus tahun 2001
4. FKM UNIVET SUKOHARJO : Lulus tahun 2017
5. Magister Ilmu Biomedik FK UNISSULA : 2019-Sekarang

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang Tua
Ayah : H. Paimin Djantono
Ibu : Hj. Rodiah, S.ST, M.Kes



KATA PENGANTAR

Puji syukur Allah SWT yang telah memberikan rahmat, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Tesis dengan judul “Efektivitas Pemberian Krim Kosmetik Kopi terhadap Kapasitas Total Kadar *Superoxide Dismutase* (SOD) dan Jumlah Kolagen (Tipe I dan III) pada Proses Penuaan Kulit Wistar Betina”. Tesis ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Tesis ini dapat diselesaikan atas bimbingan, arahan, dan bantuan dari berbagai pihak, untuk itu penulis mengucapkan terimakasih dengan ketulusan serta rasa hormat kepada:

1. Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H, Sp.F selaku Dekan Fakultas Kedokteran UNISSULA yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan di program studi Magister Ilmu Biomedik.
2. Almarhum Prof. Dr. dr. H. Taufiqurrachman Nasihun, M.Kes., Sp.And(K), selaku ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang dengan penuh kesabaran memberikan bimbingan kepada penulis, terima kasih telah membagikan ilmu yang dimiliki kepada penulis dan senantiasa membantu penulis, semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat, kasih sayang-Nya dan mendapatkan tempat yang layak disurga-Nya.
3. Dr. dr. Hj. Chodidjah, M.Kes selaku pembimbing I yang memberikan dorongan, semangat, masukan, serta bimbingan dalam mengikuti program Magister Ilmu Biomedik dan dalam penyusunan Tesis ini.
4. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati, M.Kes selaku pembimbing II yang telah memberikan dorongan, semangat, masukan, serta bimbingan dalam penyusunan Tesis ini.
5. Kedua orang tua dan saudara-saudara yang telah memberikan dukungan, baik berupa moral maupun materi.
6. Segenap staf administrasi program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.
7. Semua sejawat dan teman seangkatan khususnya mbak Novia Kartikasari yang sudah seperti kakak bagi penulis, mbak Umi Rosidah dan mas Meiky yang sudah banyak membantu selama ini.
8. Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan yang membantu selama proses penyusunan tesis ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan Tesis ini belum sepenuhnya sempurna, untuk itu kritik dan saran dari semua pihak penulis harapkan. Semoga ini dapat bermanfaat bagi pembaca khususnya dibidang kesehatan.

Semarang, 10 Agustus 2021

Penulis



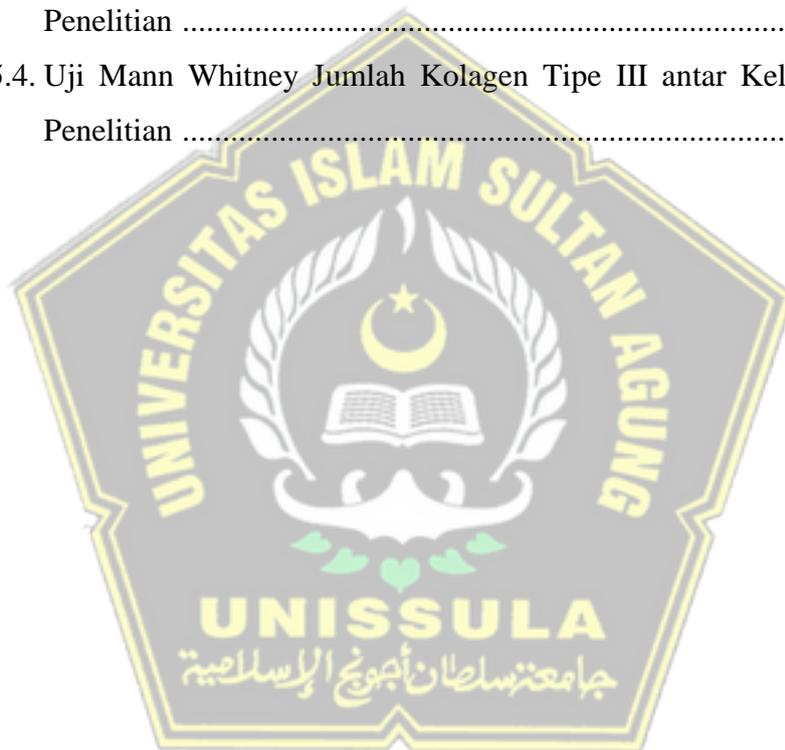
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
RIWAYAT HIDUP	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR SINGKATAN	x
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Orisinalitas Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Penuaan	7
2.2. <i>Superoxide Dismutase</i> (SOD)	12
2.3. Kolagen	16
2.4. Kopi	19
2.5. Pengaruh Kopi terhadap ROS dan Kolagen	25
2.6. Faktor Perancu	27
2.7. Krim	29
BAB III KERANGKA TEORI, KONSEP DAN HIPOTESIS	32
3.1. Kerangka Teori	32
3.2. Kerangka Konsep Penelitian	36
3.3. Hipotesis	36

BAB IV METODE PENELITIAN	37
4.1. Jenis Penelitian	37
4.2. Waktu dan Tempat Penelitian	38
4.3. Populasi dan Sampel Penelitian	38
4.4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi	40
4.5. Variabel Penelitian	41
4.6. Definisi Operasional	41
4.7. Cara Pengumpulan Data	46
4.8. Prosedur Kerja	46
4.9. Pengamatan	49
4.10. Etika Penggunaan Hewan Percobaan	50
4.11. Cara Pengolahan dan Analisis Data	53
4.12. Alur Penelitian	54
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1. Hasil Penelitian	55
5.1.1. Kapasitas Total Kadar ROS dan Jumlah Kolagen Tipe I dan III	55
5.1.2. Pengaruh Pemberian Krim Kosmetik Kopi terhadap Kapasitas Total Kadar ROS	57
5.1.3. Pengaruh Pemberian Krim Kosmetik Kopi terhadap Jumlah Kolagen Tipe I	60
5.1.4. Pengaruh Pemberian Krim Kosmetik Kopi terhadap Jumlah Kolagen Tipe III	64
5.2. Pembahasan Hasil Penelitian	68
5.3. Keterbatasan Penelitian	73
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1. Kesimpulan	74
6.2. Saran	74
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN	81

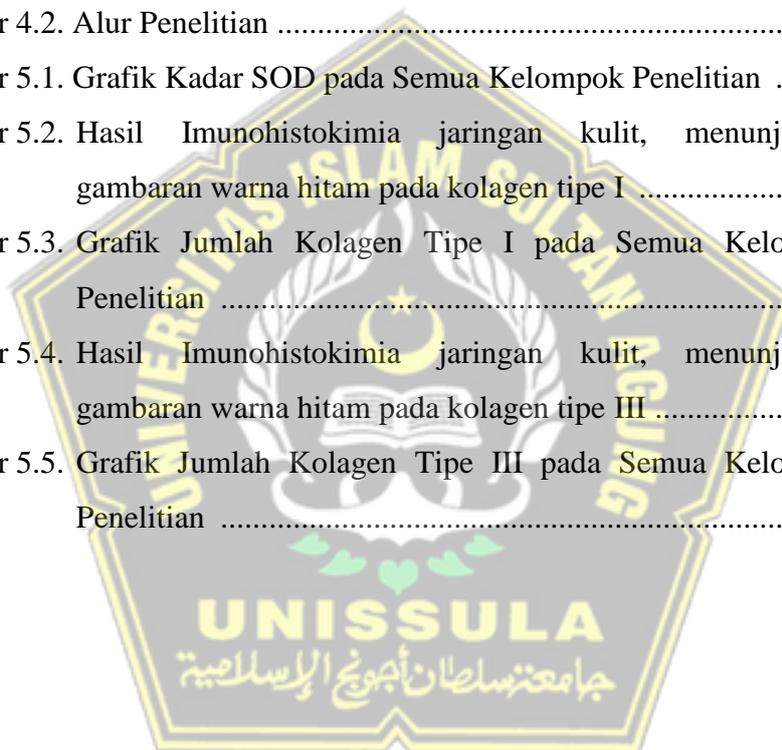
DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	5
Tabel 2.1. Formula Standar Pembuatan Krim Kosmetik	31
Tabel 4.1. Formula Krim Kosmetik Kopi	47
Tabel 5.1. Data Total Kadar ROS dan Jumlah Kolagen Tipe I dan III	56
Tabel 5.2. Uji Mann Whitney Kadar SOD antar Kelompok Penelitian	59
Tabel 5.3. Uji Mann Whitney Jumlah Kolagen Tipe I antar Kelompok Penelitian	63
Tabel 5.4. Uji Mann Whitney Jumlah Kolagen Tipe III antar Kelompok Penelitian	67



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Histologi kolagen dermis dengan pewarnaan HE	16
Gambar 2.2. Perbandingan Kopi Arabica dengan Kopi Robusta	20
Gambar 2.3. Penampang Melintang Biji Kopi	23
Gambar 3.1. Kerangka Teori	32
Gambar 3.2. Bagan konsep penelitian	36
Gambar 4.1. Desain Penelitian	37
Gambar 4.2. Alur Penelitian	54
Gambar 5.1. Grafik Kadar SOD pada Semua Kelompok Penelitian	59
Gambar 5.2. Hasil Imunohistokimia jaringan kulit, menunjukkan gambaran warna hitam pada kolagen tipe I	62
Gambar 5.3. Grafik Jumlah Kolagen Tipe I pada Semua Kelompok Penelitian	63
Gambar 5.4. Hasil Imunohistokimia jaringan kulit, menunjukkan gambaran warna hitam pada kolagen tipe III	66
Gambar 5.5. Grafik Jumlah Kolagen Tipe III pada Semua Kelompok Penelitian	67



DAFTAR SINGKATAN

DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
ETC	: <i>Electron Transport Chain</i>
GPX	: <i>Glutathione Peroxidase</i>
IHK	: <i>Imunohistokimia</i>
MAP	: <i>Mitogen-Activated Pathway</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MMPs	: <i>Matriks Metaloproteinase</i>
RER	: <i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RNS	: <i>Reactive Nitrogen Species</i>
SOD	: <i>Superoxide Dismutase</i>
SREBP-1	: <i>Sterol Regulatoty Element Binding Protein-1</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>



ABSTRAK

Penuaan kulit disebabkan produksi radikal bebas dalam tubuh yang berlebih, sehingga menyebabkan kerusakan jaringan kulit, hal ini juga mengakibatkan kerusakan kolagen kulit yang semakin mempercepat proses penuaan kulit. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian krim kosmetik kopi terhadap penurunan kapasitas total kadar *superoxide dismutase* (SOD) dan peningkatan jumlah kolagen (tipe I dan III) pada proses penuaan kulit wistar betina.

Penelitian ini menggunakan desain true eksperimen design dengan rancangan penelitian *post test only group design*. Populasi dalam penelitian ini adalah wistar betina tua (*Rattus norvegicus*) dengan berat 200-250 gram yang berumur 14-16 bulan. Jumlah sampel secara keseluruhan adalah 24 wistar betina yang terbagi untuk masing-masing kelompok adalah 6 ekor dalam 4 kelompok perlakuan. Data kapasitas total kadar SOD diukur menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay*) dan jumlah kolagen diukur melalui pengamatan histopatologi, selanjutnya untuk spesifikasi kolagen tipe I dan III diukur melalui metode imunohistokimia (IHK). Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Kruskal Wallis Test dan Mann Whitney Test.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kapasitas total kadar SOD serta peningkatan jumlah kolagen tipe I dan III secara bermakna ($p < 0,05$) pada wistar betina tua (*Rattus norvegicus*) disebabkan krim kosmetik kopi mempunyai kandungan antioksidan. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian krim kosmetik kopi efektif meningkatkan kapasitas total kadar SOD serta meningkatkan jumlah kolagen tipe I dan III pada wistar betina tua (*Rattus norvegicus*).

Kata kunci: krim kosmetik kopi, SOD, kolagen, imunohistokimia.

ABSTRACT

Skin aging is caused by excessive production of free radicals in the body, causing damage to skin tissue, this also results in damage to skin collagen which further accelerates the skin aging process. The purpose of this study was to determine the effect of coffee cosmetic cream on decreasing the total capacity of superoxide dismutase (SOD) levels and increasing the amount of collagen (types I and III) in the aging process of female wistar skin.

This study uses a true experimental design with a post test only group design. The population in this study was an old female wistar (*Rattus norvegicus*) weighing 200-250 grams aged 14-16 months. The total number of samples was 24 female wistars which were divided into 6 groups for each treatment group. The total capacity data for SOD levels was measured using the ELISA (Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay) method and the amount of collagen was measured through histopathological observations, then for the specification of collagen types I and III it was measured using the immunohistochemical (IHK) method. The data obtained were analyzed using the Kruskal Wallis Test and the Mann Whitney Test.

Based on the results of the study, there was an increase in the total capacity of SOD levels and an increase in the number of collagen types I and III significantly ($p < 0.05$) in old female wistar (*Rattus norvegicus*) due to coffee cosmetic cream containing antioxidants. The results of this study can be concluded that the administration of coffee cosmetic cream is effective in increasing the total capacity of SOD levels and increasing the amount of collagen types I and III in old female wistar (*Rattus norvegicus*).

Keywords: coffee cosmetic cream, SOD, collagen, immunohistochemistry.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Proses penuaan kulit merupakan proses fisiologis yang tidak dapat dihindari.¹ Secara normal sel dalam tubuh memproduksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) sebagai bagian dalam proses metabolisme.² Penuaan kulit disebabkan produksi ROS dalam tubuh yang berlebih, sehingga menyebabkan kerusakan jaringan kulit,³ hal ini juga mengakibatkan kerusakan kolagen kulit yang semakin mempercepat proses penuaan kulit.⁴ Proses penuaan dapat diatasi dengan penggunaan kosmetik *anti-aging*, namun bahan kimia yang terdapat pada kosmetik dapat menyebabkan terjadinya efek samping.⁵ Asam retinoat merupakan bahan *anti aging* yang cukup berbahaya. Asam retinoat mempunyai efek terhadap kelainan saraf pusat, wajah, jantung dan timus serta cheilitis (luka di sudut bibir).⁶ Kasus malformasi pada telinga bayi yang lahir juga terjadi dari wanita yang senantiasa menggunakan krim kosmetik tretinoin.⁷ Produk kecantikan untuk mencegah penuaan kulit biasa diproduksi dalam bentuk kimia yang menimbulkan efek samping, sehingga dipilih produk herbal berupa kopi yang mengandung senyawa fenolik sebagai antioksidan yang mempunyai efek perlindungan terhadap oksigen radikal bebas.^{8,9} Penelitian juga menunjukkan bahwa kopi untuk spa mampu menghambat peningkatan kadar kortisol dan katekolamin yang berguna untuk menangkal stress pada kulit,¹⁰ pemberian kopi berpengaruh terhadap peningkatan kadar kolagen dengan pemberian 10% ekstrak kopi.¹¹ Potensi kopi

sebagai krim kosmetik *anti-aging* mempunyai manfaat dalam mencegah penuaan kulit, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

Menurut WHO, populasi lansia di Asia Tenggara mencapai 8% atau sekitar 142 juta jiwa. Populasi lansia pada tahun 2050 diprediksi mengalami peningkatan 3 kali dibandingkan dengan tahun 2013. Jumlah lansia pada tahun 2000 mencapai angka 7,4% dari total populasi atau 5,3 juta, sementara jumlah lansia pada tahun 2010 mencapai 9,77% dari total populasi atau 24 juta, dan menurut prediksi pada tahun 2020 jumlah Lansia mencapai 28,8 juta (11,34%) dari total populasi. Penduduk lanjut usia yang ada di Indonesia berdasarkan pada Data Badan Pusat Statistik berjumlah 18,7 juta pada tahun 2007, kemudian mengalami peningkatan menjadi 23,9 juta jiwa (9,77%) pada tahun 2020. Hasil prediksi menunjukkan bahwa jumlah lanjut usia pada tahun 2020 berjumlah 28,8 juta jiwa (11,34%)¹². Peningkatan ROS dari dalam diri dapat menjadi sebab kerusakan lipid, protein serta *deoxyribo nucleic acid* (DNA) sel yang menyebabkan proses penuaan kulit,¹³ dan kasus kerusakan kulit 50% disebabkan oleh pembentukan radikal bebas di dalam kulit.

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa kopi sebagai bahan herbal bermanfaat meningkatkan kadar SOD dan meningkatkan kadar kolagen sebagai upaya mencegah penuaan kulit. Kopi mengandung senyawa antioksidan yang dianggap paling relevan melawan aksi radikal bebas sebagai kontributor utama perkembangan stres oksidatif. Stres oksidatif terjadi ketika produksi sel molekul oksidan melebihi ketersediaan antioksidan yang mampu mengalahkan spesies oksigen reaktif (ROS),¹⁴ terdapat peningkatan kadar kolagen dengan pemberian ekstrak kopi 10%, dan besarnya konsentrasi serta lama pemberian memberikan

pengaruh positif terhadap peningkatan kadar kolagen.¹¹ Kopi mengandung senyawa fenolik sebagai antioksidan yang mempunyai efek melindungi kulit dari oksigen radikal bebas.^{8,9} Beberapa penelitian terdahulu sudah meneliti tentang kopi dengan kandungan yang dapat dimanfaatkan sebagai *anti aging*, namun belum meneliti tentang kopi dalam bentuk krim yang mampu meningkatkan SOD dan kolagen.

Penuaan kulit disebabkan produksi radikal bebas dalam tubuh yang berlebih, sehingga menjadi penyebab kerusakan jaringan kulit.³ Pembentukan radikal bebas yang terlalu tinggi menyebabkan berkurangnya kemampuan tubuh dalam memproduksi antioksidan, sehingga mengakibatkan terjadinya stres oksidatif yang dapat merusak komponen seluler serta menyebabkan terjadinya gangguan pada jalur komunikasi pada sel yang terlihat dengan adanya kulit kering dan munculnya kerut halus pada kulit.¹⁵ Reaksi terminasi pada antioksidan muncul melalui penangkapan radikal hidroksil (*OH) pada saat terjadi reaksi peroksidasi lemak, protein serta molekul yang lain pada membran sel normal sehingga dapat menghindari terjadinya kerusakan sel.¹⁶ Kopi merupakan bahan alami yang mengandung senyawa fenolik sebagai antioksidan yang mampu melindungi dari efek radikal bebas.⁸ Kandungan kafein dalam kopi berupa antioksidan kuat yang memberikan perlindungan pada kerusakan sel yang dikarenakan radikal bebas,¹⁷ sementara antioksidan pada kopi adalah polifenol yang membantu pertumbuhan kolagen pada tubuh.¹⁸ Berdasarkan uraian di atas dilakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian krim kopi terhadap peningkatan kapasitas total kadar SOD dan jumlah kolagen dalam proses penuaan pada kulit wistar betina.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh pemberian krim kosmetik kopi terhadap kapasitas total kadar SOD dan jumlah kolagen (tipe I dan III) pada proses penuaan kulit wistar betina?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian krim kosmetik kopi terhadap peningkatan kapasitas total kadar *superoxyde dismutase* (SOD) dan peningkatan jumlah kolagen (tipe I dan III) pada proses penuaan kulit wistar betina.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi kadar kopi dalam krim kosmetik sebesar 10%, 15% dan 20% yang paling efektif meningkatkan kapasitas total kadar SOD pada proses penuaan kulit wistar betina
2. Untuk mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi kadar kopi dalam krim kosmetik sebesar 10%, 15% dan 20% yang paling efektif meningkatkan jumlah kolagen (tipe I dan III) pada proses penuaan kulit wistar betina.

1.4. Orisinalitas Penelitian

Perbedaan penelitian yang akan dilakukan dengan penelitian sebelumnya adalah variabel bebas menggunakan krim kopi dan variabel tergantung

menggunakan kapasitas total kadar *superoxyde dismutase* (SOD) dan jumlah kolagen pada wistar betina.

Tabel 1.1
Originalistas Penelitian

No	Peneliti & Tahun	Judul	Metode Penelitian	Hasil
1.	Dhurhania & Novianto (2019)	<i>The New Paradigm of Wound Management Using Coffee Powder</i>	Uji kandungan fenolik total dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu secara spektrofotometri UV-Vis pada 760,5 nm	Kopi mengandung senyawa fenolik sebagai antioksidan yang mempunyai efek perlindungan terhadap pengaruh oksigen radikal bebas
2.	Aritanoga, et.al (2019)	<i>Gayo-Arabica Coffee Decreases MDA and Increases SOD after Single Bout Submaximal Physical Exercise in Sedentary Men</i>	Penelitian ini menggunakan desain penelitian <i>pre and post control group design</i>	Kopi sebagai bahan antioksidan eksogen dapat meningkatkan kadar SOD sebagai enzim antioksidan endogen
3.	Girsang, et.al (2020)	<i>Effectiveness Test of Robusta Coffee (Coffea cenephora) Extract from North Sumatra in Collagen and Hydration Skin Level of Female Wistar Rattus norvegicus</i>	Penelitian ini menggunakan desain penelitian <i>pre and post control group design</i>	Terdapat peningkatan kadar kolagen dengan pemberian ekstrak kopi 10%, dan lama pemberian berpengaruh terhadap peningkatan kadar kolagen
4.	Herawati dan Sukohar (2013)	<i>Pengaruh Chlorogenic acid Kopi Robusta Lampung terhadap Ekskresi Cyclin D1 dan Caspase 3 pada Cell Lines HEP-G2</i>	Penelitian ini menggunakan desain <i>pure experiment</i>	Senyawa antioksidan yang terkandung dalam kopi mampu menginduksi antioksidan endogen sebagai antioksidan primer yaitu <i>superoxide dismutase</i> (SOD)

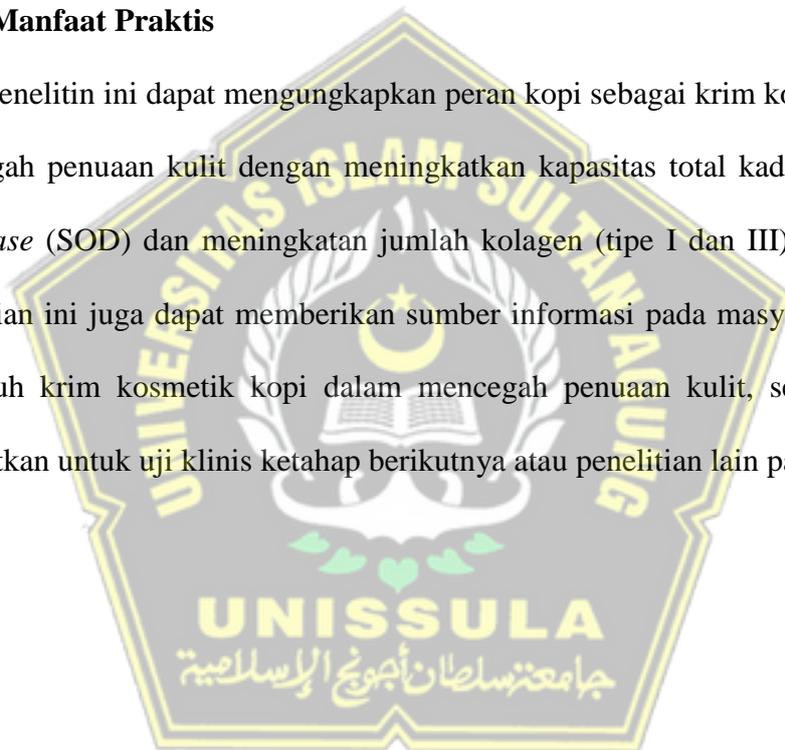
1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

Memberi informasi ilmiah mengenai pengaruh pemberian krim kosmetik kopi dalam dunia kedokteran sebagai *anti aging* yang berpengaruh dalam mencegah penuaan kulit melalui peningkatan kapasitas total kadar *superoxyde dismutase* (SOD) dan peningkatan jumlah kolagen (tipe I dan III).

1.5.2. Manfaat Praktis

Penelitian ini dapat mengungkapkan peran kopi sebagai krim kosmetik dalam mencegah penuaan kulit dengan meningkatkan kapasitas total kadar *superoxyde dismutase* (SOD) dan meningkatkan jumlah kolagen (tipe I dan III) yang efektif. Penelitian ini juga dapat memberikan sumber informasi pada masyarakat tentang pengaruh krim kosmetik kopi dalam mencegah penuaan kulit, sehingga dapat dilanjutkan untuk uji klinis ketahap berikutnya atau penelitian lain pada manusia.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Penuaan

2.2.1. Konsep dasar penuaan

Penuaan adalah sebuah tahapan penurunan pada fungsi biologis tubuh, yang kecepatannya tergantung pada faktor internal dan eksternal. Faktor internal yang menyebabkan terjadinya proses penuaan adalah radikal bebas, perubahan kadar hormon, metilasi, proses glikosilasi, apoptosis, sistem kekebalan yang menurun serta gen. Faktor ini dapat diminimalisir agar memperlambat terjadinya proses penuaan, diantaranya apabila penyebab penuaan adalah pada radikal bebas maka dapat diatasi dengan pemberian antioksidan.¹⁹ Penuaan yang disebabkan oleh radikal bebas berasal dari proses fisiologis pada tubuh, terutama dalam proses rantai pernafasan aerobik pada mitokondria.¹⁵

2.2.2. Tahap proses penuaan

Menurut Pangkahila,¹⁹ proses penuaan tidak berlangsung secara tiba-tiba pada usia lanjut, melainkan melalui tiga tahap sebagai berikut:

1. Tahap subklinik (usia 25-35 tahun)

Tahap subklinik terlihat dengan adanya beberapa hormon dalam tubuh mulai mengalami penurunan antara lain testosteron, *growth hormone* serta estrogen. Terbentuknya radikal bebas dapat merusak sel serta DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) yang akan mempengaruhi kondisi tubuh. Kerusakan yang terjadi biasanya tidak tampak dari luar, sehingga pada tahap ini merasa

normal, tanpa disertai gejala serta tanda penuaan. Padahal kenyataannya sudah dimulai terjadinya proses penuaan. Contohnya banyak wanita berusia muda menggunakan kontrasepsi hormonal mengeluh hilangnya dorongan seksual sebagai akibat ketidakseimbangan hormon.

2. Tahap Transisi (usia 35-45 tahun)

Tahap transisi terjadi penurunan tingkat hormon mencapai 25%, hal ini menyebabkan terjadi penurunan massa otot lebih kurang satu kilogram setiap beberapa tahun. Dampak dari hal ini antara lain berupa kekuatan dan tenaga terasa hilang, sehingga susunan lemak terus bertambah. Tanda awal terjadi pada kulit berupa elastisitas kulit menurun dan pigmentasi kulit bertambah. Banyak orang mulai merasa tidak muda dan terlihat lebih tua.

3. Tahap Klinik (usia lebih dari 45 tahun)

Tahap klinik terjadi apabila kadar hormon yang menurun terus menerus selama tahap ini antara lain *growth hormone*, melatonin, hormon tiroid, testosteron, estrogen, DHEA. Selain itu, kemampuan penyerapan bahan makanan, vitamin dan mineral menurun sampai dengan hilang. Penurunan massa otot satu kilogram setiap tiga tahun dan densitas tulang juga menurun sehingga kalori yang ada tidak mampu dibakar, berat badan dan lemak tubuh bertambah. Sering timbul penyakit kronis dan mulai tampak adanya kegagalan sistem organ tubuh. Gangguan keharmonisan dalam rumah tangga yang misalnya terjadi disfungsi seksual.

Berdasarkan penjelasan di atas menggambarkan bahwa tidak ada gejala atau keluhan bukan berarti proses penuaan tidak dimulai, sehingga jangan sampai muncul gejala dan keluhan yang lebih nyata saat mengatasi proses penuaan.

2.2.3. Teori Penuaan Stres Oksidatif

Pertambahan usia (penuaan) menyebabkan terjadinya peningkatan radikal bebas yang terjadi secara fisiologis dalam proses metabolisme tubuh, sedangkan antioksidan yang dibutuhkan dalam menetralkan radikal bebas pada sel atau antioksidan yang berasal dari luar tidak mencukupi. Jumlah radikal bebas dan antioksidan yang tidak seimbang menyebabkan terjadinya stres oksidatif.²⁰

Stres oksidatif merupakan sebuah situasi dimana tidak ada keseimbangan pada radikal bebas dengan pertahanan antioksidan yang dimungkinkan oleh peningkatan produksi radikal bebas atau rendahnya produksi antioksidan. Radikal bebas merupakan hasil produk sekunder dari proses metabolisme aerobik yang berupa senyawa oksigen reaktif. Oksigen (O_2) sangat dibutuhkan dalam kehidupan pada manusia. Manusia menggunakan lebih dari 90% oksigen untuk proses mitokondria yang dapat menghasilkan energi pada tubuh.²¹ Radikal bebas terbentuk dari proses pengolahan Oksigen yang tidak sempurna, sehingga membentuk radikal bebas yang kurang stabil dengan elektron yang tidak saling berpasangan pada orbit yang paling luar. Senyawa ini dapat menarik elektron dari molekul yang ada di sekitar untuk dapat melengkapi senyawa elektron pada orbit luar, akibatnya molekul tidak stabil dan melakukan pengambilan elektron dari luar. Radikal bebas yang terbentuk cukup berbahaya bagi kulit, diantaranya adalah anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$), radikal hidroksil (OH^{\cdot}), dan peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$).

Senyawa nitrit oksida (NO) dan Hidrogen peroksida (H_2O_2) bukan merupakan senyawa radikal bebas, karena mempunyai kemampuan dalam mencetuskan reaksi reduksi oksidasi dan mengakibatkan terbentuknya radikal bebas.²²

Radikal bebas merupakan senyawa yang berasal dari proses fisiologis dan mempunyai peran penting pada komunikasi sel, homeostasis, dan respons selular. Tubuh juga mempunyai metode pertahanan (antioksidan) dalam mencegah pengaruh negatif radikal bebas, secara enzimatis maupun nonenzimatis. Antioksidan yang berbentuk enzim diantaranya superoksida dismutase. Produksi antioksidan tidak sebanding dengan kecepatan produksi pada radikal bebas, karena 1-3% O_2 dapat terjadi proses pengolahan yang kurang sempurna dan menyebabkan terbentuknya radikal bebas. Radikal bebas yang terlalu tinggi dapat menjadi toksik dan mengakibatkan kerusakan sel.²²

Oksigen mempunyai fungsi akseptor elektron terminal pada rantai transport elektron (*electron transport chain*/ETC) pada membran dalam mitokondria. Aliran elektron apabila mengalami gangguan, maka oksigen dapat terjadi reduksi oleh sebuah elektron sehingga menyebabkan terbentuknya ROS, yaitu $O_2^{\cdot-}$. Kondisi semacam ini umum terjadi pada kompleks I ETC (NADH dehidrogenase) dan kompleks III ETC (ubisemikinon). Pada mitokondria terdapat enzim MnSOD yang dapat merubah $O_2^{\cdot-}$ menjadi H_2O_2 , kemudian H_2O_2 oleh enzim glutathion peroksidase (GSPx) akan diubah menjadi air (H_2O) dengan bantuan GSH atau katalase. H_2O_2 apabila tidak diuraikan dapat bereaksi dengan logam transisi yang terdapat bebas, seperti Fe_{2+} dan Cu^+ , akibatnya terbentuk OH^{\cdot} melalui reaksi Fenton. Radikal OH^{\cdot} menyerang berbagai makromolekul pada sel,

seperti DNA, lipid, dan protein, akibatnya terjadi kerusakan oksidatif makromolekul.²³

Stres oksidatif mempunyai peran penting terjadinya penuaan pada kulit yang disebabkan adanya kerusakan pada sel, terutama kerusakan secara intrinsik, yang menimbulkan kerusakan oksidatif pada berbagai komponen selular, merangsang terjadinya apoptosis, menyebabkan gangguan dalam proses komunikasi antar sel, serta mengakibatkan penyakit terkait penuaan. ROS memberikan dampak pada penuaan kulit karena adanya proses oksidasi selular, aktivasi mitogen-activated pathway (MAP) kinase, aktivasi nuclear factor kappa B (NF- κ B), serta berbagai stimulasi sitokin proinflamasi. Akibat dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas bergantung pada sifat molekul. $O_2^{\cdot-}$ mempunyai sifat reaktif dan tidak mudah berdifusi pada luar sel, sehingga kerusakannya bersifat lokal. H_2O_2 mudah larut pada lemak, sehingga berdifusi di luar sel dan mengakibatkan kerusakan di luar tempat produksinya. OH^{\cdot} Mempunyai waktu paruh yang singkat dan bereaksi pada seluruh komponen di sekitarnya, seperti mtDNA, lipid, dan protein.

Radikal bebas mempunyai peran penting dalam metabolisme kolagen. Oksigen reaktif selain menghancurkan kolagen interstisial, namun juga menginduksi beberapa kelompok enzim dalam degradasi kolagen yaitu *matrix metalloproteinase* (MMPs), sehingga menyebabkan kehilangan kolagen pada kulit. ROS yang mengalami peningkatan melalui jalur MAPK dapat menurunkan *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) dan meningkatkan cJun Kinase (JNK/p38), sehingga mengaktifasi peningkatan AP-1. AP-1 yang mengalami

peningkatkan mengakibatkan terjadinya peningkatan MMP-1 (*collagenase*). MMP-1 dan MMP-3 yang meningkat dapat mengaktifasi penurunan pro-kolagen-1, sebab kolagen tipe-1 yang dihasilkan mengalami penurunan, sehingga kolagen pada sel kulit juga mengalami penurunan.

2.2. SOD (*Superoxide Dismutase*)

Superoxide Dismutase (SOD) merupakan enzim yang berfungsi sebagai katalis dismutasi superoksida untuk menjadi oksigen serta hidrogen peroksida. SOD adalah enzim yang sangat penting dalam pertahanan sel dari berbagai paparan oksigen. Oksigen dibutuhkan untuk bertahan hidup, akan tetapi dalam proses metabolisme yang terjadi pada oksigen dalam sel menghasilkan berbagai unsur destruktif yang berupa radikal bebas. Oksidan atau radikal bebas yang tidak seimbang membawa elektron bebas yang berdampak pada kerusakan molekul pada sel pada saat berusaha untuk mencapai keseimbangan, sehingga mempunyai potensi untuk merusak sel. Radikal bebas yang mengalami kerusakan sering disebut dengan stress oksidatif, namun tubuh sudah mempunyai sebuah sistem pertahanan dari radikal bebas yang disebut sebagai *superoxide dismutase* (SOD) atau enzim antioksidan. SOD merupakan enzim antioksidan yang berfungsi melindungi sel dalam proses metabolisme oksigen, sehingga dengan aman dapat menangkap radikal bebas yang berbahaya menjadi sebuah unsur penyeimbang seperti H₂O.²⁴

Enzim antioksidan bekerja melalui proses pencegahan pada terbentuknya senyawa radikal bebas yang baru. Pada saat kondisi yang normal, terdapat

keseimbangan antara dua aktivitas dan kadar antioksidan intraseluler. Kondisi keseimbangan ini sangat penting bagi pertahanan organisme dan kesehatan. Berdasarkan pada pengamatan membuktikan bahwa kerusakan unsur yang terjadi pada seluler seperti DNA, protein sel serta membran lemak disebabkan oleh adanya stres oksidatif.¹⁶

SOD adalah pertahanan penting bagi tubuh terhadap radikal superoksida dan merupakan mekanisme utama dalam bertahan mencegah terjadinya stres oksidatif. SOD merupakan enzim antioksidan yang berfungsi sebagai katalis bagi dismutasi dari reaksi anion superoksida yang tinggi menjadi O_2 dan H_2O_2 yang kurang reaktif. Manusia mempunyai tiga bentuk SOD, yaitu: Cu/Zn-SOD sitosolik, Mn-SOD mitokondria dan (EC-SOD) SOD ekstraseluler. Mn-SOD terdapat pada mitokondria sel eukariot, sementara Cu/Zn-SOD berada pada sitosol dan kloroplas tanaman tingkat tinggi. Adapun Fe-SOD terkadang tidak dapat dideteksi, akan tetapi dapat dicermati dengan lebih lanjut pada bagian kloroplas.²⁵

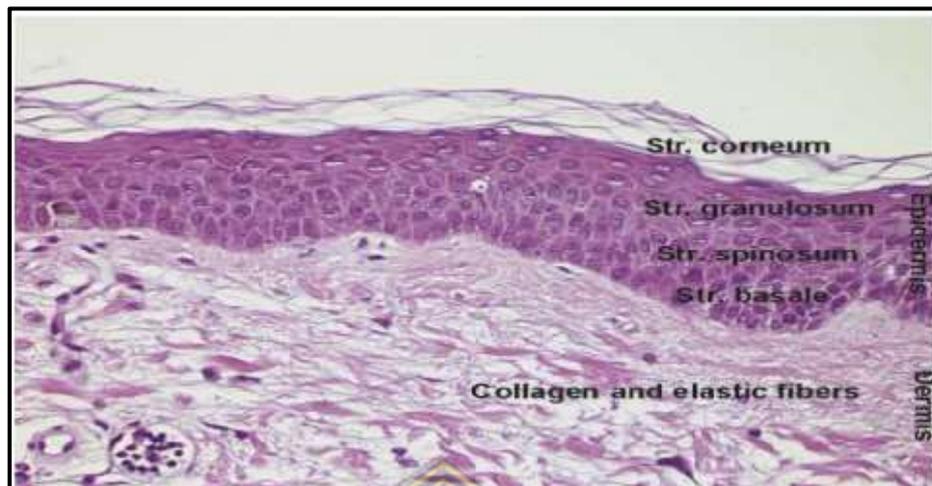
SOD bekerja dengan menghancurkan O_2 melalui oksidasi dengan berurutan serta reduksi dari transisi ion logam pada bagian aktif mekanisme tipe ping pong dengan tingkat reaksi yang sangat tinggi. Berbagai tipe pada SOD berfungsi mengikat anion tunggal sebagaimana azida dan fluoride, namun terdapat perbedaan yang cukup jelas pada kerentanan Fe^+ , CN_2 dan F_2 . Mn-SOD mempunyai nilai rata-rata yang terdapat pada kontrol bagi orang yang sehat sebesar 107 ng/ml. Mn-SOD pada serum mengalami peningkatan hingga lima kali lipat pada manusia yang terinfeksi virus, seperti *Hepatitis A virus*, *Hepatitis B*

virus, Epstein barr virus di mana berbagai virus tersebut bereplikasi pada organ dalam, sementara Mn-SOD mengalami peningkatan yang sedikit pada organ yang terinfeksi virus yang mempunyai sitopatogenisitas rendah, yaitu *cytomegalovirus, rubella* dan *herpes simplex virus*.¹⁶

Kadar SOD yang mengalami penurunan berakibat pada berbagai kondisi dan menyebabkan timbulnya berbagai penyakit seperti anemia Fanconi, reumatoid arthritis, katarak, infeksi saluran pernapasan dan infertil. SOD dapat digunakan untuk membantu ahli kesehatan dalam menegakkan diagnosis penyakit, sebagaimana penyakit jantung koroner, kanker, diabetes, hepatitis, abnormalitas hemoglobin, distrofi muskular, depresi, skizofrenia serta *down syndrome*.²⁴

2.3. Kolagen

Kolagen adalah protein yang berupa tripel heliks yang ada di seluruh tubuh dengan fungsi sebagai pengikat jaringan, migrasi sel, perlekatan sel, morfogenesis jaringan, pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) dan perbaikan jaringan. Kolagen yang terdapat pada vertebrata ada 28 jenis dengan nomor I-XVIII. Kulit mempunyai kolagen yang terdiri dari tipe I, III, V dan VI dengan membentuk struktur horizontal pada dermis dengan diselingi serat elastin. Kolagen tipe I merupakan jenis terbanyak pada jaringan ikat kulit. Protoglikan terutama asam hialuronat adalah substansi amorf yang disekitarnya terdapat serat kolagen dan elastin.²⁶ Serat kolagen mempunyai fungsi memberi kekuatan, ketahanan kulit dan integritas struktural.²⁷



Gambar 2.1. Histologi kolagen dermis dengan pewarnaan HE²⁸

Kolagen dengan jenis tipe I disintesis pada sel fibroblast dengan melalui dua proses, yaitu dalam dan luar sel. Pada proses yang terjadi dalam sel diawali dengan terbentuknya prokolagen dalam bentuk dua rantai peptida alpha dengan translasi di ribosom sepanjang retikulum endoplasma kasar (RER), selanjutnya rantai polipeptida dilepas menuju lumen RER. Sinyal peptida dilepaskan pada RER, sehingga rantai peptida menjadi rantai pro-alpha, sehingga terjadilah proses hidroksilasi lisin dan prolin asam amino pada lumen melalui kofaktor asam askorbat yang kemudian residu hidroksilin mengalami glikosilasi. Pada retikulum endoplasma terbentuk triple alpha helix, yang selanjutnya prokolagen dieksositosis menuju badan golgi. Prokolagen yang terjadi dalam proses ekstrasel sudah dieksositosis kemudian berubah menjadi tropokolagen oleh prokolagen peptidase. Beberapa tropokolagen membentuk fibril kolagen dengan *cross-linking kovalen* dan fibril kolagen menjadi serabut kolagen. Kolagen kemudian menempel pada membran sel melalui beberapa protein, diantaranya yaitu fibronectin dan integrin.²⁹

Kolagen sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik diantaranya adalah genetik dan hormon, sementara untuk faktor ekstrinsik terdiri dari sinar ultraviolet, diet dan polusi. Hormon estrogen juga menjadik faktor penentu produksi kolagen, karena estrogen mampu meningkatkan sintesis kolagen. Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) atau kolagenase adalah sebuah proteinase ekstraselular yang mendominasi kulit, dan mempunyai peran untuk memecah kolagen tipe I secara fisiologi. MMP terdiri dari propetida, katalik, dan hemopexin. MMP memecah kolagen menjadi $\frac{3}{4}$ dan $\frac{1}{4}$ fragmen. MMP-1 memecah kolagen setelah residu ke 775 (Gly), dalam sekuen rantai GIA-alpha 1 dan rantai GLL-alpha 2.³⁰

Kolagen tipe III banyak terdapat pada kulit, sistem limfatik, limfa, hati, sistem kardiovaskular, paru. Tipe kolagen yang banyak terdapat pada organ kulit yaitu kolagen tipe I dan tipe III dengan fungsi sebagai pertahanan mekanik.³¹ Kolagen tipe I dan III termasuk pada *fibril-forming collagen* adalah serat yang cukup fleksibel dengan daya regang yang kuat. Kolagen berwarna putih, sehingga disebut dengan serat putih. Kolagen pada jaringan ikat mempunyai diameter yang kecil dan tidak berwarna jika tidak diberikan warnai. Setiap serat pada kolagen terdiri dari tropocollagen, dan tropocollagen terdiri atas tiga rantai polipeptida yang tersusun dalam bentuk triple helix. Jenis kolagen lain yang terdapat pada kulit diantaranya adalah kolagen tipe V, VI, VII, XII dengan jumlah yang minimal dan diperkirakan turut menunjang kulit, namun perannya belum jelas.³¹

Jumlah kolagen akan semakin berkurang seiring dengan bertambah umur, namun beberapa tipe kolagen mempunyai karakter yang berbeda. Anak memiliki

banyak kolagen dengan tipe III, namun pada proses penuaan secara intrinsik terjadi penurunan jumlah kolagen tipe III dan tumbuh jumlah kolagen tipe I. Kolagen dengan tipe I terus mengalami peningkatan hingga usia 35 tahun, yaitu pada saat kulit mengalami puncak kekuatan mekaniknya, kemudian kolagen tipe I akan mengalami penurunan. Korelasi antara usia dengan jumlah kolagen hingga saat ini belum jelas, namun jumlah kolagen manusia pasca usia 60 tahun lebih sedikit apabila dibanding manusia yang berusia lebih muda.³¹

Kolagen adalah serat utama yang terdapat pada lapisan dermis kulit dan merupakan protein dengan fungsi sebagai penyangga kulit dan kekuatan mekanik. Struktur protein pada kulit dan komponen kulit akan mengalami perubahan seiring dengan bertambahnya umur, sehingga mengakibatkan terjadinya penuaan kulit. Jumlah kolagen yang mengalami perubahan merupakan bagian integral dari proses penuaan kulit. Penurunan kolagen diprediksi terjadi sekitar 1% setiap tahun per unit pada area kulit, namun pada kulit yang senantiasa terpapar UV menunjukkan adanya penurunan hingga 59%, hal ini sebagaimana ditunjukkan pada kulit yang mengalami photodamage.³²

Kolagen tipe I walaupun merupakan kolagen yang utama pada lapisan dermis kulit, namun jenis kolagen dengan tipe yang juga mempunyai peranan yang penting. Kolagen dengan tipe VII banyak terdapat pada anchoring fibril terletak pada membran basalis berfungsi melekatkan membran basalis pada papilla dermis. Pasien dengan paparan sinar UV yang kronis dapat mengalami penurunan jumlah kolagen tipe VII dan berakibat pada perlekatan antara membran basalis dengan papilla dermis mengalami penurunan, akibatnya ikatan epidermis dan

dermis melemah. Kerutan yang terdapat pada kulit terbentuk karena lemahnya ikatan antara dermis dan epidermis yang disebabkan degenerasi anchoring fibril. Penurunan kolagen tipe VII pada dasar kerutan kulit juga mengakibatkan penurunan kolagen tipe IV pada tempat yang sama.³¹

2.4. Kopi

2.4.1. Definisi Kopi

Tanaman kopi (*Coffea* spp) merupakan spesies tanaman yang berbentuk pohon termasuk pada famili *Rubiaceae* dan genus *Coffea*. Tanaman kopi tumbuhnya dengan tegak, mempunyai cabang dan dapat tumbuh hingga ketinggian 12 m. Tanaman kopi mempunyai daun yang bulat telur dengan bagian ujung agak meruncing, daun tumbuh berhadapan dengan batang, cabang dan ranting-ranting. Tanaman kopi mulai berbunga setelah mempunyai umur kisaran 2 tahun. Tanaman kopi terdiri atas beberapa jenis yaitu *Coffea Arabica*, *Coffea Robusta* dan *Coffea Liberica*.³³



Gambar 2.2. Perbandingan Kopi Arabica dengan Kopi Robusta

Kopi adalah jenis tanaman perkebunan yang telah dibudidayakan dan mempunyai nilai ekonomis cukup tinggi. Kopi berasal dari Afrika, yaitu di daerah pegunungan di Etopia, akan tetapi kopi dikenal oleh masyarakat dunia sesudah dikembangkan di luar daerah asal, yaitu Yaman di bagian selatan Arab.³⁴ Sejarah mencatat bahwa kopi ditemukan sebagai minuman dengan khasiat dan energi yang tinggi. Kopi ditemukan oleh Bangsa Etiopia di benua Afrika berkisar 3000 tahun yang lalu atau 1000 SM. Kopi kemudian mengalami perkembangan hingga saat ini dan menjadi minuman terpopuler di dunia yang dikonsumsi hampir semua kalangan masyarakat. Indonesia sudah mampu memproduksi lebih dari 400 ribu ton kopi dalam setiap tahun. Kopi selain mempunyai rasa dan aroma yang menarik, juga dapat menurunkan risiko penyakit kanker, diabetes, batu empedu, dan penyakit jantung.³⁵

Penyebaran tanaman kopi di Indonesia saat ini telah mencapai lebih dari 95% merupakan jenis robusta, sementara lainnya yaitu kopi Arabika dan yang lainnya. Kopi Robusta meskipun awalnya ditanam dan diusahakan oleh perkebunan besar, akan tetapi pada perkembangannya lebih berpotensi sebagai tanaman rakyat, karena lebih mudah ditanam dan mempunyai ketahanan pada kondisi pertumbuhan yang kurang menguntungkan, selain itu harga pasaran kopi Robusta relatif semakin tinggi.³⁶

Kopi Robusta mampu tumbuh dengan baik pada ketinggian (elevasi) 300-700 meter dari permukaan laut (mdpl) dengan suhu udara harian 24-30°C dan curah hujan rata-rata 1.500-3.000 mm/tahun. Elevasi optimal yang direkomendasikan dalam penanaman kopi Robusta yaitu 500-700 mdpl jika

dihubungkan dengan cita rasa dan kandungan kimia.³⁷ Ketinggian tempat mempunyai dampak yang signifikan pada komposisi biji kopi. Rata-rata kandungan antioksidan tertinggi kopi robusta terdapat pada ketinggian tempat 1200 ++ m dpl 28,371, kandungan antioksidan pada ketinggian 1200 mdpl yaitu 26,673, kandungan antioksidan pada ketinggian 800–1000 mdpl yaitu sebesar 26,469, serta rata-rata kandungan antioksidan yang paling rendah terdapat pada ketinggian 400-600 m dpl dengan 23,957.³⁸ Penelitian ini menggunakan kopi untuk dijadikan sebagai krim kosmetik dari Kopi Lawu yang beralamatkan di Gondang, RT.004/RW.003, Gondang, Jabung, Panekan, Kabupaten Magetan, Jawa Timur 63352 yang berada pada ketinggian \pm 800 mdpl, sehingga kandungan antioksidan dapat dimanfaatkan sebagai penangkal tumbuhnya radikal bebas (ROS).

2.4.2. Taksonomi Kopi

Klasifikasi kopi berdasarkan tingkatan taksonomi, dapat dijelaskan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Sub Kingdom : Tracheobionta

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Asteridae

Ordo : Rubiales

Famili : Rubiaceae

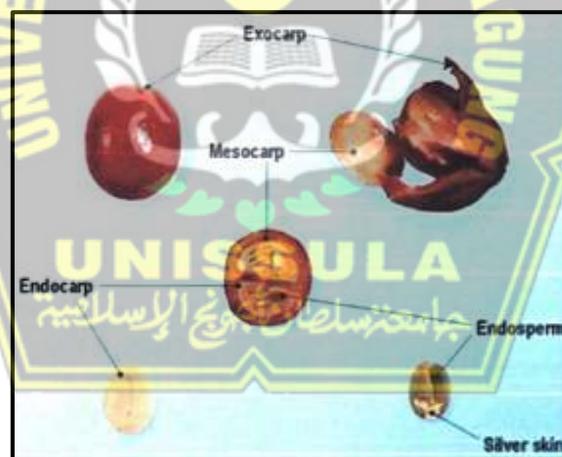
Genus : *Coffea* L.

Spesies : *Coffea canephora* Pierre ex Froehner.³⁹

2.4.3. Morfologi

Tanaman kopi secara alami mempunyai akar tunggang sehingga tidak dapat rebah dengan mudah. Akar tunggang pada tanaman kopi hanya dimiliki oleh tanaman kopi dari bibit semai atau bibit sambung (okulasi) dengan batang bawahnya dari bibit semai. Tanaman kopi dari bibit setek, cangkok, atau okulasi dengan batang bawah dari bibit setek tidak mempunyai akar tunggang, sehingga mudah rebah.³⁶

Buah kopi tersusun atas tiga bagian, diantaranya yaitu lapisan kulit luar (*exocarp*), lapisan daging (*mesocarp*), lapisan kulit tanduk (*endocarp*), kulit ari, dan biji kopi. Penampang secara melintang pada biji kopi secara lebih jelas disajikan pada gambar dibawah:



Gambar 2.3. Penampang Melintang Biji Kopi⁴⁰

2.4.4. Manfaat krim kopi dalam mencegah penuaan kulit

Penduduk di daerah-daerah penghasil kopi telah lama menggunakan kopi untuk merawat kulit dan mencegah terjadinya penuaan. Kebiasaan tersebut pada saat ini masih banyak dilakukan penduduk di daerah perkotaan untuk mengencangkan kulit agar terlihat awet muda. Kopi terdiri dari senyawa fenolik

sebagai antioksidan yang memiliki pengaruh perlindungan pada oksigen radikal bebas sebagai antioksidan, sehingga mampu meminimalisir kerusakan sel (*radical scavenger*) melalui penghambat peroksidasi lipid.⁸ Senyawa fenolik pada biji kopi mengandung *Phenolic Acid*, terdiri dari: *Chlorogenic Acid*, *3-Caffeoylquinic Acid*, dan *Hydrooxycinnamates* mempunyai khasiat sebagai anti inflamasi yang berfungsi mengurangi efek histamin, bradikinin, dan leukotrien, serta mengurangi efek peningkatan permeabilitas kapiler pada fase inflamasi, dampaknya dapat mencegah keluarnya makromolekul dari mikrosirkulasi dan meminimalisir terjadinya pembengkakan (edema).

Menurut Farah (2012) senyawa fenolik pada biji kopi mengandung komponen asam klorogenat yang berfungsi sebagai antiinflamasi dengan kandungan yang berbeda-beda pada setiap jenis kopi, konsentrasi Green Coffea arabica yaitu 4.1-7.9 (g/100g), Roasted Coffea arabica adalah 1.9-2.5 (g/100g) dan Green Coffea canephora adalah 6.1-11.3 (g/100g) serta kandungan Roasted Coffea canephora 3.3-3.8 (g/100g).⁴¹ Senyawa fenolik dari kopi robusta secara umum lebih tinggi jika dibanding dengan kopi arabika.⁴²

Senyawa fenolik adalah kelompok senyawa yang paling besar perannya dalam tubuh sebagai antioksidan alami. Senyawa fenolik mempunyai satu (fenol) atau lebih (polifenol) cincin fenol, yaitu gugus hidroksi yang terikat pada cincin aromatis sehingga dapat teroksidasi dengan menyumbangkan atom hidrogen pada radikal bebas. Senyawa fenolik sangat potensial sebagai antioksidan karena mempunyai kemampuan dalam membentuk radikal fenoksi yang stabil saat reaksi oksidasi.⁹ Antioksidan mempunyai manfaat untuk mencegah terjadinya penuaan

dan penyakit degeneratif. Penuaan merupakan proses alami pada semua makhluk hidup yang mengakibatkan terjadinya perubahan progresif pada kulit dan seluruh organ.⁴³

Antioksidan yang ada pada kopi merupakan Flavonoid. Flavonoid merupakan mayoritas senyawa polifenol tanaman yang tersebar secara luas pada beberapa bahan makanan dengan beranekaragam konsentrasi. Polifenol adalah sebuah komponen bioaktif non gizi yang mampu memberikan efek fungsional kesehatan pada tubuh. Senyawa polifenol banyak terdapat pada kopi, teh, kakao, rempah-rempah, sereal, biji-bijian, sayuran, bunga dan lain sebagainya. Senyawa polifenol banyak menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan. Polifenol adalah senyawa kimia mempunyai peran sebagai antioksidan kuat pada kopi.¹⁸

2.5. Pengaruh Kopi terhadap SOD dan Kolagen

Kopi diketahui dapat menurunkan konsentrasi *glutamil transpeptidase*, suatu penanda stres oksidatif. Pemberian kopi yang sudah dihilangkan kandungan *hidroksihidrokuinon* (komponen prooksidan) memperlihatkan efek antihipertensi, memperbaiki bioavailabilitas nitrit oksida (NO) dan memperbaiki fungsi endotelium. Kopi terdiri dari senyawa flavonoid yang mempunyai sifat antioksidan. Senyawa flavonoid adalah metabolit sekunder yang diperoleh dari tanaman yang termasuk pada senyawa *polyphenol*. Flavonoid mampu menangkap radikal bebas, seperti radikal bebas yang dapat merusak endotel pada pembuluh darah, serta mempunyai dampak dalam menghambat oksidasi lipid.⁴⁴

Kopi terdiri dari berbagai komposisi yang mempunyai potensi sebagai antioksidan. Kandungan yang terdapat dalam kopi meliputi mineral mangan (Mn), tembaga (Cu) dan seng (Zn) yang mampu memberikan rangsangan dalam meningkatkan kinerja enzim superoxide dismutase (SOD). SOD merupakan kadar serum yang menjadi indikator utama adanya antioksidan pada tubuh. SOD adalah antioksidan enzimatik endogen, sehingga keberadaan SOD sangat dibutuhkan oleh tubuh untuk memberikan keseimbangan stress oksidatif tubuh yang tinggi.⁴⁵ Kadar serum SOD yang rendah disebabkan oleh ketidakseimbangan antara antioksidan yang diproduksi dalam tubuh dengan jumlah radikal bebas dalam mekanisme metabolisme. Sintesis pada SOD mengalami gangguan akibat tingginya radikal bebas, sehingga mengakibatkan kadar SOD yang diproduksi oleh tubuh mengalami penurunan dan tidak mampu memberikan keseimbangan pada terbentuknya radikal bebas.⁴⁶ Kopi merupakan tanaman yang mengandung antioksidan eksogen mempunyai manfaat dalam meningkatkan enzim antioksidan endogen, seperti SOD, glutathione peroxidase (GPx) dan glutathione. Kopi mengandung flavanoid yang mampu bekerja sebagai antioksidan, yaitu melalui peningkatan kadar SOD yang mampu memberikan ion hidrogen serta elektron menuju anion superoksida, sehingga menjadikan lebih stabil dalam melindungi DNA dan lipo-protein pada oksidasi.⁴⁷

Kopi yang mengandung antioksidan mampu merubah radikal bebas yang dilepaskan pada waktu aplikasi gaya ortodontik menjadi produk yang stabil melalui penghambatan faktor transkripsi redoks sehingga sel dan jaringan dapat terlindungi dari berbagai ancaman kerusakan oksidatif dan mengalami perbaikan

ligamen periodontal dari sabut kolagen melalui proses aktivasi sel fibroblas yang dirangsang oleh makrofag, kekuatan mekanik, limfosit, dan bakteri untuk mengeluarkan plasminogen activator, matriks metaloproteinase (MMP), inhibitor jaringan metalloproteinase (TIMP), plasminogen activator inhibitor (PAI), sitokin prostaglandin E-2 (PGE-2) dan interleukin-6 (IL-6)]. Fibroblas yang mensekresikan protein matriks mempunyai kemampuan untuk menghasilkan kolagen, elastin, dan glycosaminoglycans (GAG'S). Penelitian Wei-Cheng et al., (2013) menjelaskan bahwa asam klorogenat mampu meningkatkan ekspresi TGF- β yang secara bersamaan dapat peningkatan produksi kolagen serta proliferasi sel fibroblas pada hari ke 6-15 dan asam kafeat yang ada dalam biji kopi mampu meningkatkan produksi kolagen dan proliferasi sel fibroblas pada hari ke 10 dan 15 dibanding dengan kelompok kontrol.⁴⁸

2.6. Faktor Perancu

Radikal bebas adalah molekul yang terdiri dari satu atau lebih elektron tidak berpasangan dan mempunyai sifat yang tidak stabil, umur yang pendek, serta reaktif dalam penarikan elektron pada molekul lain dalam tubuh upaya untuk mencapai stabilitas yang mengakibatkan potensi kerusakan pada biomolekul dengan rusaknya integritas lipid, protein, dan DNA pada peningkatan stres oksidatif ditunjukkan dengan adanya penyakit *neurodegenerative*, penyakit kardiovaskular, diabetes mellitus, proses penuaan dini dan kanker.⁴⁹ Penuaan dini adalah tahapan dalam perubahan sel normal menjadi kerusakan sel yang

diakibatkan oleh adanya mutasi dengan berbagai faktor, diantaranya dipicu oleh adanya radikal bebas pada tubuh.

Radiasi sinar rontgen dan sinar UV juga merupakan sumber pembentukan ROS, hal ini karena sinar tersebut dapat melisiskan air menjadi radikal OH. Ion logam sebagaimana Fe^{2+} , Co^{2+} dan Cu^+ juga memberikan reaksi pada oksigen atau hydrogen peroksida (H_2O_2), sehingga mampu menghasilkan radikal OH. Nitric oksida merupakan senyawa penting dalam proses relaksasi pembuluh darah, selain dari senyawa radikal bebas mampu bereaksi melalui superoksida yang mampu menghasilkan peroksinitrit, sehingga dapat membentuk radikal OH.⁵⁰ ROS juga berasal dari respiratory burst dari macrofag yang teraktifkan. Aktivasi macrofag mengakibatkan terjadinya peningkatan penggunaan glukosa melalui lintasan pentose fosfat yang digunakan dalam mereduksi NADP menjadi NADPH, dan peningkatan dalam penggunaan oksigen yang digunakan dalam mengoksidasi NADPH untuk menghasilkan superoksida dan halogen radikal merupakan agen sitotoksik yang berfungsi membunuh mikroorganisme yang telah difagosit.

Oksidasi pada coenzim flavin tereduksi pada mitochondria dan rangkaian transport electron pada mikrosome berlangsung melalui berbagai proses, dimana radikal flavin semiquanon distabilkan oleh protein pengikat, dan menghasilkan radikal oksigen (superoksida) sebagai efek samping. Hasil akhir dari superoksida bukan radikal bebas, akan tetapi sifat radikal, diprediksi terdapat kebocoran radikal bebas, sebanyak 3–5% dari 30 mol oksigen yang dikonsumsi oleh manusia setiap hari sekitar 1.5 mol ROS. Pembentukan radikal bebas pada mitokondria selain disebabkan karena kebocoran electron kronis yang berasal dari rantai

pernafasan normal, juga disebabkan oleh respiratory burst intra mitochondrial, cytoplasma, serta radikal bebas dari luar. Mitochondria superoksida dikonversi menjadi hydrogen peroksida yang mampu menyebar dan selanjutnya dikonversi menjadi radikal OH yang mempunyai sifat mutagenic, sehingga produksi radikal bebas pada mitochondria menjadi faktor penting dalam pathogenesis penyakit.⁵¹

Pertambahan usia merupakan faktor utama pemicu besarnya produksi radikal bebas. Penuaan kulit intrinsik adalah proses penuaan pada kulit secara alami yang terjadi dengan adanya peningkatan usia pada akhir dekade ketiga. Proses ini berjalan dengan lambat yang mengakibatkan terjadinya perubahan struktur jaringan kulit. Penuaan kulit yang terjadi secara intrinsik mengalami berbagai mekanisme perubahan simultan. Pada lapisan epidermis terjadi perubahan morfologi atau struktur kulit, sementara pada lapisan dermis mengalami perubahan biokimiawi. Perubahan turut terjadi pada organ-organ adneksa kulit seperti rambut kelenjar minyak serta kelenjar keringat. Permukaan kulit yang mengalami proses penuaan secara intrinsik terlihat lebih pucat, muncul berbagai kerutan halus (*fine wrinkle*), lapisan dermis dan epidermis menjadi atrofi sehingga kulit menyebabkan kulit terlihat lebih tipis, tampak lebih rapuh serta transparan. Kulit terasa lebih kering dan gatal. Penuaan pada kulit secara intrinsik diikuti dengan berkurangnya jaringan lemak subkutan termasuk *facial fat*, sehingga mengakibatkan pipi menjadi cekung dan muncul kantung mata.¹³

Stres oksidatif yang tinggi terjadi juga disebabkan karena berat badan. Pada kondisi obesitas dapat memicu tumbuhnya kondisi stres oksidatif disebabkan oleh

ketidakseimbangan peroksidan dan antioksidan pada tubuh. Seseorang yang memiliki berat badan berlebih mengalami lipogenesis berlebih, sehingga menghambat lipolisis. Lipogenesis dirangsang oleh diet tinggi karbohidrat. *Sterol Regulator Element Binding Protein-1* (SREBP-1) adalah mediator penting dalam kerja pro-lipogenik atau anti-lipogenik lain yang mempunyai hubungan dengan lipogenesis adalah *peroxisome proliferator activated receptor- γ* .⁵²

2.7. Krim

Krim (*cremores*) merupakan bentuk sediaan kosmetik setengah padat yang berupa emulsi dengan kandungan satu atau lebih dari bahan obat yang larus serta terdispersi pada bahan dasar dan mengandung air tidak kurang dari 60%. Krim terdiri dari dua jenis yaitu krim minyak dalam air dan air dalam minyak. Krim yang bisa dicuci air ditujukan pada penggunaan kosmetik dan estetika. Stabilitas krim dapat rusak apabila sistem campurannya terganggu oleh adanya perubahan suhu atau komposisi, seperti adanya peningkatan dalam salah satu fase secara berlebihan. Krim dapat diencerkan melalui teknik aseptis, sehingga penggunaannya terbatas dalam dalam kurun waktu satu bulan.

Kris mempunyai bahan pengemulsi yang disesuaikan dengan jenis dan sifat krim yang diharapkan. Bahan yang digunakan untuk pengemulsi krim diantaranya adalah emulgid, setasium, lemak bulu domba, stearil alkohol, setilalkohol, polisorbat, golongan sorbitan, PEG, dan sabun. Metilparaben (nipagin) merupakan bahan pengawet yang umum digunakan pada krim yaitu 0,12-0,18%, sementara

untuk propilparaben (nipasol) adalah 0,02-0,05%. Pembuatan krim dapat dilakukan dengan melelehkan lemak, lemak dilebur di atas penangas air, kemudian ditambahkan pada bagian airnya dari zat pengemulsi, dan akhirnya diaduk hingga terbentuk sebuah campuran dalam berbentuk krim.⁵³

Krima mempunyai kelebihan dalam penyebaran secara merata, mudah dibersihkan atau dicuci, praktis, cara kerja berlangsung pada jaringan setempat, memberikan rasa dingin (*cold cream*) berupa tipe a/m, tidak lengket terutama tipe m/a, bahan untuk pemakaian topikal jumlah yang diabsorpsi tidak cukup beracun dan digunakan sebagai kosmetik. Adapun keterbatasan dari sediaan krim adalah susah dalam pembuatannya, sebab dalam pembuatan krim dilakukan dalam keadaan panas. Gampang pecah karena pada pembuatan formula tidak pas, mudah kering dan rusak khususnya pada tipe a/m disebabkan oleh gangguan pada sistem campuran terutama oleh perubahan pada suhu dan komposisi pada penambahan salah satu fase secara berlebihan. Kris kosmetik kopi dalam bentuk salep diketahui bahwa kadar salep ekstrak biji kopi robusta tertinggi (90%) menunjukkan nilai tertinggi dari pada konsentrasi 22,5%, sedangkan salep ekstrak biji kopi konsentrasi 45% menunjukkan nilai rerata jumlah sel plasma dan fibroblas tertinggi dibandingkan salep ekstrak biji kopi 90%. Secara keseluruhan ekstrak biji kopi Robusta salep 45% dapat memberikan pengaruh yang baik terhadap proses penyembuhan luka karena pada konsentrasi ini jumlah fibroblas meningkat secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol, sehingga besaran ekstrak salep kopi Robusta dapat meningkatkan proses penyembuhan luka kulit.⁵⁴ Namun berdasarkan karakteristik fisik (pH, daya sebar dan viskositas)

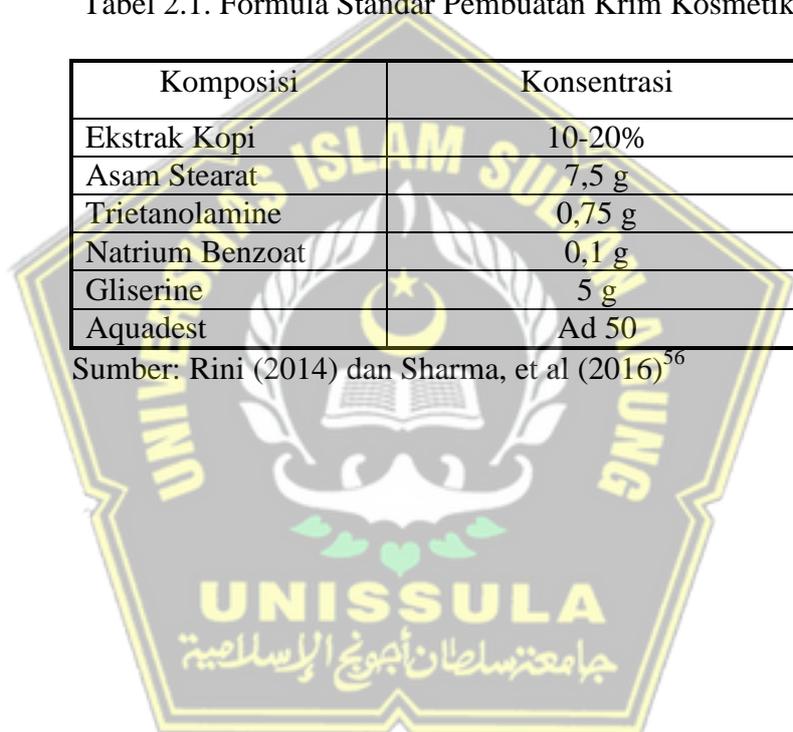
serta aseptabilitas dari formula yang dibuat, formula dengan konsentrasi 15% adalah yang terbaik karena memberikan karakteristik fisik dan septabilitas sediaan yang paling baik adapun untuk nilai antioksidan formula dengan konsentrasi 20% memiliki nilai persen inhibisi antioksidan tertinggi,⁵⁵

Berdasarkan hal itu maka komposisi formula pembuatan krim kosmetik berdasarkan Textbook of Cosmetic Formulation, adalah sebagai berikut:

Tabel 2.1. Formula Standar Pembuatan Krim Kosmetik

Komposisi	Konsentrasi
Ekstrak Kopi	10-20%
Asam Stearat	7,5 g
Trietanolamine	0,75 g
Natrium Benzoat	0,1 g
Gliserine	5 g
Aquadest	Ad 50

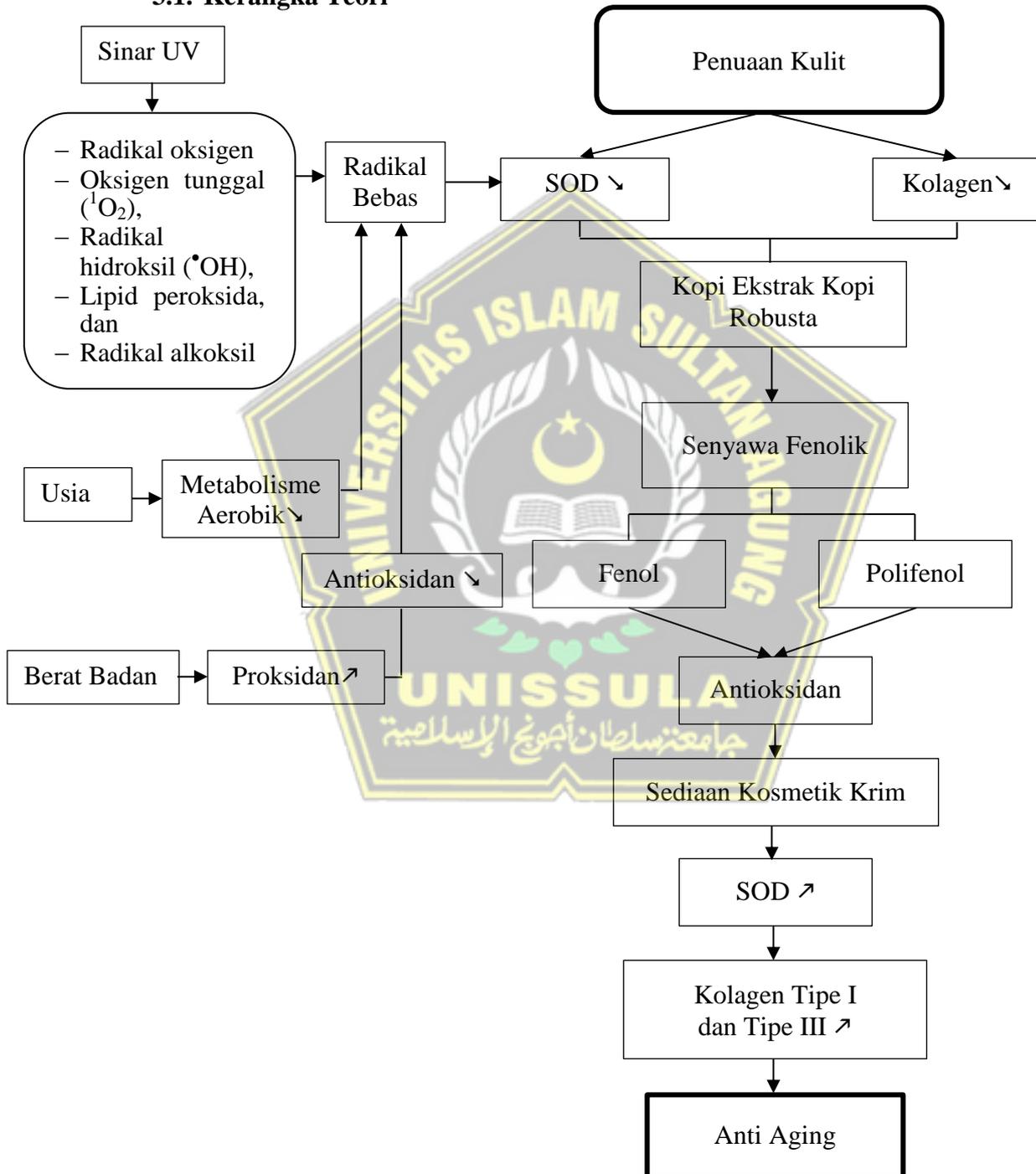
Sumber: Rini (2014) dan Sharma, et al (2016)⁵⁶



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Teori



Gambar 3.1. Kerangka Teori

Keterangan:

Pertambahan usia (penuaan) menyebabkan tingginya produksi radikal bebas secara fisiologis sebagai hasil dari metabolisme tubuh, adapun produksi antioksidan yang dibutuhkan dalam menetralkan radikal bebas pada sel maupun antioksidan dari luar cenderung sedikit. Ketidakseimbangan pada radikal bebas dengan antioksidan disebut sebagai stres oksidatif.²⁰ Stres oksidatif merupakan sebuah situasi adanya ketidakseimbangan antara ROS dengan kemampuan pertahanan antioksidan, hal ini disebabkan oleh tingginya produksi ROS serta rendahnya produksi antioksidan.

SOD adalah enzim antioksidan yang berada di garis depan pada sistem pertahanan tubuh yang berfungsi sebagai katalis pada dismutasi anion superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. SOD mempunyai kemampuan dalam menetralkan aktivitas dari radikal bebas dengan cara merubah anion superoksida menjadi oksigen (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikalisme pada radikal bebas dapat diredam melalui antioksidan SOD yang mempunyai kemampuan dalam mendonasikan elektronnya sehingga radikal bebas menjadi lebih stabil. SOD mempunyai mekanisme kerja dengan mencegah aktivitas reseptor dan ekspresi gen-gen AP-1 dan MMP. SOD bekerja dengan mengaktifkan jalur sintesis kolagen dengan mengaktifkan ekspresi gen TGF-b dan prokolagen.⁵⁷ Potensi yang dimiliki oleh SOD dalam mengeliminasi radikal bebas dengan jumlah yang berlebih digunakan sebagai senyawa aktif bahan sediaan krim kosmetik untuk mengatasi penuaan pada kulit.

Kopi mengandung senyawa fenolik yang merupakan antioksidan sebagai perlindungan pada efek oksigen radikal bebas sebagai antioksidan, sehingga dapat meminimalisir kerusakan sel (*radical scavenger*) melalui mekanisme penghambatan peroksidasi lipid.⁸ Senyawa fenolik adalah senyawa yang paling besar perannya sebagai antioksidan alami yang terdapat pada tumbuhan. Senyawa fenolik mempunyai satu (fenol) atau lebih (polifenol) cincin fenol, yaitu gugus hidroksi yang terikat pada cincin aromatis sehingga dengan mudah dapat teroksidasi dengan memberi atom hidrogen pada radikal bebas. Reaksi oksidasi mempunyai kemampuannya dalam membentuk radikal fenoksi yang stabil sehingga menyebabkan fenolik mempunyai potensi sebagai antioksidan.⁹ Antioksidan mempunyai manfaat yang besar sebagai pencegah penuaan dan penyakit degeneratif. Penuaan merupakan proses yang terjadi pada setiap makhluk hidup yang mengakibatkan terjadinya perubahan progresif pada organ tubuh termasuk kulit.⁴³

Flavonoid merupakan antioksidan yang terdapat pada kopi. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang cukup besar pada tanaman serta berbagai bahan makanan dengan berbagai konsentrasi. Polifenol merupakan salah satu dari komponen bioaktif non gizi yang mampu memberikan pengaruh fungsional kesehatan pada tubuh. Senyawa polifenol banyak terdapat pada kopi, teh, kakao, rempah-rempah, sereal, biji-bijian, sayuran, bunga, dan lain sebagainya. Tingginya senyawa polifenol pada tumbuhan menunjukkan besar aktifitasnya sebagai antioksidan. Polifenol adalah senyawa kimia yang mampu bekerja sebagai antioksidan kuat pada kopi.¹⁸ Antioksidan yang ada pada kopi merupakan

polifenol yang mempunyai peran sebagai antioksidan kuat dan membantu pertumbuhan jumlah kolagen dalam tubuh.¹⁸

Faktor perancu dalam penelitian ini adalah sinar UV, Usia dan berat badan. Sinar UV adalah sumber utama pembentukan ROS, karena sinar dari UV melisiskan air menjadi radikal OH. Radiasi UV dapat mengakibatkan terjadinya peningkatan radikal bebas yang terbentuk karena radiasi UV berbentuk radikal oksigen, oksigen tunggal ($^1\text{O}_2$), lipid peroksida, radikal hidroksil ($\cdot\text{OH}$), dan radikal alkoksil. Molekul $^1\text{O}_2$ yang dihasilkan oleh radiasi UV adalah faktor utama yang mempunyai peran dalam proses induksi radikal bebas. Oksidasi lipid oleh $^1\text{O}_2$ mengakibatkan terbentuknya lipid peroksida dalam asam lemak terutama pada asam lemak tidak jenuh rantai panjang dan membran sel yang mengakibatkan ketidakstabilan dan kerusakan membran sel yang luas.⁵⁰

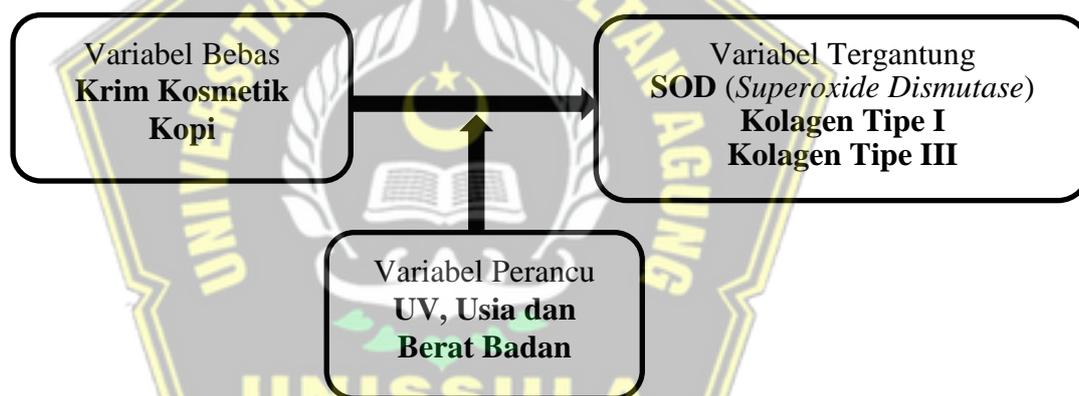
Pertambahan usia juga menjadi faktor pemicu tingginya produksi ROS. Seiring dengan bertambahnya usia, keseimbangan antara radikal bebas dan fungsi pertahanan dari antioksidan semakin berkurang yang disebabkan karena cadangan antioksidan berkurang dan jumlah radikal bebas semakin bertambah. Radikal bebas dapat terbentuk dari metabolisme aerobik ataupun pada keadaan patofisiologis. Radikal bebas merusak integritas sel, yaitu fosfolipid (penyusun membran sel), DNA, dan protein (enzim, reseptor, antibodi). Kadar yang tidak seimbang antara antioksidan dan *Reactive Oxygen Species* menyebabkan stres oksidatif dan penuaan.¹³

Stres oksidatif yang tinggi terjadi juga disebabkan karena berat badan. Pada kondisi obesitas dapat memicu tumbuhnya kondisi stres oksidatif disebabkan oleh

ketidakseimbangan peroksidan dan antioksidan pada tubuh. Seseorang yang memiliki berat badan berlebih mengalami lipogenesis berlebih, sehingga menghambat lipolisis. Lipogenesis dirangsang oleh diet tinggi karbohidrat. *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1* (SREBP-1) adalah mediator penting dalam kerja pro-lipogenik atau anti-lipogenik lain yang mempunyai hubungan dengan lipogenesis adalah *peroxisome proliferator activated receptor- γ* .⁵²

3.2. Kerangka konsep penelitian

Konsep penelitian ini dapat dilihat dalam bentuk bagan sebagai berikut:



Gambar 3.2 Bagan konsep penelitian

3.3. Hipotesis

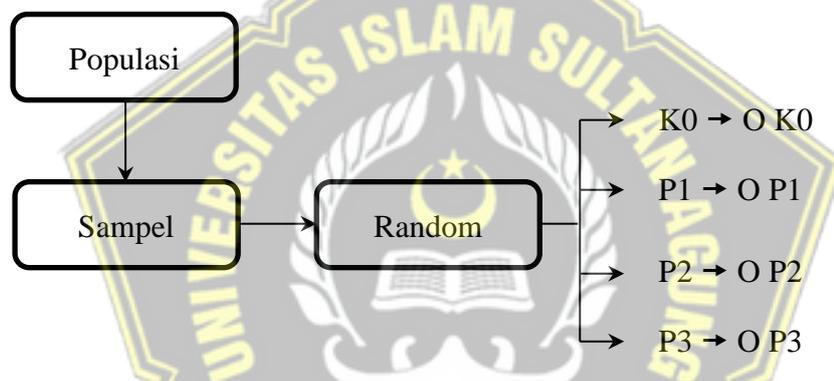
1. Terdapat pengaruh pemberian krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20% terhadap penurunan kapasitas total kadar SOD pada proses penuaan kulit wistar betina
2. Terdapat pengaruh pemberian krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 10%, 15% dan 20% terhadap peningkatan jumlah kolagen (tipe I dan III) pada proses penuaan kulit wistar betina.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain true eksperimen design dengan rancangan penelitian *post test only group design*. Data yang diukur adalah rerata kapasitas total kadar SOD dan jumlah kolagen (tipe I dan tipe III) pada proses penuaan kulit wistar betina.



Gambar 4.1. Desain Penelitian

Keterangan:

K0 : Kelompok tanpa perlakuan

P1 : Kelompok perlakuan diberi krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 10%

P2 : Kelompok perlakuan diberi krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 15%

P1 : Kelompok perlakuan diberi krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 20%

O K0 : Observasi kapasitas total kadar SOD dan Jumlah Kolagen Tipe I & III kelompok kontrol

- O P1 : Observasi kapasitas total kadar SOD dan Jumlah Kolagen Tipe I & III pada kelompok perlakuan dengan pemberian krim kosmetik kopi konsentrasi 10%
- O P2 : Observasi kapasitas total kadar SOD dan Jumlah Kolagen Tipe I & III pada kelompok perlakuan dengan pemberian krim kosmetik kopi konsentrasi 15%
- O P3 : Observasi kapasitas total kadar SOD dan Jumlah Kolagen Tipe I & III pada kelompok perlakuan dengan pemberian krim kosmetik kopi konsentrasi 20%

4.2. Waktu dan Tempat Penelitian

4.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2021.

4.2.2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah wistar betina tua (*Rattus norvegicus*) dengan berat 200-250 gram yang berumur 14-16 bulan dan telah dikondisikan atau diadaptasikan serta diberi makan selama 4 hari. Wistar betina sesuai untuk penelitian yang berkaitan dengan penyakit manusia karena mempunyai organisasi

DNA dan ekspresi gen yang sama yaitu 95% gen pada manusia mempunyai gen yang sesuai pada wistar. Wistar juga mempunyai sistem reproduksi, penyakit, sistem syaraf serta tingkat kecemasan yang sama dengan manusia. Adanya penelitian yang melakukan manipulasi terhadap gen pada wistar dapat digunakan dalam pengembangan terkait dengan penyakit pada manusia, serta memberikan informasi terkait dengan fisiologis pada manusia dan penyebab timbulnya penyakit.⁵⁸

4.3.2. Sampel

Penelitian yang akan dilakukan terbagi dalam 4 kelompok, yaitu variasi konsentrasi krim kopi terdiri dari 0% (kontrol); 10%, 15% dan 20%. Berdasarkan pada karakteristik yang terdapat dalam fisik (viskositas, pH dan daya sebar) dan aseptabilitas pada formula yang disiapkan, maka formula dengan konsentrasi 15% merupakan dosis yang paling baik karena memberikan karakteristik fisik dan septabilitas sediaan krim kosmetik yang terbaik, sedangkan untuk kandungan antioksidan pada formula yang diberikan konsentrasi 20% mempunyai prosentase inhibisi pada antioksidan yang paling tinggi.⁵⁵ Sampel dihitung menggunakan rumus Federer, yaitu:

$(n-1)(t-1) > 15$, dimana:

n = besar sampel

t = jumlah kelompok

$(n-1)(t-1) > 15$

$(n-1)(4-1) > 15$

$(n-1)3 > 15$

$$n-1 > 5$$

$$n > 5 + 1 = 6 \text{ ekor per kelompok}$$

Berdasarkan perhitungan diketahui bahwa jumlah sampel secara keseluruhan adalah 24 wistar betina yang terbagi untuk masing-masing kelompok adalah 6 ekor dalam 4 kelompok perlakuan, yaitu:

1. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol (P0) yang tidak diberikan krim kosmetik kopi.
2. Kelompok kedua adalah kelompok uji 1 (P1) yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 10%.
3. Kelompok ketiga adalah kelompok uji 2 (P2) yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 15%.
4. Kelompok keempat adalah kelompok uji 3 (P3) yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 20%.

4.3.3. Sampling

Penelitian ini menggunakan random sampling.

4.4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.4.1. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi sampel dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Wistar betina sehat.
2. Umur 14-16 bulan
3. Berat badan sebelum perlakuan 200-250 gram.
4. Tidak ada kelainan anatomis.
5. Sehat dan aktif selama masa adaptasi.

6. Penempatan kandang, ditempatkan pada tempat yang sama (di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang).

4.4.2. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dari sampel penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Wistar betina mati selama perlakuan berlangsung (*drop out*)
2. Wistar betina sakit selama masa adaptasi selama 4 hari (gerakan tidak aktif).

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1. Variabel bebas (independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi krim kosmetik kopi dengan variasi 10%, 15% dan 20%.

4.5.2. Variabel terikat (dependen)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kapasitas total kadar SOD dan jumlah kolagen (tipe I dan tipe III) pada proses penuaan kulit wistar betina.

4.5.3. Variabel prakondisi

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah makanan serta minuman.

4.6. Definisi Operasional

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah krim kosmetik kopi. Krim kosmetik kopi merupakan biji kopi green bean robusta yang telah dikeringkan kedalam oven dengan suhu 40°C sampai kadar airnya kurang dari 10%, kemudian dihaluskan, diekstrak dan dibuat menjadi krim dan diperoleh langsung dari Kopi Lawu yang beralamatkan di Gondang,

RT.004/RW.003, Gondang, Jabung, Panekan, Kabupaten Magetan, Jawa Timur. Konsentrasi krim kosmetik adalah 10%, 15% dan 20%. Skala data ordinal. Kopi mengandung senyawa fenolik merupakan senyawa yang mempunyai sifat antioksidan.

2. Variabel Tergantung

a. SOD

Serum wistar betina diperiksa pada hari ke-21 yaitu dengan mengukur kapasitas total kadar SOD menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay*). Darah yang telah diambil dilakukan sentrifugasi dan dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Plasma yang didapat dilakukan pemeriksaan kadar SOD dengan metode ELISA (*Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay*). *Superoxide dismutase* (SOD) adalah salah satu enzim antioksidan utama yang menangkal radikal bebas.^{59,60} Kolagen Tipe I dan III Jumlah kolagen diukur melalui pengamatan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan *camera/optilab* dengan pembesaran 400×. Gambar yang telah didapatkan selanjutnya diolah dengan menggunakan *software ImageJ* untuk mengetahui persentase kepadatan kolagen,⁶¹ selanjutnya untuk spesifikasi kolagen tipe I dan III diukur melalui metode imunohistokimia (IHK).⁶² Kolagen tipe I dan III positif bila terdapat warna kecoklatan di area dermis superfisial. Selanjutnya untuk spesifikasi kolagen tipe I dan III diukur melalui metode imunohistokimia (IHK).⁶² Kolagen tipe I dan III positif bila terdapat warna kecoklatan di area dermis superfisial.

4.7. Cara pengumpulan data

4.7.1. Alat dan bahan

1. Alat

- a. Scapel
- b. Sarung tangan steril
- c. Pisau cukur
- d. Gunting
- e. Cotton bud
- f. Kain kasa
- g. Kandang wistar

2. Bahan

- a. Krim kosmetik kopi
- b. Makanan wistar

4.8. Prosedur Kerja

4.8.1. Pembuatan Ekstrak Biji Kopi

Ekstrak biji kopi dibuat dengan memasukkan biji kopi ke dalam oven dengan suhu 40°C hingga konsentrasi air tidak lebih dari 10% yang selanjutnya dihaluskan. Ekstrak dari biji kopi diukur dengan menggunakan timbangan digital sebanyak 500 gram yang kemudian dimaserasi menggunakan larutan etanol 7% sebanyak 3750 ml pada bejana. Pelaksanaan maserasi dilakukan selama 3 × 24 jam dengan sesekali dilakukan pengadukan (pengadukan dilakukan 3 kali dalam sehari). Hasil maserasi kemudian dilakukan penyaringan dengan kain flanel sampai didapatkan maserat. Maserat yang diperoleh selanjutnya dipekatkan

dengan *rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental. Hasil ekstrak dari 500 gram biji kopi \pm 50 gram ekstrak kental.

4.8.2. Penyediaan krim kosmetik kopi

Biji kopi yang telah diproses menjadi ekstrak kental hingga menjadi krim yang diperoleh langsung dari Kopi Lawu yang beralamatkan di Gondang, RT.004/RW.003, Gondang, Jabung, Panekan, Kabupaten Magetan, Jawa Timur ditempatkan pada wadah yang steril. Adapun formula krim kosmetik kopi adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1. Formula Krim Kosmetik Kopi

Komposisi	Konsentrasi		
	10%	15%	20%
Ekstrak Kopi	5 g	7,5 g	10 g
Asam Stearat	7,5 g	7,5 g	7,5 g
Trietanolamine	0,75 g	0,75 g	0,75 g
Natrium Benzoat	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Gliserine	5 g	5 g	5 g
Aquadest	31.65 gr	29.15 gr	26.65 gr

1. Krim kopi dengan konsentrasi 10%

Formula pembuatan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 10% ini dilakukan dengan mencampurkan 5 g ekstrak kopi, 7,5 g asam stearat, 0,75 g trietanolamine, 0,1 g natrium benzoat, 5 g gliserine dan ditambahkan 31,65 g aquadest.

2. Krim kopi dengan konsentrasi 15%

Formula pembuatan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 15% ini dilakukan dengan mencampurkan 7,5 g ekstrak kopi, 7,5 g asam stearat, 0,75 g

trietanolamine, 0,1 g natrium benzoat, 5 g gliserine dan ditambahkan 29,15 g aquadest.

3. Krim kopi dengan konsentrasi 20%

Formula pembuatan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 20% ini dilakukan dengan mencampurkan 10 g ekstrak kopi, 7,5 g asam stearat, 0,75 g trietanolamine, 0,1 g natrium benzoat, 5 g gliserine dan ditambahkan 26,65 g aquadest.

4.8.3. Langkah kerja

1. Sebelum melakukan penelitian, wistar betina di adaptasikan selama 4 hari di laboratorium dan diberi makan.
2. Penelitian menggunakan sampel sebanyak 24 ekor wistar betina dibagi menjadi 4 kelompok (berdasarkan rumus Federer) dikandangkan ke dalam kelompok masing-masing.
3. Menyiapkan alat dan bahan.
4. Mencukur bulu pada punggung wistar betina dengan menggunakan pisau cukur.
5. Setelah dilakukan tindakan pencukuran, lakukan tindakan *antiseptic* dengan pemberian alkohol 70%.
6. Wistar betina diberi perlakuan sesuai dengan kelompok perlakuan
7. Pada setiap kelompok diberi perlakuan sebagai berikut.
 - a. Kelompok pertama adalah kelompok uji 1 (P1) yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 10%.
 - b. Kelompok kedua adalah kelompok uji 2 (P2) yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 15%.
 - c. Kelompok ketiga adalah kelompok uji 3 (P3) yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 20%.

- d. Kelompok keempat adalah kelompok kontrol (P0) yang tidak diberikan krim kosmetik kopi.
8. Pemberian krim kosmetik kopi dilakukan 1 kali sehari pada jam yang sama selama 21 hari, hal ini sebagaimana penelitian Nuzantry dan Widayanti yang melakukan penelitian tentang pemberian ekstrak aloe vera dan olive oil dalam mencegah kekeringan pada kulit, hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak aloe vera dan olive oil yang dioleskan di punggung hingga paha atas selama 21 hari meningkatkan kelembapan pada kulit dan efektif mencegah kekeringan kulit.⁶³

4.9. Pengamatan

1. Pengamatan secara makroskopis mengenai kapasitas total kadar SOD dan jumlah kolagen (tipe I dan tipe III) proses penuaan kulit wistar betina. Pengukuran kapasitas total kadar SOD dan jumlah kolagen tipe I dan tipe III setiap kelompok wistar betina dilakukan mulai hari ke-21. Hal ini mengacu pada penelitian Nuzantry dan Widayanti yang melakukan penelitian tentang pemberian ekstrak aloe vera dan olive oil dalam mencegah kekeringan pada kulit, hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak aloe vera dan olive oil yang dioleskan di punggung tangan selama 21 hari meningkatkan kelembapan pada kulit dan efektif mencegah kekeringan kulit,⁶³ hal ini dapat diasumsikan bahwa pemberian krim efektif meningkatkan jumlah kolagen setelah 21 hari.
2. Pengukuran kapasitas total kadar SOD menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay*). Darah yang telah diambil dilakukan sentrifugasi dan dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Plasma yang didapat dilakukan pemeriksaan kadar SOD dengan metode ELISA (*Enzyme Linked*

Immune-Sorbent Assay). Superoxide dismutase (SOD) adalah salah satu enzim antioksidan utama yang menangkal radikal bebas.^{59,60} Proses pemeriksaan kadar SOD plasma dilakukan metode ELISA (*Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay*). Adapun langkah-langkah metode ELISA adalah sebagai berikut:

- a. Siapkan reagen, sampel dan larutan standart. Usahakan sudah berada dalam suhu ruang +/- 30 menit sebelum larutan dipakai.
- b. Ambil plate dan strip yang berisi sumuran sesuai kebutuhan, untuk strip yang tidak dipakai bisa disimpan dalam pendingin dengan suhu 2-8°C.
- c. Masukkan 50µl larutan standart ke dalam sumuran. catatan : tidak perlu menambahkan antibody, karena didalam larutan standart sudah mengandung antibody
- d. Masukkan 40µl sampel kedalam sumuran dan tambahkan 10µl anti-SOD antibody ke dalam sumuran yang berisi sampel, setelah itu tambahkan 50µl streptavidin-HRP kedalam sumuran standart dan sampel (kecuali kontrol negatif), campur larutan dan tutup dengan sealer lalu inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1 jam.
- e. Buka sealer dan cuci sumuran selama 5x dengan buffer cuci sebanyak 0,35 ml setiap sumuran sampai sumuran penuh, dan serap menggunakan tisu hingga kering.
- f. Masukkan 50µl larutan substrat A dan 50µl larutan substrat B kedalam semua sumuran, lalu inkubasi kedalam inkubator dengan suhu 37°C dengan kondisi tertutup (gelap) selama 10 menit (hingga larutan berubah dari bening menjadi biru)

- g. Keluarkan plate berisi sumuran tambahkan 50 µl larutan stop kedalam sumuran, larutan akan berubah dari warna biru menjadi kuning. selanjutnya masukkan plate ke dalam elisa reader untuk dibaca absorbansi warnanya dengan panjang gelombang baca 450 nm (hasil valid untuk pembacaan dilakukan dibawah 10 menit)

Jumlah kolagen diukur melalui pengamatan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan *camera/optilab* dengan pembesaran 400×. Gambar yang telah didapatkan selanjutnya diolah dengan menggunakan *software* ImageJ untuk mengetahui persentase kepadatan kolagen,⁶¹ selanjutnya untuk speksifikasi kolagen tipe I dan III diukur melalui metode imunohistokimia (IHK).⁶² Kolagen tipe I dan III positif bila terdapat warna kecoklatan di area dermis superfisial. Adapun langkah-langkah metode pemulasan imunohistokimia (IHK) adalah sebagai berikut:

- 1) Deparafinisasi (Xylene I, Xylene II dan Xylene III) @ 5 menit
- 2) Rehidrasi (Ethanol 100%, 90% dan 70%) @ 5 menit
- 3) Cuci slide di bawah air mengalir
- 4) Siapkan 500 – 600 ml Aquabides untuk “Cuissine Art”
- 5) Epitope Retrieval 10 X (1 : 9) 20 ml Epitope Retrieval + 180 ml Aquabides di wadah untuk memanaskan slide
- 6) Nyalakan alat dan pindahkan ke menu HI dan waktu 60 menit
- 7) Dinginkan di suhu ruang agar epitope tetap masih bekerja untuk membuka jaringan
- 8) Cuci dalam larutan PBS pencuci 2 x 5 menit
- 9) Novopen (untuk memberikan batasan pada jaringan)
- 10) PEROXIDASE BLOCK 5 menit

- 11) Cuci dalam larutan PBS pencuci 2 x 5 menit
 - 12) PROTEIN BLOCK 5 menit
 - 13) Cuci dalam larutan PBS pencuci 2 x 5 menit
 - 14) Inkubasi secara optimal antibody primer 60 menit, pada tahap ini dilakukan speksifikasi kolagen tipe I dan III.
 - 15) Bilas dengan PBS cuci 2 x 5 menit
 - 16) Inkubasi dengan Post Primary Block 30 menit
 - 17) Bilas dengan PBS cuci 2 x 5 menit
 - 18) Inkubasi dengan Novolink Polymer 30 menit
 - 19) Bilas dengan PBS cuci 2 x 5 menit
 - 20) DAB 1:205 menit
 - 21) Tambahkan 20 ul dari DAB Chromogen ke 400 ml dari SUBSTRATE Chromogen 5 menit
 - 22) Bilas dengan Aquades 5 menit
 - 23) Haematoxylin 2 x 5 menit
 - 24) Bilas dengan Aquades 2 x 5 menit
 - 25) Dehidrasi (Ethanol 70%, 90%, 100%) @ 5 menit
 - 26) Clearing (Xylene I, Xylene II dan Xylene III) @ 5 menit
 - 27) Teteskan Enthelan dan tutup dengan cover slide @ 5 menit
3. Hasil yang diperoleh dari masing-masing kelompok diuji statistic dengan menggunakan SPSS.

4.10. Etika Penggunaan Hewan Percobaan

Menurut Hanafiah dan Amir,⁶⁴ hewan percobaan akan mengalami berbagai keadaan luar biasa yang menyebabkan penderitaan, seperti rasa nyeri,

ketidaknyamanan, ketidak seimbangan, dan pada akhirnya kematian. Sebagai bangsa yang beradab hewan percobaan yang menderita untuk kebaikan manusia, wajib dihormati hak azasinya dan diperlakukan secara manusiawi. Penelitian kesehatan dengan menggunakan hewan percobaan secara etis dapat dipertanggung jawabkan dengan ketentuan:

1. Tujuan penelitian dinilai cukup bermanfaat.
2. Desain penelitian dapat menjamin bahwa penelitian mencapai tujuannya.
3. Tujuan penelitian tidak dapat dicapai menggunakan subjek atau prosedur alternatif.
4. Manfaat yang akan diperoleh jauh lebih berarti dibandingkan dengan penderitaan yang dialami oleh hewan tersebut.

Beberapa prinsip dasar dalam etika penelitian adalah sebagai berikut:

1. Untuk menjamin pengetahuan biologi dan pengembangan cara-cara lebih baik dalam melindungi kesehatan dan kesejahteraan manusia, diperlukan pada spesies hewan yang utuh. Ini dilakukan setelah pertimbangan yang seksama karena jika layak, harus digunakan metode seperti model matematika, simulasi komputer, dan sistem *in vitro*.
2. Hewan yang dipilih untuk penelitian harus sesuai spesies dan mutunya serta jumlahnya hendaknya sekecil mungkin, namun hasil penelitiannya absah secara ilmiah.
3. Peneliti dan tenaga kerja lainnya harus memperlakukan hewan percobaan sebagai makhluk perasa, memperhatikan pemeliharaan dan pemanfaatannya secara memahami cara mengurangi penderitaannya.

4. Peneliti harus menganggap bahwa prosedur yang menimbulkan rasa nyeri pada manusia, juga menimbulkan rasa nyeri pada spesies bertulang belakang termasuk primata.
5. Pada akhir penelitian bahkan pada waktu dilakukan percobaan, hewan yang menderita nyeri hebat atau terus menerus menjadi cacat yang tidak dapat dihilangkan harus dimatikan tanpa rasa nyeri.
6. Hewan yang akan dimanfaatkan untuk penelitian hendaknya dipelihara dengan baik, termasuk kandang, makan, air minum, transportasi dan cara penanganan sesuai tingkah laku dan kebutuhan biologik tiap spesies.
7. Pimpinan lembaga yang memanfaatkan hewan percobaan bertanggung jawab penuh atas segala hal yang tidak mengikuti etik pemanfaatan hewan percobaan dilembaganya sebaliknya pimpinan wajib menjaga keselamatan dan kesehatan para pengelola, dengan cara:
 - a. Pemeriksaan kesehatan setiap satu tahun sekali dan memberikan imunisasi terhadap penyakit-penyakit yang mungkin ditularkan akibat pekerjaannya.
 - b. Menyediakan alat pelindung seperti masker, sarung tangan, sepatu karet atau pelindung sepatu, tutup kepala, pelindung mata, dan jas laboratorium.
 - c. Menyediakan fasilitas fisik ruangan maupun peralatan yang memenuhi persyaratan keamaan kerja dan ergonomik sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya kecelakaan,
 - d. Penangan limbah yang baik dan benar untuk mencegah terjadinya pencemaran.

Dalam hal memanfaatkan hewan percobaan untuk penelitian kesehatan digunakan prinsip 3R, yaitu *replacement*, *reduction*, dan *refinement*.

1. *Replacement*

Ada dua alternatif untuk *replacement*, yaitu:

- a. Replacement relatif: yaitu tetap memanfaatkan hewan percobaan sebagai donor organ, jaringan, atau sel.
- b. Replacement absolut, yaitu tidak memerlukan bahan dari hewan, melainkan pemanfaatan galur sel (*cell lines*) atau program komputer.

2. *Reduction*

Mengurangi pemanfaatan jumlah hewan percobaan sehingga sesedikit mungkin, dengan bahan bantuan ilmu statistik, program komputer, dan teknik-teknik biokimia.

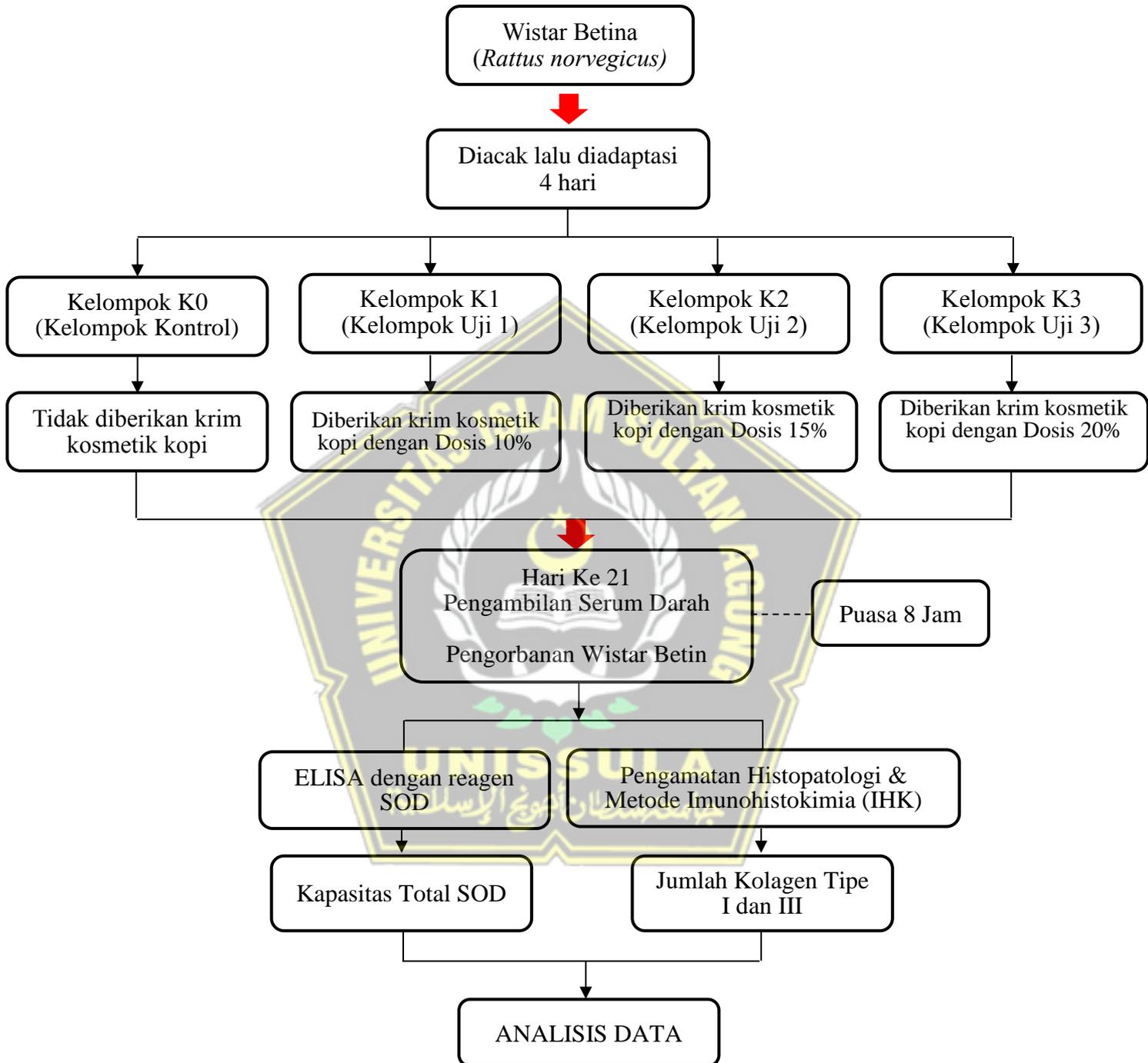
3. *Refinement*

Mengurangi ketidaknyamanan yang diderita oleh hewan percobaan sebelum, selama, dan setelah penelitian, misalnya pemberian analgetik.

4.11. Cara Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis secara statistik non parametrik dengan *Kruskal Wallis Test*. Analisis statistik ini menggunakan program SPSS (*Statistical Product and Service Solution*) dan $p < 0,05$ dipilih sebagai tingkat minimal signifikansinya. Dipilih *Kruskal Wallis Test* karena data penelitian tidak berdistribusi secara normal dan penelitian ini menggunakan lebih dari dua, kelompok untuk menguji generalisasi sehingga data sampel dianggap mewakili populasi. Selanjutnya apabila pada *Kruskal-Wallis Test* menghasilkan $p < 0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan *Mann Whitney Test*.⁶⁵

4.12. Alur Penelitian



Gambar 4.2. Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini dilakukan selama bulan Juni 2021 di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung, Semarang. Subjek penelitian ini adalah wistar betina tua (*Rattus norvegicus*) dengan berat 200-250 gram yang berumur 14-16 bulan dan telah dikondisikan atau diadaptasikan serta diberi makan selama 4 hari. Dalam penelitian ini dikumpulkan sampel sebanyak 6 wistar betina dan tidak ada yang eksklusi selama penelitian berlangsung. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok dengan 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol. Kelompok pertama (P0) adalah kelompok kontrol yang tidak diberikan krim kosmetik kopi, kelompok kedua (P1) adalah kelompok uji 1 yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 10%, kelompok ketiga (P2) adalah kelompok uji 2 yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 15% dan kelompok keempat (P3) adalah kelompok uji 3 yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 20%.

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Kapasitas Total Kadar SOD dan Jumlah Kolagen Tipe I dan III

Pengukuran kapasitas total kadar SOD menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay*). Darah yang telah diambil dilakukan sentrifugasi dan dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Plasma yang didapat dilakukan pemeriksaan kadar SOD dengan metode ELISA (*Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay*). Superoxide dismutase (SOD) adalah salah satu enzim

antioksidan utama yang menangkal radikal bebas.^{59,60} Jumlah kolagen diukur melalui pengamatan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan *camera/optilab* dengan pembesaran 400×. Gambar yang telah didapatkan selanjutnya diolah dengan menggunakan *software* ImageJ untuk mengetahui persentase kepadatan kolagen,⁶¹ selanjutnya untuk spesifikasi kolagen tipe I dan III diukur melalui metode imunohistokimia (IHK).⁶² Kolagen tipe I dan III positif bila terdapat warna kecoklatan di area dermis superfisial. Selanjutnya untuk spesifikasi kolagen tipe I dan III diukur melalui metode imunohistokimia (IHK).⁶² Kolagen tipe I dan III positif bila terdapat warna kecoklatan di area dermis superfisial.

Tabel 5.1. Data Total Kadar SOD dan Jumlah Kolagen Tipe I dan III

Variabel	Kelompok				Pvalue
	Kontrol n=6	P1 n=6	P2 n=6	P3 n=6	
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
Kadar SOD	1.42 ± 0.51	2.13 ± 0.27	1.73 ± 0.37	3.57 ± 2.42	
<i>Saphiro Wilk</i>	0.797	0.988	0.799	0.728	
<i>Levene Test</i>					0.000
<i>Kruskal-Wallis Test</i>					0.030
Kolagen Tipe I	3.83 ± 1.13	8.53 ± 3.12	6.62 ± 2.10	12.57 ± 3.91	
<i>Saphiro Wilk</i>	0.930	0.814	0.839	0.974	
<i>Levene Test</i>					0.011
<i>Kruskal-Wallis Test</i>					0.002
Kolagen Tipe III	4.65 ± 1.99	5.62 ± 2.04	7.74 ± 3.83	3.28 ± 1.45	
<i>Saphiro Wilk</i>	0.950	0.971	0.969	0.716	
<i>Levene Test</i>					0.303
<i>Kruskal-Wallis Test</i>					0.030

Berdasarkan data tentang kadar SOD dan jumlah kolagen Tipe I dan III dapat diketahui bahwa untuk kadar SOD terbesar adalah pada pemberian krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 20% dengan nilai Mean 3.57 ± 2.42 , hal ini

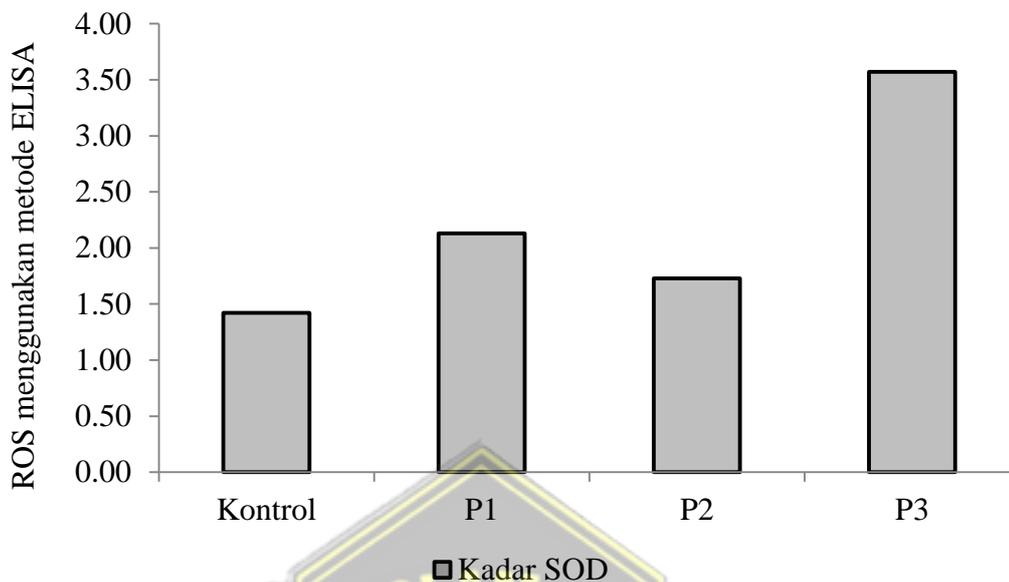
menunjukkan bahwa pemberian krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 20% mempunyai kontribusi paling besar dalam meningkatkan kadar SOD. Peningkatan kolagen tipe I paling besar pada pemberian krim kopi dengan konsentrasi 20% yaitu dengan nilai Mean 12.57 ± 3.91 , hal ini mengindikasikan bahwa pemberian krim kopi dengan konsentrasi 20% memberikan kontribusi paling tinggi dalam meningkatkan jumlah kolagen tipe I, namun untuk peningkatan jumlah kolagen tipe III justru pemberian krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 15% memberikan kontribusi paling besar yaitu dengan nilai Mean 7.74 ± 3.83 .

5.1.2. Pengaruh Pemberian Krim Kosmetik Kopi terhadap Kapasitas Total Kadar SOD

Kopi mengandung senyawa fenolik yang merupakan antioksidan sebagai perlindungan pada efek oksigen radikal bebas sebagai antioksidan, sehingga dapat meminimalisir kerusakan sel (*radical scavenger*) melalui mekanisme penghambatan peroksidasi lipid.⁸ Senyawa fenolik adalah senyawa yang paling besar perannya sebagai antioksidan alami yang terdapat pada tumbuhan. Senyawa fenolik mempunyai satu (fenol) atau lebih (polifenol) cincin fenol, yaitu gugus hidroksi yang terikat pada cincin aromatis sehingga dengan mudah dapat teroksidasi dengan memberi atom hidrogen pada radikal bebas.

Kopi terdiri dari berbagai komposisi yang mempunyai potensi sebagai antioksidan. Kandungan yang terdapat dalam kopi meliputi mineral mangan (Mn), tembaga (Cu) dan seng (Zn) yang mampu memberikan rangsangan dalam meningkatkan kinerja enzim superoxide dismutase (SOD). SOD merupakan kadar

serum yang menjadi indikator utama adanya antioksidan pada tubuh. SOD adalah antioksidan enzimatik endogen, sehingga keberadaan SOD sangat dibutuhkan oleh tubuh untuk memberikan keseimbangan stress oksidatif tubuh yang tinggi.⁴⁵ Kadar serum SOD yang rendah disebabkan oleh ketidakseimbangan antara antioksidan yang diproduksi dalam tubuh dengan jumlah radikal bebas dalam mekanisme metabolisme. Sintesis pada SOD mengalami gangguan akibat tingginya radikal bebas, sehingga mengakibatkan kadar SOD yang diproduksi oleh tubuh mengalami penurunan dan tidak mampu memberikan keseimbangan pada terbentuknya radikal bebas.⁴⁶ Kopi merupakan tanaman yang mengandung antioksidan eksogen mempunyai manfaat dalam meningkatkan enzim antioksidan endogen, seperti SOD, glutathion peroxidase (GPx) dan glutathion. Kopi mengandung flavanoid yang mampu bekerja sebagai antioksidan, yaitu melalui peningkatan kadar SOD yang mampu memberikan ion hidrogen serta elektron menuju anion superoksida, sehingga menjadikan lebih stabil dalam melindungi DNA dan lipo-protein pada oksidasi.⁴⁷ Pada penelitian ini peneliti mendapatkan hasil bahwa pemberian krim kosmetik kopi mampu meningkatkan kadar SOD tergantung pada besarnya konsentrasi.



Uji Kruskal-Wallis: *mean difference significant $p < 0,05$

Gambar 5.1. Grafik Kadar SOD pada Semua Kelompok Penelitian (* p signifikan $< 0,05$)

Tabel 5.2. Uji Mann Whitney Kadar SOD antar Kelompok Penelitian

Kelompok	Kelompok Pemanding	Signifikansi
Kontrol	P1*	0.041
	P2	0.180
	P3*	0.026
P1	Kontrol	0.041
	P2	0.093
	P3	0.818
P2	Kontrol	0.180
	P1	0.093
	P3	0.093
P3	Kontrol*	0.026
	P1	0.818
	P2	0.093

Berdasarkan gambar di atas tampak bahwa pemberian krim kosmetik kopi secara signifikan mempengaruhi peningkatan kadar SOD, namun pemberian krim kosmetik kopi tidak signifikan pada nilai konsentrasi 15%.

Pada data deskriptif kadar SOD masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Saphiro Wilk dan Uji Homogenitas dengan menggunakan Levene Test. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai tidak signifikan pada kelompok 3 (P3) dengan $p < 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi secara normal dan homogen, sehingga dilakukan uji non parametrik Kruskal-Wallis Test, dan dilanjutkan Mann Whitney Test. Uji beda Kruskal-Wallis Test didapatkan $p < 0,05$ dan hasil uji lanjut Kruskal-Wallis Test disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.1 dan tabel 5.2. pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$ antara pemberian krim kosmetik kopi pada konsentrasi 10% dan 20% dengan kelompok penelitian.

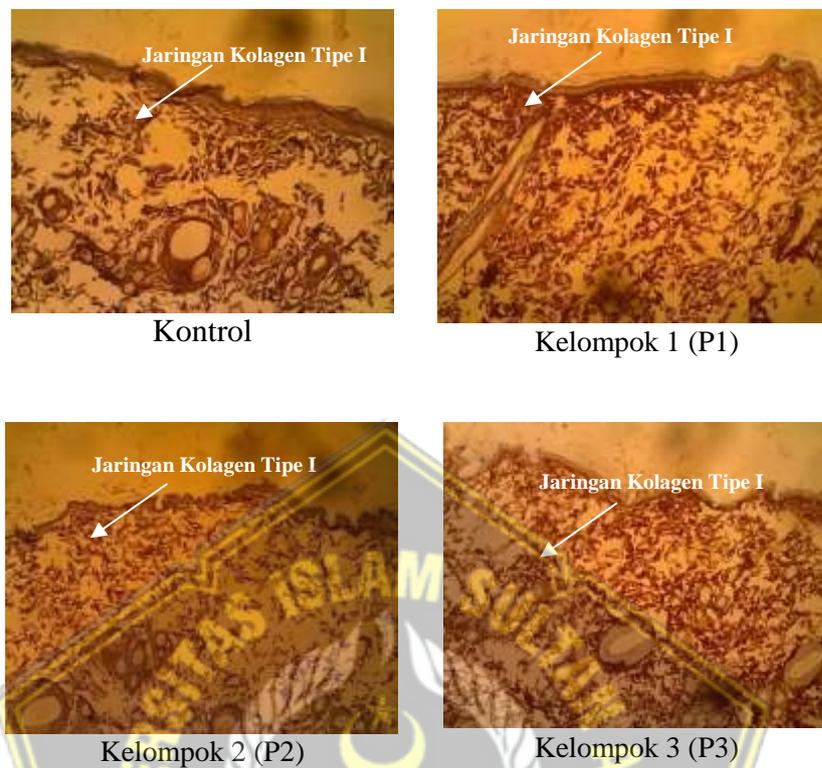
5.1.3. Pengaruh Pemberian Krim Kosmetik Kopi terhadap Jumlah Kolagen Tipe I

Kolagen adalah protein yang berupa tripel heliks yang ada di seluruh tubuh dengan fungsi sebagai pengikat jaringan, migrasi sel, perlekatan sel, morfogenesis jaringan, pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) dan perbaikan jaringan. Kolagen dengan jenis tipe I disintesis pada sel fibroblast dengan melalui dua proses, yaitu dalam dan luar sel. Pada proses yang terjadi dalam sel diawali dengan terbentuknya prokolagen dalam bentuk dua rantai peptida alpha dengan translasi di ribosom sepanjang retikulum endoplasma kasar (RER), selanjutnya rantai polipeptida dilepas menuju lumen RER. Sinyal peptide dilepaskan pada RER, sehingga rantai peptida menjadi rantai pro-alpha, sehingga terjadilah proses hidrosilasi lisin dan prolin asam amino pada lumen melalui kofaktor asam askorbat yang kemudian residu hidrosilin mengalami glikosilasi.

Pada retikulum endoplasma terbentuk tripel alpha helik, yang selanjutnya prokolagen dieksositis menuju badan golgi. Prokolagen yang terjadi dalam proses ekstrasel sudah dieksositosisa kemudian berubah menjadi tropokolagen oleh prokolagen peptidase. Beberapa tropokolagen membentuk fibril kolagen dengan *cross-linkng kovalen* dan fibril kolagen menjadi serabut kolagen. Kolagen kemudian menempel pada membran sel melalui beberapa protein, diantaranya yaitu fibronektin dan integrin.²⁹

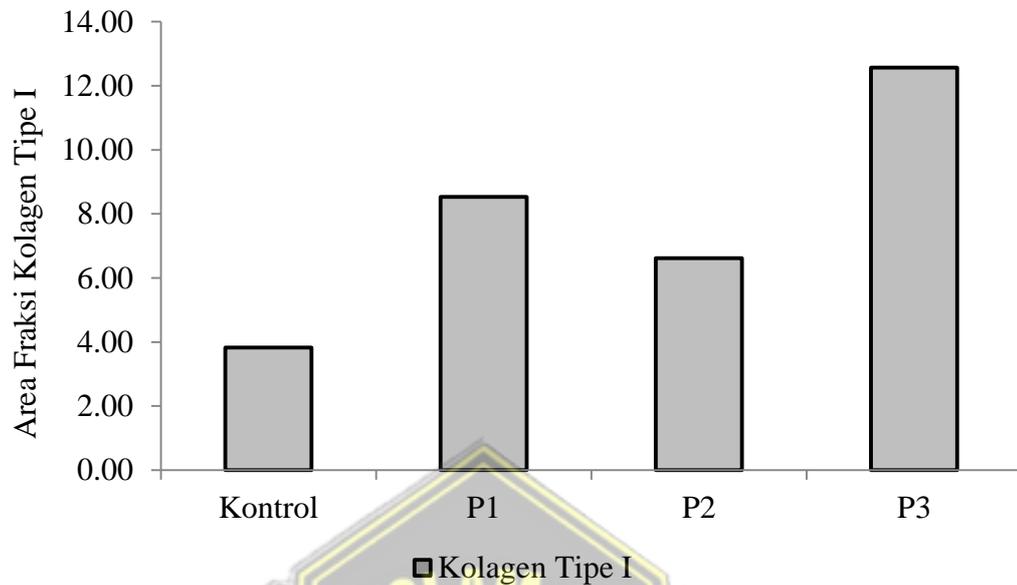
Kopi mempunyai kemampuan untuk meningkatkan produksi kolagen dan elastin yang berguna untuk memberi perlindungan terhadap berkurangnya kelembapan.⁶⁶ Kolagen dihasilkan dari aktivitas sel fibroblas, fibroblas merupakan sel paling umum pada jaringan ikat serta satu-satunya sel yang terdapat pada tendon. Meningkatnya jumlah sel fibroblas dengan pemberian krim kosmetik kopi, menyebabkan lebih banyaknya sel-sel tersebut menghasilkan molekul-milekul kolagen yang selanjutnya akan meningkatkan jumlah fibril-fibril kolagen.⁶⁷

Kandungan yang terdapat dalam kopi berupa kafein dan asam lorogenik yang mempunyai mekenisme sebagaimana asam hialuronat dengan meningkatkan tingkat kelembapan pada kulit serta menjaga kandungan air. Asam haluronat mempunyai fungsi sebagai pengatur keseimbangan kandungan air, tekanan pada osmotik, aliran pada ion serta menstabilkan struktur pada kulit dengan interaksi elektrostatik. Asam hialuronat mempunyai fungsi seperti spons yang dapat menyimpan air dengan jumlah yang besar. Asam hialuronat mengalami tingkat resistensi yang tinggi pada aliran air sehingga dapat menjadi penghalang pada perubahan kadar air serta menghambat tekanan pada osmotik non ideal.⁶⁸



Gambar 5.2. Hasil Imunohistokimia jaringan kulit, menunjukkan gambaran warna hitam pada kolagen tipe I. Kontrol (Tanpa pemberian krim kopi), P1 (Kelompok 1 dengan pemberian krim kosmetik kopi konsentrasi 10%), P2 (Kelompok 2 dengan pemberian krim kosmetik kopi konsentrasi 15%) dan P3 (Kelompok 3 dengan pemberian krim kosmetik kopi konsentrasi 20%).

Berdasarkan Gambar 5.2 tentang gambaran histologis kolagen Tipe I diketahui bahwa pemberian krim kosmetik kopi mampu meningkatkan jumlah kolagen tergantung pada besarnya konsentrasi.



Uji Kruskal-Wallis: *mean difference significant $p < 0,05$

Gambar 5.3. Grafik Jumlah Kolagen Tipe I pada Semua Kelompok Penelitian (* p signifikan $< 0,05$)

Tabel 5.3. Uji Mann Whitney Jumlah Kolagen Tipe I antar Kelompok Penelitian

Kelompok	Kelompok Pembanding	Signifikansi
Kontrol	P1*	0.002
	P2*	0.041
	P3*	0.004
P1	Kontrol	0.002
	P2	0.310
	P3	0.078
P2	Kontrol	0.041
	P1	0.310
	P3*	0.015
P3	Kontrol*	0.004
	P1	0.078
	P2*	0.015

Berdasarkan gambar di atas tampak bahwa pemberian krim kosmetik kopi secara signifikan mempengaruhi peningkatan kolagen tipe I, namun pemberian krim kosmetik kopi tidak signifikan pada nilai konsentrasi 15%.

Pada data deskriptif jumlah kolagen tipe I masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Saphiro Wilk dan Uji Homogenitas dengan menggunakan Levene Test. Hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikan pada semua kelompok dengan $p > 0,05$, sementara hasil uji homogenitas nilai signifikansi $p < 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data berdistribusi secara normal dan tidak homogen, sehingga dilakukan uji nonb parametrik Kruskal Wallis Test, dan dilanjutkan uji Mann Whitney. Uji beda dengan Kruskal Wallis Test didapatkan $p < 0,05$ dan hasil uji lanjut Mann Whitney disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.2 dan tabel 5.3. pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$ antara pemberian krim kosmetik kopi pada konsentrasi 10% dan 20% dengan kelompok penelitian.

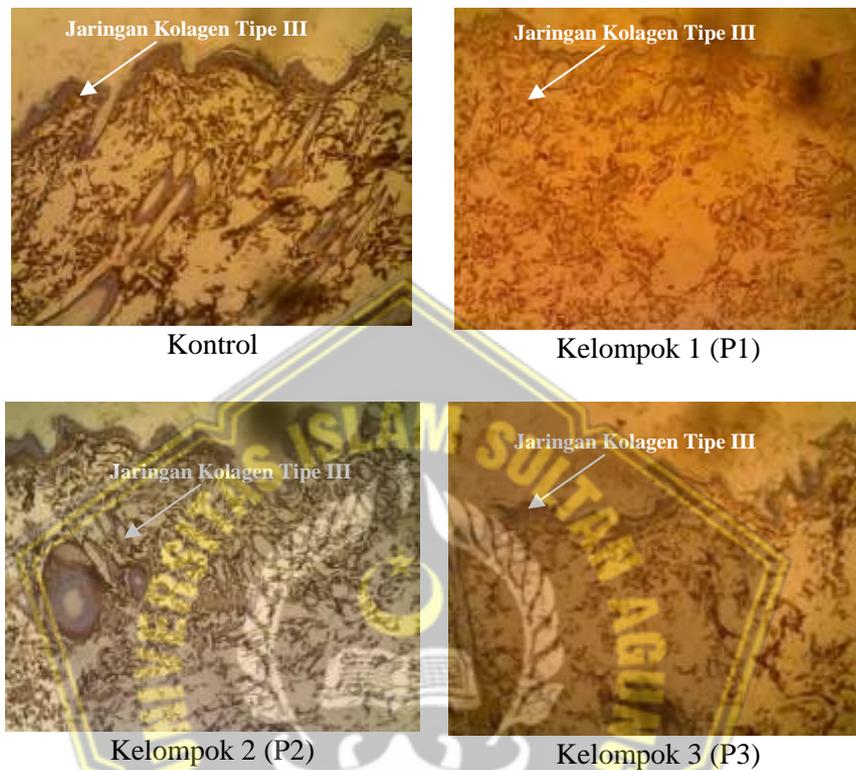
5.1.4. Pengaruh Pemberian Krim Kosmetik Kopi terhadap Jumlah Kolagen Tipe III

Kolagen tipe III banyak terdapat pada kulit, sistem limfatik, limfa, hati, sistem kardiovaskular, paru. Telah banyak dibuktikan bahwa tipe kolagen yang mendominasi organ kulit adalah kolagen tipe I dan kolagen tipe III yang berfungsi pada pertahanan mekanik.³¹ Kedua tipe kolagen tersebut termasuk dalam *fibril-forming collagen* merupakan serat yang fleksibel dan mempunyai daya regang yang besar dan kuat. Kolagen tipe ini berwarna putih oleh sebab itu dikenal juga dengan serat putih. Kolagen pada jaringan ikat berdiameter lebih kecil dan hampir tak berwarna apabila tidak diwarnai.

Kolagen adalah serat utama yang terdapat pada lapisan dermis kulit dan merupakan protein dengan fungsi sebagai penyangga kulit dan kekuatan mekanik. Struktur protein pada kulit dan komponen kulit akan mengalami perubahan seiring dengan bertambahnya umur, sehingga mengakibatkan terjadinya penuaan kulit. Jumlah kolagen yang mengalami perubahan merupakan bagian integral dari proses penuaan kulit. Penurunan kolagen diprediksi terjadi sekitar 1% setiap tahun per unit pada area kulit, namun pada kulin yang senantiasa terpapar UV menunjukkan adanya penurunan hingga 59%, hal ini sebagaimana ditunjukkan pada kulit yang mengalami photodamage.³²

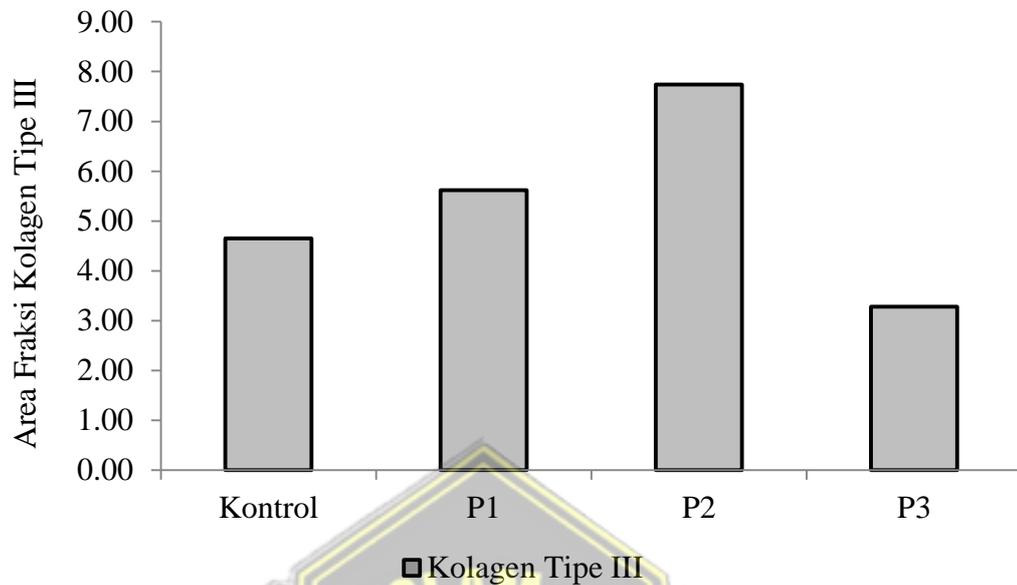
Kopi yang mengandung antioksidan mampu merubah radikal bebas yang dilepaskan pada waktu aplikasi gaya ortodontik menjadi produk yang stabil melalui penghambatan faktor transkripsi redoks sehingga sel dan jaringan dapat terlindungi dari berbagai ancaman kerusakan oksidatif dan mengalami perbaikan ligamen periodontal dari sabut kolagen melalui proses aktivasi sel fibroblas yang dirangsang oleh makrofag, kekuatan mekanik, limfosit, dan bakteri untuk mengeluarkan plasminogen activator, matriks metaloproteinase (MMP), inhibitor jaringan metalloproteinase (TIMP), plasminogen activator inhibitor (PAI), sitokin prostaglandin E-2 (PGE-2) dan interleukin-6 (IL-6)]. Fibroblas yang mensekresikan protein matriks mempunyai kemampuan untuk menghasilkan kolagen, elastin, dan glycosaminoglycans (GAG'S). Penelitian Wei-Cheng et al., (2013) menjelaskan bahwa asam klorogenat mampu meningkatkan ekspresi TGF- β yang secara bersamaan dapat peningkatan produksi kolagen serta proliferasi sel fibroblas pada hari ke 6-15 dan asam kafeat yang ada dalam biji kopi amampu

meningkatkan produksi kolagen dan proliferasi sel fibroblas pada hari ke 10 dan 15 dibanding dengan kelompok kontrol.⁴⁸



Gambar 5.4. Hasil Imunohistokimia jaringan kulit, menunjukkan gambaran warna hitam pada kolagen tipe III. Kontrol (Tanpa pemberian krim kopi), P1 (Kelompok 1 dengan pemberian krim kosmetik kopi konsentrasi 10%), P2 (Kelompok 2 dengan pemberian krim kosmetik kopi konsentrasi 15%) dan P3 (Kelompok 3 dengan pemberian krim kosmetik kopi konsentrasi 20%).

Berdasarjab Gambar 5.4 dapat diketahui bahwa pemberian krim kosmetik kopi mampu meningkatkan jumlah kolagen tipe III tergantung pada besarnya konsentrasi.



Uji Kruskal-Wallis: *mean difference significant $p < 0,05$

Gambar 5.5. Grafik Jumlah Kolagen Tipe III pada Semua Kelompok Penelitian (* p signifikan $< 0,05$)

Tabel 5.4. Uji Mann Whitney Jumlah Kolagen Tipe III antar Kelompok Penelitian

Kelompok	Kelompok Pemanding	Signifikansi
Kontrol	P1	0.394
	P2	0.132
	P3	0.180
P1	Kontrol	0.394
	P2	0.240
	P3	0.065
P2	Kontrol	0.132
	P1	0.240
	P3*	0.009
P3	Kontrol	0.180
	P1	0.065
	P2*	0.009

Berdasarkan gambar di atas tampak bahwa pemberian krim kosmetik kopi secara signifikan mempengaruhi peningkatan jumlah kolagen Tipe III, namun pemberian krim kosmetik kopi tidak signifikan pada nilai konsentrasi 10% dan 20%.

Pada data deskriptif jumlah kolagen Tipe III masing-masing kelompok dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Saphiro Wilk dan Uji Homogenitas dengan menggunakan Levene Test. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai tidak signifikan dengan $p < 0,05$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi secara normal dan homogen, sehingga dilakukan uji non parametrik Kruskal-Wallis Test, dan dilanjutkan Mann Whitney Test. Uji beda Kruskal-Wallis Test didapatkan $p < 0,05$ dan hasil uji lanjut Kruskal-Wallis Test disajikan dalam bentuk grafik pada gambar 5.3 dan tabel 5.4. pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan $p < 0,05$ antara pemberian krim kosmetik kopi pada konsentrasi 15% dengan kelompok penelitian.

5.2. Pembahasan Hasil Penelitian

Kopi merupakan bahan herbal bermanfaat meningkatkan kapasitas total kadar SOD dan jumlah kolagen sebagai upaya mencegah penuaan kulit. Implementasi penelitian ini dimulai dari pembuatan ekstrak biji kopi dilakukan dengan memasukkan biji kopi ke dalam oven dengan suhu 40°C sampai kadar airnya kurang dari 10% kemudian dihaluskan. Ditimbang sebanyak 500 gram menggunakan timbangan digital lalu dimaserasi dengan larutan etanol 70% sebanyak 3750 ml dalam benjana, maserasi selama 3 x 24 jam sambil sesekali diaduk (3 kali sehari diaduk). Disaring dengan menggunakan kain flanel hingga diperoleh maserat. Kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga

diperoleh ekstrak kental. Hasil ekstrak dari 500 gram biji kopi \pm 50 gram ekstrak kental.

Biji kopi yang telah diproses menjadi ekstrak kental dibuat menjadi krim dengan konsentrasi 10%,15% dan 20%. Sebelum melakukan penelitian, wistar betina di adaptasikan selama 4 hari di laboratorium dan diberi makan. Peneliti menggunakan sampel sebanyak 24 ekor wistar betina dibagi menjadi 4 kelompok dikandangkan ke dalam kelompok masing-masing. Kemudian peneliti menyiapkan alat dan bahan serta mencukur bulu pada punggung wistar betina dengan menggunakan pisau cukur. Setelah dilakukan tindakan pencukuran, lakukan tindakan *antiseptic* dengan pemberian alkohol 70%.

Wistar betina diberi perlakuan sesuai dengan kelompok perlakuan, kelompok pertama adalah kelompok uji 1 (P1) yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 10%, kelompok kedua adalah kelompok uji 2 (P2) yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 15%, kelompok ketiga adalah kelompok uji 3 (P3) yang diberikan krim kosmetik kopi dengan konsentrasi 20% dan kelompok keempat adalah kelompok kontrol (P0) yang tidak diberikan krim kosmetik kopi. Pemberian krim kosmetik kopi dilakukan 1 kali sehari pada jam yang sama selama 21 hari, penggunaan krim kosmetik kopi yang dioleskan di punggung selama 21 hari diharapkan dapat menurunkan total kadar ROS dan meningkatkan jumlah kolagen Tipe I dan III.

Pada penelitian ini pengukuran kapasitas total kadar SOD menggunakan metode ELISA (*Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay*). Darah yang telah diambil dilakukan sentrifugasi dan dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Plasma

yang didapat dilakukan pemeriksaan kadar SOD dengan metode ELISA (*Enzyme Linked Immune-Sorbent Assay*). Superoxide dismutase (SOD) adalah salah satu enzim antioksidan utama yang menangkal radikal bebas.^{59,60} Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian krim kosmetik kopi secara signifikan mempengaruhi peningkatan kapasitas total kadar SOD.

Kopi merupakan bahan herbal bermanfaat meningkatkan kapasitas total kadar SOD dan jumlah kolagen sebagai upaya mencegah penuaan kulit. Kopi mengandung senyawa antioksidan yang dianggap paling relevan melawan radikal bebas sebagai kontributor utama perkembangan stres oksidatif. Stres oksidatif terjadi ketika produksi sel molekul oksidan melebihi ketersediaan antioksidan yang mampu mengalahkan radikal bebas,¹⁴ terdapat peningkatan kadar kolagen dengan pemberian ekstrak kopi 10%, dan besarnya konsentrasi serta lama pemberian memberikan pengaruh positif terhadap peningkatan kadar kolagen.¹¹ Kopi terdiri dari senyawa fenolik sebagai antioksidan yang mempunyai efek perlindungan terhadap pengaruh oksigen radikal bebas.^{8,9} Kopi merupakan bahan alami yang mengandung senyawa fenolik sebagai antioksidan yang mempunyai efek perlindungan terhadap pengaruh oksigen radikal bebas.⁸ Kandungan kafein dalam kopi merupakan antioksidan kuat yang melindungi terhadap kerusakan sel yang disebabkan radikal bebas,¹⁷ sementara antioksidan pada kopi adalah polifenol yang membantu pertumbuhan kolagen pada tubuh.¹⁸

Senyawa fenolik pada kopi merupakan kelompok senyawa terbesar yang berperan sebagai antioksidan alami pada tumbuhan. Senyawa fenolik memiliki satu (fenol) atau lebih (polifenol) cincin fenol, yaitu gugus hidroksi yang terikat

pada cincin aromatis sehingga mudah teroksidasi dengan menyumbangkan atom hidrogen pada radikal bebas. Kemampuannya membentuk radikal fenoksi yang stabil pada reaksi oksidasi menyebabkan senyawa fenolik sangat potensial sebagai antioksidan.⁹ Antioksidan sangat bermanfaat dalam pencegahan penuaan dan penyakit degeneratif. Penuaan adalah proses yang akan terjadi pada semua makhluk hidup yang dapat menyebabkan perubahan progresif pada seluruh organ termasuk kulit.⁴³

Antioksidan yang terdapat pada kopi adalah Flavonoid. Flavonoid adalah sekelompok besar senyawa polifenol tanaman yang tersebar luas dalam berbagai bahan makanan dan dalam berbagai konsentrasi. Polifenol merupakan salah satu dari komponen bioaktif non gizi memberikan efek fungsional sehat pada tubuh. Senyawa polifenol banyak terkandung pada teh, kopi, rempah-rempah, kakao, biji-bijian, sereal, bunga, sayuran, dan lain-lain. Banyak senyawa polifenol yang menunjukkan aktifitasnya sebagai antioksidan. Polifenol merupakan senyawa kimia yang bekerja sebagai antioksidan kuat di dalam kopi.¹⁸

Pengamatan jumlah kolagen diukur melalui pengamatan histopatologi menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan *camera/optilab* dengan pembesaran 400×. Gambar yang telah didapatkan selanjutnya diolah dengan menggunakan *software* ImageJ untuk mengetahui persentase kepadatan kolagen,⁶¹ selanjutnya untuk spesifikasi kolagen tipe I dan III diukur melalui metode imunohistokimia (IHK).⁶² Kolagen tipe I dan III positif bila terdapat warna kecoklatan di area dermis superfisial. Selanjutnya untuk spesifikasi kolagen tipe

I dan III diukur melalui metode imunohistokimia (IHK).⁶² Kolagen tipe I dan III positif bila terdapat warna kecoklatan di area dermis superfisial.

Pemberian kopi yang sudah dihilangkan kandungan *hidroksihidrokuinon* (komponen prooksidan) memperlihatkan efek antihipertensi, memperbaiki bioavailabilitas nitrit oksida (NO) dan memperbaiki fungsi endotelium. Kandungan antioksidan kuat di dalam kopi dapat merubah produk ROS yang dilepaskan saat aplikasi gaya ortodontik menjadi produk yang stabil dengan cara menghambat faktor transkripsi redoks sehingga sel maupun jaringan akan terlindungi dari kerusakan oksidatif selain itu akan terjadi perbaikan ligamen periodontal oleh sabut kolagen melalui aktivasi sel fibroblas yang dirangsang oleh makrofag, limfosit, kekuatan mekanik, dan bakteri untuk mengeluarkan plasminogen activator, inhibitor jaringan metalloproteinase (TIMP), matriks metalloproteinase (MMP), sitokin [prostaglandin E-2 (PGE-2), plasminogen activator inhibitor (PAI), interleukin-6 (IL-6)]. Fibroblas yang diinduksi untuk mensekresikan protein matriks dapat menghasilkan kolagen, elastin, dan glycosaminoglycans (GAG'S). Penelitian Wei-Cheng et al., (2013) menyebutkan bahwa asam klorogenat dapat meningkatkan ekspresi TGF- β yang secara bersamaan juga terjadi peningkatan produksi kolagen dan proliferasi sel fibroblas pada hari ke 6-15 serta asam kafeat yang terdapat dalam kopi dapat meningkatkan produksi kolagen dan proliferasi sel fibroblas pada hari ke 10 dan 15 yang dibandingkan dengan kelompok kontrol.⁴⁸

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian krim kosmetik kopi memiliki pengaruh dalam meningkatkan kapasitas total kadar

SOD serta jumlah kolagen Tipe I dan kolagen tipe III. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian krim kosmetik kopi memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai krim kosmetik dalam mencegah penuaan pada kulit. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa meskipun ada pengaruh pemberian krim kosmetik kopi, namun peningkatan kapasitas total kadar SOD dan jumlah kolagen tipe I dan III berbeda-beda, hal ini disebabkan faktor hormonal atau genetika dari wistar betina yang mengalami siklus estrus. Keberaturan siklus estrus pada wistar betina sangat tergantung pada hormon estrogen, sehingga dengan adanya penurunan hormon estrogen berakibat pada gangguan siklus estrus. Penurunan yang terjadi pada hormon estrogen disebabkan oleh tingginya radikal bebas. Keberadaan radikal bebas menyebabkan ketidakaturan pada siklus estrus yang berakibat pada perubahan tekanan darah, emosional, nutrisi dan hormon serta kapasitas total kadar SOD dan jumlah kolagen.^{69,70}

5.3. Kelemahan Penelitian

Kelemahan penelitian ini adalah tidak ada variasi waktu pengamatan pada setiap fase penurunan kapasitas total kadar SODA dan jumlah kolagen tipe I dan III, sehingga adanya variasi waktu dalam pengamatan dapat menjadi acuan dalam memastikan efek yang ditimbulkan dari pemberian krim kosmetik kopi secara alami.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pemberian krim kosmetik kopi terhadap kapasitas total kadar SOD dan jumlah kolagen tipe I dan III dapat disimpulkan:

1. Pemberian krim kosmetik kopi berpengaruh secara bermakna terhadap penurunan kapasitas total kadar SOD pada wistar betina tua (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian krim kosmetik kopi berpengaruh secara bermakna terhadap peningkatan jumlah kolagen tipe I pada wistar betina tua (*Rattus norvegicus*).
3. Pemberian krim kosmetik kopi berpengaruh secara bermakna terhadap peningkatan jumlah kolagen tipe III pada wistar betina tua (*Rattus norvegicus*).

6.2. Saran

Berdasarkan uraian hasil penelitian, maka penulis menyampaikan beberapa saran sebagai berikut:

1. Perlu adanya variasi waktu pengamatan pada setiap periode penurunan kapasitas total kadar SOD, sehingga dapat diketahui waktu optimal dalam menurunkan kapasitas total kadar SOD dengan pemberian krim kosmetik kopi.

2. Perlu adanya variasi waktu pengamatan pada setiap tahapan dalam meningkatkan jumlah kolagen tipe I dan III, sehingga dapat diketahui waktu optimal dalam meningkatkan jumlah kolagen tipe I dan III pada pemberian krim kosmetik kopi.



DAFTAR PUSTAKA

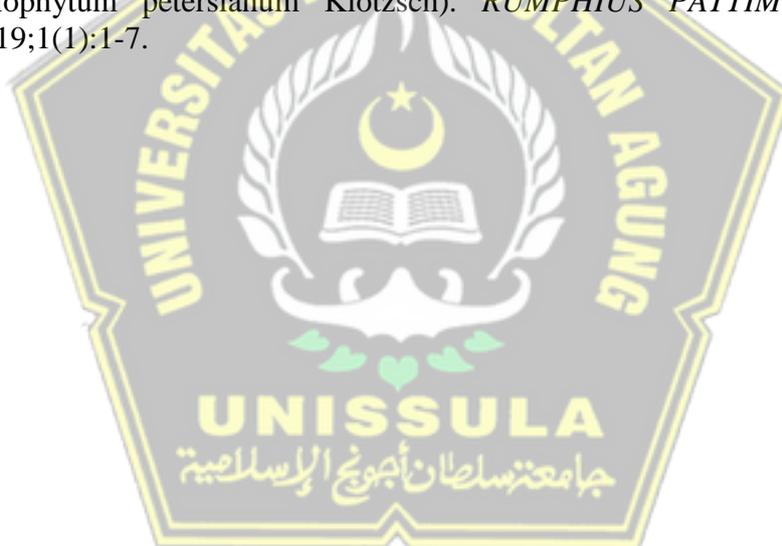
1. Ahmad Z, Damayanti. Penuaan Kulit : Patofisiologi dan Manifestasi Klinis. *Berk Ilmu Kesehat Kulit dan Kelamin – Period Dermatology Venereol.* 2018;30(03):208-215.
[http://download.garuda.ristekdikti.go.id/article.php?article=850430&val=7405&title=Penuaan Kulit: Patofisiologi dan Manifestasi Klinis.](http://download.garuda.ristekdikti.go.id/article.php?article=850430&val=7405&title=Penuaan%20Kulit%3A%20Patofisiologi%20dan%20Manifestasi%20Klinis)
2. Marius-Daniel R, Stelian S, Dragomir C. The effect of acute physical exercise on the antioxidant status of the skeletal and cardiac muscle in the Wistar rat. *Rom Biotechnol Lett.* 2010;15(SUPPL.3):56-61.
3. Sharma N, Gupta PC, Rao C V. Nutrient content, mineral content and antioxidant activity of *Amaranthus viridis* and *Moringa oleifera* leaves. *Res J Med Plant.* 2012;6(3):253-259. doi:10.3923/rjmp.2012.253.259.
4. Pangkahila WI, Widyowati H, Wiraguna AAGP, Pangkahila JA, Adiputra IM, Aman I. Pemberian Krim Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis*) dapat mencegah Penurunan Jumlah Kolagen Dermis dan Peningkatan Ekspresi Matriks Metalloproteinase-1 pada mencit BALB-C yang dipapar Sinar Ultraviolet B. *Indones J Anti Aging Med Aging Med.* 2017;1(1):10-16.
5. Alifah D, Susilawati Y. Potensi Tumbuhan Sebagai Anti-Aging. *Farmaka.* 2018;16(2):581-588.
6. Khalil S, Bardawil T, Stephan C, et al. Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects. *J Dermatolog Treat.* 2017;28(8):684-696. doi:10.1080/09546634.2017.1309349.
7. Makatita FA, Wardhani R, Nuraini. Riset In Silico dalam Pengembangan Sains di Bidang Pendidikan (Studi Kasus: Analisis Potensi Cendana sebagai Agen Anti-Aging). *J ABDI.* 2020;2(1):33-39.
8. Yuwono HS. The New Paradigm of Wound Management Using Coffee Powder. *Glob j Surg.* 2014;2(2):25-29.
9. Dhurhanian CE, Novianto A. Uji Kandungan Fenolik Total dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Bentuk Sediaan Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*). *J Farm DAN ILMU KEFARMASIAN Indones.* 2019;5(2):62. doi:10.20473/jfiki.v5i22018.62-68.
10. Young Park S, Pyung Lee S. The Effects of Coffee and Korean Red Ginseng with Body Wrap Steam Bathing on Stress Markers and Lipid Profiles. *J Food Nutr Res.* 2015;3(4):246-251. doi:10.12691/jfnr-3-4-3.
11. Girsang LC, Fachrial E, Lister INE. Effectiveness Test of Robusta Coffee (*Coffea canephora*) Extract from North Sumatra in Collagen and Hydration Skin Level of Female Wistar Rattus norvegicus. *ASRJETS.* 2020;65(1):108-115.
12. Kemenkes RI. *Populasi Lansia Di Perkiraan Terus Meningkat Hingga Tahun 2020.* Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2019.
13. Poljšak B, Dahmane RG, Godić A. Intrinsic skin aging: The role of oxidative stress. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica Adriat.* 2012;21(2):33-36. doi:10.2478/V10162-012-0009-0.
14. Martini D, Del Bo' C, Tassotti M, et al. Coffee consumption and oxidative

- stress: A review of human intervention studies. *Molecules*. 2016;21(8). doi:10.3390/molecules21080979.
15. Djuanda SSR, Novianto E, Boediardja SA, Jusman SAW. Peran Stress Oksidatif pada Penuaan Kulit Secara Intrinsik. *MDVI*. 2012;39:132.
 16. Parwata MOA. Bahan Ajar Antioksidan. *Kim Terap Progr Pascasarj Univ Udayana*. 2016;(April):1-54.
 17. Hall S, Desbrow B, Anoopkumar-Dukie S. A Review of the bioactivity of coffee, caffeine and key coffee constituents on inflammatory responses linked to depression. *Food Res Int*. 2015;76:626-636.
 18. Almada D. Pengaruh perubahan proses dekafeinasi kopi dalam reaktor kolom tunggal terhadap mutu kopi. *Inst Pertan Bogor*. 2009.
 19. Pangkahila W. *Anti-Aging Medicine: Memperlambat Penuaan, Meningkatkan Kualitas Hidup*. Jakarta: PT. Kompas Media Nusantara; 2017.
 20. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*.; 2015. doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.
 21. Kirkinezos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2001;12(6):449-457. doi:10.1006/scdb.2001.0282.
 22. Lieberman - M. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. *Basic Med Biochem*. 2017;4th, Inter:35-37.
 23. Birch-Machin MA. The role of mitochondria in ageing and carcinogenesis. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31(4):548-552. doi:10.1111/j.1365-2230.2006.02161.x.
 24. Rosa AC, Bruni N, Meineri G, et al. Strategies to expand the therapeutic potential of superoxide dismutase by exploiting delivery approaches. *Int J Biol Macromol*. 2021;168:846-865. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.149.
 25. Mondola P, Damiano S, Sasso A, Santillo M. The Cu, Zn superoxide dismutase: Not only a dismutase enzyme. *Front Physiol*. 2016;7(NOV). doi:10.3389/fphys.2016.00594.
 26. Scott D, Bennion M. *Structure and Function of the Skin*. Fourth Edi. (Fitzpatrick J., Morelli J., eds.). Philadelphia: Elsevier Mosby; 2017.
 27. Draelos ZD. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*.; 2016. doi:10.1002/9781444317657.
 28. Emmert S, Brehmer F, Hänble H, et al. Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcus treatment and much more. *Clin Plasma Med*. 2013;1(1):24-29. doi:10.1016/j.cpme.2012.11.002.
 29. Mescher AL. *Junquiera's Basic Histology Text and Atlas 13th Edition*. Vol 2018.; 2013.
 30. Chang SW, Buehler MJ. Molecular biomechanics of collagen molecules. *Mater Today*. 2014;17(2):70-76. doi:10.1016/j.mattod.2014.01.019.
 31. Rhein LD, Santiago JM. *Matrix Metallo Proteinase, Fibrosis, and Regulation by Transforming Growth Factor Beta: A New Frontier in Wrinkle Repair*. Aging Skin. (Rhein LD, J.M F, eds.). USA: AlluRed Bussiness Media; 2010.
 32. Griffiths C, Russman AN, Majmudar G, Singer RS, Hamilton TA, Voorhees JJ. Restoration of Collagen Formation in Photodamaged Human Skin by

- Tretinoin (Retinoic Acid). *N Engl J Med.* 2013;329(8):530-535. doi:10.1056/nejm199308193290803.
33. Oktasari IN, Trilaksana A. Perkebunan Kopi Rakyat di Jawa Timur 1920-1942. *Avatara.* 2014;2(1):122-129. ejournal.unesa.ac.id/article/9108/38/article.pdf.
 34. Rahardjo P. *Panduan Budidaya Dan Pengolahan Kopi Arabika Robusta.* Vol 66.; 2012.
 35. Bambang Prastowo, Elna Karmawati, Rubijo, Siswanto, Chandra Indrawanto SJM. *Kopi, Budidaya Dan Penanganan Lepas Panen.*; 2012.
 36. Aksi Agraris Kanisius. *Budidaya Tanaman Kopi.* Yogyakarta: Kanisius; 2008.
 37. Towaha J, Aunillah A, Heri Purwanto E, Handi Supriadi Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar Jalan Raya Pakuwon Km D. Effect of Elevation and Processing on the Chemical Contents and Flavor of Lampung Robusta Coffee. *J Tidp.* 2014;1(1):57-62. <https://media.neliti.com/media/publications/141543-ID-pengaruh-elevasi-dan-pengolahan-terhadap.pdf>.
 38. Bertrand B, Boulanger R, Dussert S, et al. Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. *Food Chem.* 2012;135(4):2575-2583. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.060.
 39. Aguilar ME, Ortiz JL, Mesén F, Jiménez LD, Altmann F. Cafe Arabica *Coffea arabica* L. In: ; 2018:39-62. doi:10.1007/978-3-319-79087-9_3.
 40. Widagdyo DR, Budiman VA, Indraswati N. Ekstrasi Kafeina dari Serbuk Kopi Java Robusta dengan Pelarut Minyak Jagung. *Widya Tek.* 2017. <http://journal.wima.ac.id/index.php/teknik/article/view/1438>.
 41. Farah A. Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention. In: *John Willey & Sons, Inc and Institute of Food Technologists (USA) Wiley-Blackwell Publishing Ltd.* USA; 2012:21-58. doi:10.1002/9781119949893.ch2.
 42. Ariadi HP, Windrati, S. W. Compound Extraction of Coffee Fruit Cod : Study of Species and Maceration Duration of Coffee. *Berk Ilm Pertan.* 2015;X:1-5.
 43. Nurulita NA, Sundhani E, Amalia I, Rahmawati F, Dian Utami NN. Uji Aktivitas Antioksidan dan Anti Aging Body Butter dengan Bahan Aktif Ekstrak Daun Kelor. *J ILMU KEFARMASIAN Indones.* 2019;17(1):1. doi:10.35814/jifi.v17i1.543.
 44. Miller PE, Zhao D, Frazier-Wood AC, et al. Associations of Coffee, Tea, and Caffeine Intake with Coronary Artery Calcification and Cardiovascular Events. *Am J Med.* 2017;130(2):188-197.e5. doi:10.1016/j.amjmed.2016.08.038.
 45. Aritanoga M, Effendi C, Herawati L. Kopi Arabika-Gayo Menurunkan MDA dan Meningkatkan SOD setelah Latihan Fisik Akut Submaksimal pada Pria Sedenter. *J Sumberd Hayati.* 2019;5(2):58-63. doi:10.29244/jsdh.5.2.58-63.
 46. Poljsak B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2011. doi:10.1155/2011/194586.
 47. Dembinska-Kiec A, Mykkänen O, Kiec-Wilk B, Mykkänen H. Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *Br J Nutr.* 2008;99(E-SUPPL. 1).

- doi:10.1017/S000711450896579X.
48. Chen WC, Liou SS, Tzeng TF, Lee SL, Liu IM. Effect of topical application of chlorogenic acid on excision wound healing in rats. *Planta Med.* 2013;79(8):616-621. doi:10.1055/s-0032-1328364.
 49. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30(1):11-26. doi:10.1007/s12291-014-0446-0.
 50. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol.* 2017;14(8):470-485. doi:10.1038/nrurol.2017.69.
 51. Ladiges W, Wanagat J, Preston B, Loeb L, Rabinovitch P. A Mitochondrial view of aging, reactive oxygen species and metastatic cancer. *Aging Cell.* 2010;9(4):462-465. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00579.x.
 52. Susantiningsih T. Obesitas dan Stres Oksidatif. *J Kedokt Univ Lampung.* 2015;5(9):89-93.
 53. Syamsuni H a. Farmasetika Dasar dan Hitungan Farmasi. *buku Kedokt EGC.* 2012:74.
 54. Kenisa YP, Istiati I, J WS. Effect of Robusta coffee beans ointment on full thickness wound healing. *Dent J (Majalah Kedokt Gigi).* 2012;45(1):52. doi:10.20473/j.djmk.v45.i1.p52-57.
 55. Rini L ami sulistio. Optimalisasi Sediaan Krim Ekstrak Kering Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora* L.) sebagai Antioksidan dengan Basis Vanishing Cream. *Univ Muhammadiyah Malang.* 2014.
 56. Sharma G, Gadiya J, Dhanawat M. *Textbook of Cosmetic Formulation.* India: Kbuuk Publication; 2016.
 57. Helfrich YR, Sachs DL, Voorhees JJ. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs.* 2018;20(3).
 58. Pertanian K, Penelitian J, Pengembangan Pertanian D. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. *J Litbang Pert.* 2015;34(2). <http://www.pustaka.litbang.pertanian.go.id>.
 59. Winarsih H. Antioksidan Alami & Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan. *Yogyakarta: Kanisius.* 2017:21-24.
 60. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci.* 2020;30(2):145-158.
 61. Chen Y, Yu Q, Xu CB. A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by imagej software. *Int J Clin Exp Med.* 2017;10(10):14904-14910.
 62. Ischak NI. *Potensi Kerang Darah (Anadara Granosa) Terhadap Sistem Imun Seluler Dan Humoral Tikus Betina (Rattus Norvegicus) Kurang Gizi.*; 2015. <https://repository.ung.ac.id/riset/show/2/950/potensi-kerang-darah-anadara-granosa-terhadap-sistem-imun-seluler-dan-humoral-tikus-betina-rattus-norvegicus-kurang-gizi.html>.
 63. Nuzantry JK, Widayati RI. Efektivitas Campuran Ekstrak Aloe Vera dan Olive Oil dalam Formulasi Pelembab pada Kekeringan Kulit. *Media Med Muda.* 2015;4(4):1083-1090.
 64. Amir A, Hanafiah J. *Etika Kedokteran Dan Hukum Kesehatan.* Jakarta: EGC; 2010.

65. Sopiudin Dahlan M. Besar Sampel dan Cara Pengambilan Sampel dalam Penelitian Kedokteran dan Kesehatan. *Salemba Med.* 2013:73.
66. Kumar D, Rajora G, Parkash O, Antil M, Kumar V. Herbal cosmetics: An overview. *Int J Adv Sci Res Int J Adv Sci Res www.allscientificjournal.com.* 2016;1(August 2016):36-41.
67. Wiji Utami Y. Latihan Renang Intensitas Berat Lebih Meningkatkan Kekuatan Daya Rentang. *J Kedokt Brawijaya.* 2009;25(1):28-31. doi:10.21776/ub.jkb.2009.025.01.6.
68. Rodrigues F, Matias R, Ferreira M, Amaral MH, Oliveira MBPP. In vitro and in vivo comparative study of cosmetic ingredients Coffee silverskin and hyaluronic acid. *Exp Dermatol.* 2016;25(7):572-574. doi:10.1111/exd.13010.
69. Huda NK. Pengaruh Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) terhadap Siklus Estrus Mencit (*Mus musculus* L. Swiss Webster). *EKSAKTA Berk Ilm Bid MIPA.* 2017;18(02):69-76. doi:10.24036/eksakta/vol18-iss02/55.
70. Simatauw AZ, Unitly AJA. Gambaran Siklus Estrus Tikus (*Rattus norvegicus*) Terpapar Rokok Setelah Diterapi Ekstrak Etanol Rumpun Kebar (*Biophytum petersianum* Klotzsch). *RUMPHIUS PATTIMURA Biol J.* 2019;1(1):1-7.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Spesifikasi Hewan Percobaan

"ABIMANYU FARM"

√ Mencit putih jantan √ Tikus Wistar √ Swis Webster √ Cacing
 √ Mencit Balb/C √ Kelinci New Zealand

Ngampon RT 04 / RW 04. Mojosongo Kec. Jebres Surakarta. Phone 085 629 994 33 / Lab USB Ska

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sigit Pramono

Selaku pengelola Abimanyu Farm, menerangkan bahwa hewan uji yang digunakan untuk penelitian, oleh:

Nama : Arief Mukti Mindiroesen0

Nim : MBK 1913010146

Institusi : Universitas Islam Sultan Agung Semarang

Merupakan hewan uji dengan spesifikasi sebagai berikut:

Jenis hewan : Tikus Wistar

Umur : 14-16 bulan

Berat : 200-250 gram

Jenis kelamin : Betina

Jumlah : 30 ekor

Keterangan : Sehat

Asal-usul : Unit Pengembangan Hewan Percobaan UGM Yogyakarta

Yang pengembangan dan pengelolaannya disesuaikan standar baku penelitian. Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

UNISSULA

جامعة سلطان أبجوع الإسلامية

Surakarta, 22 Maret 2021

Hormat kami



Sigit Pramono

"ABIMANYU FARM"

**Lampiran 2. Data Penelitian
Hasil Penelitian Kadar SOD (ELISA)**



UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG (UNISSULA)
INTEGRATED BIOMEDICAL LABORATORY
FAKULTAS KEDOKTERAN
 Jl. Raya Kaligawe KM.4, Semarang 50112
 Telp. +62246583584, email: ibl@unissula.ac.id

Laboratorium Biomedik Terintegrasi

Lampiran : halaman 2

Hasil Penelitian Kadar SOD (ELISA)

Kode Sampel	Abs Sampel	Konsentrasi
K.1	0.0555	1.1
K.2	0.0598	1.5
K.3	0.0577	1.3
K.4	0.0687	2.4
K.5	0.0559	1.2
K.6	0.0545	1.0
10.1	0.0673	2.3
10.2	0.0617	1.7
10.3	0.0660	2.2
10.4	0.0696	2.5
10.5	0.0656	2.1
10.6	0.0649	2.0
15.1	0.0588	1.4
15.2	0.0637	1.9
15.3	0.0660	2.2
15.4	0.0652	2.1
15.5	0.0588	1.4
15.6	0.0585	1.4
20.1	0.1174	7.2
20.2	0.1060	6.1
20.3	0.0633	1.9
20.4	0.0637	1.9
20.5	0.0640	2.0
20.6	0.0677	2.3

LABORATORIUM PATOLOGI ANATOMI
HASIL PEMBACAAN

Hasil pengukuran kepadatan kolagen tipe 1

No	Tikus	mean	intD	Area fraksi (%)
1	K1	13.429	70406010	5.266
2	K2	6.421	33664080	2.518
3	K3	12.383	64924020	4.856
4	K4	8.940	46870785	3.506
5	K5	6.811	35707650	2.671
6	10.1	20.057	105156135	7.865
7	10.2	33.035	173197530	12.955
8	10.3	30.443	159608835	11.938
9	10.4	16.514	86581425	6.476
10	10.5	15.068	79000275	5.909
11	15.1	11.795	61841835	4.626
12	15.2	12.650	66320145	4.961
13	15.3	19.408	101754180	7.611
14	15.4	23.741	124470345	9.310
15	15.5	12.022	63028860	4.714
16	20.1	24.616	129057795	9.653
17	20.2	35.928	188366460	14.089
18	20.3	28.055	147086805	11.002
19	20.4	39.619	207716370	15.537
20	20.5	45.306	237533010	17.767

Semarang, 21 Juni 2021

dr. Susilormi, Msi, Med, SpPA





LABORATORIUM PATOLOGI ANATOMI
HASIL PEMBACAAN

Hasil pengukurankolagen tipe-3

No	Tikus	mean	intD	Area fraksi (%)
1	K1	6.206	32537235	2.434
2	K2	9.218	48329130	3.615
3	K3	14.873	77976450	5.832
4	K4	12.502	65546475	4.903
5	K5	20.067	105206370	7.869
6	10.1	6.388	33492465	2.505
7	10.2	15.937	83553555	6.250
8	10.3	18.851	98831880	7.392
9	10.4	13.183	69119280	5.170
10	10.5	11.096	58174935	4.351
11	15.1	16.699	87553230	6.549
12	15.2	6.713	35196885	2.633
13	15.3	20.974	109965180	8.225
14	15.4	23.378	122570085	9.168
15	15.5	14.804	77614860	5.805
16	20.1	6.397	33541170	2.509
17	20.2	13.373	70112250	5.244
18	20.3	5.595	29332395	2.194
19	20.4	6.068	31813035	2.380
20	20.5	5.866	30753765	2.300

Semarang, 21 Juni 2021

dr. Susiloni, SpA, Med, SpPA



Lampiran 3. Analisis Statistik

Explore Subjek

Case Processing Summary

	Subjek	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kadar SOD	P0	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	P1	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	P2	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	P3	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
Kolagen Tipe I	P0	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	P1	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	P2	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	P3	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
Kolagen Tipe III	P0	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	P1	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	P2	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	P3	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%

Descriptives

	Subjek	Statistic	Std. Error
Kadar SOD	P0	Mean	1.4167
		95% Confidence Interval for Mean	
		Lower Bound	.8798
		Upper Bound	1.9535
		5% Trimmed Mean	1.3852
		Median	1.2500
		Variance	.262
		Std. Deviation	.51153
		Minimum	1.00
		Maximum	2.40
		Range	1.40
		Interquartile Range	.65
		Skewness	1.873
		Kurtosis	3.745
			.845
			1.741
	P1	Mean	2.1333
			.11155

	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.8466	
		Upper Bound	2.4201	
	5% Trimmed Mean		2.1370	
	Median		2.1500	
	Variance		.075	
	Std. Deviation		.27325	
	Minimum		1.70	
	Maximum		2.50	
	Range		.80	
	Interquartile Range		.42	
	Skewness		-.435	.845
	Kurtosis		.586	1.741
P2	Mean		1.7333	.15420
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.3369	
		Upper Bound	2.1297	
	5% Trimmed Mean		1.7259	
	Median		1.6500	
	Variance		.143	
	Std. Deviation		.37771	
	Minimum		1.40	
	Maximum		2.20	
	Range		.80	
	Interquartile Range		.73	
	Skewness		.247	.845
	Kurtosis		-2.697	1.741
P3	Mean		3.5667	.98714
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.0291	
		Upper Bound	6.1042	
	5% Trimmed Mean		3.4574	
	Median		2.1500	
	Variance		5.847	
	Std. Deviation		2.41799	
	Minimum		1.90	

		Maximum	7.20			
		Range	5.30			
		Interquartile Range	4.48			
		Skewness	1.042	.845		
		Kurtosis	-1.346	1.741		
Kolagen Tipe I	P0	Mean	3.829833	.4616852		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.643034		
			Upper Bound	5.016633		
		5% Trimmed Mean	3.822926			
		Median	3.834000			
		Variance	1.279			
		Std. Deviation	1.1308932			
		Minimum	2.5180			
		Maximum	5.2660			
		Range	2.7480			
		Interquartile Range	2.3258			
		Skewness	.048	.845		
		Kurtosis	-1.906	1.741		
		P1	P1	Mean	8.534167	1.2756278
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5.255061
					Upper Bound	11.813272
				5% Trimmed Mean	8.434407	
Median	7.170500					
Variance	9.763					
Std. Deviation	3.1246373					
Minimum	5.9090					
Maximum	12.9550					
Range	7.0460					
Interquartile Range	6.1685					
Skewness	.822			.845		
Kurtosis	-1.703			1.741		
P2	P2			Mean	6.621833	.8592174
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.413145
					Upper Bound	8.830522
				5% Trimmed Mean	6.583370	

	Median		6.286000	
	Variance		4.430	
	Std. Deviation		2.1046441	
	Minimum		4.6260	
	Maximum		9.3100	
	Range		4.6840	
	Interquartile Range		4.0173	
	Skewness		.246	.845
	Kurtosis		-2.590	1.741
P3	Mean		12.567333	1.5944960
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	8.468551	
		Upper Bound	16.666116	
	5% Trimmed Mean		12.567981	
	Median		12.545500	
	Variance		15.255	
	Std. Deviation		3.9057016	
	Minimum		7.3560	
	Maximum		17.7670	
	Range		10.4110	
	Interquartile Range		7.0158	
	Skewness		.001	.845
	Kurtosis		-1.347	1.741
Kolagen Tipe III	P0	Mean	4.653500	.8106546
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.569646
			Upper Bound	6.737354
		5% Trimmed Mean	4.598167	
		Median	4.259000	
		Variance	3.943	
		Std. Deviation	1.9856901	
		Minimum	2.4340	
		Maximum	7.8690	
		Range	5.4350	
		Interquartile Range	3.2817	
		Skewness	.773	.845
		Kurtosis	-.039	1.741

P1	Mean		5.615167	.8332114
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.473328	
		Upper Bound	7.757005	
	5% Trimmed Mean		5.654185	
	Median		5.710000	
	Variance		4.165	
	Std. Deviation		2.0409429	
	Minimum		2.5050	
	Maximum		8.0230	
	Range		5.5180	
	Interquartile Range		3.6603	
	Skewness		-.436	.845
	Kurtosis		-.606	1.741
	P2	Mean		7.740667
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	3.716754	
		Upper Bound	11.764579	
5% Trimmed Mean			7.673130	
Median			7.387000	
Variance			14.702	
Std. Deviation			3.8343588	
Minimum			2.6330	
Maximum			14.0640	
Range			11.4310	
Interquartile Range			5.3800	
Skewness			.605	.845
Kurtosis			1.197	1.741
P3		Mean		3.277667
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.757210	
		Upper Bound	4.798123	
	5% Trimmed Mean		3.228630	
	Median		2.444500	
	Variance		2.099	
	Std. Deviation		1.4488327	

Minimum	2.1940	
Maximum	5.2440	
Range	3.0500	
Interquartile Range	2.8167	
Skewness	.955	.845
Kurtosis	-1.823	1.741

Tests of Normality

	Subjek	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar SOD	P0	.269	6	.200*	.797	6	.055
	P1	.146	6	.200*	.988	6	.985
	P2	.311	6	.071	.799	6	.058
	P3	.366	6	.012	.728	6	.012
Kolagen Tipe I	P0	.181	6	.200*	.930	6	.577
	P1	.251	6	.200*	.814	6	.078
	P2	.285	6	.139	.839	6	.128
	P3	.156	6	.200*	.974	6	.917
Kolagen Tipe III	P0	.200	6	.200*	.950	6	.741
	P1	.141	6	.200*	.971	6	.899
	P2	.188	6	.200*	.969	6	.888
	P3	.369	6	.011	.716	6	.009

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Kadar SOD	P0	6	1.4167	.51153	.20883	.8798	1.9535	1.00	2.40
	P1	6	2.1333	.27325	.11155	1.8466	2.4201	1.70	2.50
	P2	6	1.7333	.37771	.15420	1.3369	2.1297	1.40	2.20
	P3	6	3.5667	2.41799	.98714	1.0291	6.1042	1.90	7.20
	Total	24	2.2125	1.44231	.29441	1.6035	2.8215	1.00	7.20
Kolagen Tipe I	P0	6	3.829833	1.1308932	.4616852	2.643034	5.016633	2.5180	5.2660
	P1	6	8.534167	3.1246373	1.2756278	5.255061	11.813272	5.9090	12.9550
	P2	6	6.621833	2.1046441	.8592174	4.413145	8.830522	4.6260	9.3100
	P3	6	12.567333	3.9057016	1.5944960	8.468551	16.666116	7.3560	17.7670
	Total	24	7.888292	4.1490966	.8469308	6.136282	9.640302	2.5180	17.7670
Kolagen Tipe III	P0	6	4.653500	1.9856901	.8106546	2.569646	6.737354	2.4340	7.8690
	P1	6	5.615167	2.0409429	.8332114	3.473328	7.757005	2.5050	8.0230
	P2	6	7.740667	3.8343588	1.5653704	3.716754	11.764579	2.6330	14.0640
	P3	6	3.277667	1.4488327	.5914835	1.757210	4.798123	2.1940	5.2440
	Total	24	5.321750	2.8584102	.5834705	4.114749	6.528751	2.1940	14.0640

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kadar SOD	20.258	3	20	.000
Kolagen Tipe I	4.843	3	20	.011
Kolagen Tipe III	1.297	3	20	.303

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kadar SOD	Between Groups	16.218	3	5.406	3.418	.037
	Within Groups	31.628	20	1.581		
	Total	47.846	23			
Kolagen Tipe I	Between Groups	242.314	3	80.771	10.515	.000
	Within Groups	153.632	20	7.682		
	Total	395.945	23			
Kolagen Tipe III	Between Groups	63.373	3	21.124	3.392	.038
	Within Groups	124.549	20	6.227		
	Total	187.922	23			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Subjek	(J) Subjek	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Kadar SOD	P0	P1	-.71667	.72604	.335	-2.2312	.7978
		P2	-.31667	.72604	.667	-1.8312	1.1978
		P3	-2.15000*	.72604	.008	-3.6645	-.6355
	P1	P0	.71667	.72604	.335	-.7978	2.2312
		P2	.40000	.72604	.588	-1.1145	1.9145
		P3	-1.43333	.72604	.062	-2.9478	.0812
	P2	P0	.31667	.72604	.667	-1.1978	1.8312
		P1	-.40000	.72604	.588	-1.9145	1.1145
		P3	-1.83333*	.72604	.020	-3.3478	-.3188
	P3	P0	2.15000*	.72604	.008	.6355	3.6645
		P1	1.43333	.72604	.062	-.0812	2.9478
		P2	1.83333	.72604	.020	.3188	3.3478
Kolagen Tipe I	P0	P1	-4.7043333	1.6001643	.008	-8.042218	-1.366449
		P2	-2.7920000	1.6001643	.096	-6.129884	.545884
		P3	-8.7375000*	1.6001643	.000	-12.075384	-5.399616
	P1	P0	4.7043333	1.6001643	.008	1.366449	8.042218
		P2	1.9123333	1.6001643	.246	-1.425551	5.250218
		P3	-4.0331667*	1.6001643	.020	-7.371051	-.695282
	P2	P0	2.7920000	1.6001643	.096	-.545884	6.129884
		P1	-1.9123333	1.6001643	.246	-5.250218	1.425551
		P3	-5.9455000*	1.6001643	.001	-9.283384	-2.607616
	P3	P0	8.7375000*	1.6001643	.000	5.399616	12.075384
		P1	4.0331667*	1.6001643	.020	.695282	7.371051
		P2	5.9455000*	1.6001643	.001	2.607616	9.283384
Kolagen Tipe III	P0	P1	-.9616667	1.4407705	.512	-3.967061	2.043728
		P2	-3.0871667*	1.4407705	.045	-6.092561	-.081772
		P3	1.3758333	1.4407705	.351	-1.629561	4.381228
	P1	P0	.9616667	1.4407705	.512	-2.043728	3.967061
		P2	-2.1255000	1.4407705	.156	-5.130895	.879895
		P3	2.3375000	1.4407705	.120	-.667895	5.342895
	P2	P0	3.0871667*	1.4407705	.045	.081772	6.092561
		P1	2.1255000	1.4407705	.156	-.879895	5.130895
		P3	4.4630000*	1.4407705	.006	1.457605	7.468395
	P3	P0	-1.3758333	1.4407705	.351	-4.381228	1.629561
		P1	-2.3375000	1.4407705	.120	-5.342895	.667895
		P2	-4.4630000*	1.4407705	.006	-7.468395	-1.457605

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

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Kadar SOD	24	2.2125	1.44231	1.00	7.20
Kolagen Tipe I	24	7.888292	4.1490966	2.5180	17.7670
Kolagen Tipe III	24	5.321750	2.8584102	2.1940	14.0640
Subjek	24	2.5000	1.14208	1.00	4.00

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Subjek	N	Mean Rank
Kadar SOD	P0	6	6.50
	P1	6	16.17
	P2	6	10.33
	P3	6	17.00
	Total	24	
Kolagen Tipe I	P0	6	4.33
	P1	6	14.83
	P2	6	11.00
	P3	6	19.83
	Total	24	
Kolagen Tipe III	P0	6	11.33
	P1	6	14.17
	P2	6	18.17
	P3	6	6.33
	Total	24	

Test Statistics^{a,b}

	Kadar SOD	Kolagen Tipe I	Kolagen Tipe III
Chi-Square	8.973	15.380	8.913
df	3	3	3
Asymp. Sig.	.030	.002	.030

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Subjek

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	Subjek	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kadar SOD	P0	6	4.33	26.00
	P1	6	8.67	52.00
	Total	12		
Kolagen Tipe I	P0	6	3.50	21.00
	P1	6	9.50	57.00
	Total	12		
Kolagen Tipe III	P0	6	5.50	33.00
	P1	6	7.50	45.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Kadar SOD	Kolagen Tipe I	Kolagen Tipe III
Mann-Whitney U	5.000	.000	12.000
Wilcoxon W	26.000	21.000	33.000
Z	-2.082	-2.882	-.961
Asymp. Sig. (2-tailed)	.037	.004	.337
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.041 ^b	.002 ^b	.394 ^b

a. Grouping Variable: Subjek

b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	Subjek	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kadar SOD	P0	6	5.00	30.00
	P2	6	8.00	48.00
	Total	12		
Kolagen Tipe I	P0	6	4.33	26.00
	P2	6	8.67	52.00
	Total	12		
Kolagen Tipe III	P0	6	4.83	29.00
	P2	6	8.17	49.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Kadar SOD	Kolagen Tipe I	Kolagen Tipe III
Mann-Whitney U	9.000	5.000	8.000
Wilcoxon W	30.000	26.000	29.000
Z	-1.451	-2.082	-1.601
Asymp. Sig. (2-tailed)	.147	.037	.109
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 ^b	.041 ^b	.132 ^b

a. Grouping Variable: Subjek

b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	Subjek	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kadar SOD	P0	6	4.17	25.00
	P3	6	8.83	53.00
	Total	12		
Kolagen Tipe I	P0	6	3.50	21.00
	P3	6	9.50	57.00
	Total	12		
Kolagen Tipe III	P0	6	8.00	48.00
	P3	6	5.00	30.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Kadar SOD	Kolagen Tipe I	Kolagen Tipe III
Mann-Whitney U	4.000	.000	9.000
Wilcoxon W	25.000	21.000	30.000
Z	-2.246	-2.882	-1.441
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025	.004	.150
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 ^b	.002 ^b	.180 ^b

a. Grouping Variable: Subjek

b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	Subjek	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kadar SOD	P1	6	8.33	50.00
	P2	6	4.67	28.00
	Total	12		
Kolagen Tipe I	P1	6	7.67	46.00
	P2	6	5.33	32.00
	Total	12		
Kolagen Tipe III	P1	6	5.17	31.00
	P2	6	7.83	47.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Kadar SOD	Kolagen Tipe I	Kolagen Tipe III
Mann-Whitney U	7.000	11.000	10.000
Wilcoxon W	28.000	32.000	31.000
Z	-1.780	-1.121	-1.281
Asymp. Sig. (2-tailed)	.075	.262	.200
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.093 ^b	.310 ^b	.240 ^b

a. Grouping Variable: Subjek

b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	Subjek	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kadar SOD	P1	6	6.17	37.00
	P3	6	6.83	41.00
	Total	12		
Kolagen Tipe I	P1	6	4.67	28.00
	P3	6	8.33	50.00
	Total	12		
Kolagen Tipe III	P1	6	8.50	51.00
	P3	6	4.50	27.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Kadar SOD	Kolagen Tipe I	Kolagen Tipe III
Mann-Whitney U	16.000	7.000	6.000
Wilcoxon W	37.000	28.000	27.000
Z	-.322	-1.761	-1.922
Asymp. Sig. (2-tailed)	.747	.078	.055
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.818 ^b	.093 ^b	.065 ^b

a. Grouping Variable: Subjek

b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	Subjek	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Kadar SOD	P2	6	4.67	28.00
	P3	6	8.33	50.00
	Total	12		
Kolagen Tipe I	P2	6	4.00	24.00
	P3	6	9.00	54.00
	Total	12		
Kolagen Tipe III	P2	6	9.17	55.00
	P3	6	3.83	23.00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Kadar SOD	Kolagen Tipe I	Kolagen Tipe III
Mann-Whitney U	7.000	3.000	2.000
Wilcoxon W	28.000	24.000	23.000
Z	-1.787	-2.402	-2.562
Asymp. Sig. (2-tailed)	.074	.016	.010
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.093 ^b	.015 ^b	.009 ^b

a. Grouping Variable: Subjek

b. Not corrected for ties.

Lampiran 4. Foto Kegiatan Penelitian



Ekstraksi Pengentalan



Krim Jadi



Oven 40° C Air Hingga 10%



Setelah Oven Kopi Dihaluskan



Proses Maserasi



Sampel Darah Kurang Lebih 2 cc



Setelah Disentrifuge 15 Menit